

ÉCOLE DOCTORALE ED414 SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
INSERM U1113 Equipe 3

THÈSE présentée par :

Irène ASMANE-DE LA PORTE

soutenue le : 20 juillet 2015

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie/ Cancérologie

**Coopération privilégiée entre le microenvironnement stromal
et les variants autonomes du récepteur des androgènes
dans le cancer de la prostate**

THÈSE dirigée par :

M. Jocelyn CERALINE

MCU-PH, HDR, Université de Strasbourg

Et codirigée par :

M. Jean-Emmanuel KURTZ

PU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. Francis VACHEROT

PR-PU, Faculté de Médecine de Créteil

M. Gwendal LAZENNEC

DR, CNRS CR1, Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme Marie-Christine RIO

DR, IGBMC, Strasbourg

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement Jocelyn Céraline qui m'a accueillie dans son laboratoire, m'a fait confiance et m'a permis de travailler un passionnant sujet. Merci d'avoir été attentif et d'avoir partagé avec moi tes idées et ta rigueur scientifique. Merci d'avoir dirigé ce travail de thèse qui m'a procuré beaucoup de joies, et de lui avoir donné des perspectives à poursuivre au sein de ton équipe. Merci de m'avoir soutenue tout au long de ce travail mais également dans ma vie de médecin.

Je tiens à remercier très sincèrement Jean-Emmanuel Kurtz qui a accepté de codiriger ce travail de thèse et d'y apporter son œil éclairé. Merci de m'avoir soutenue lors de mon clinicat dans cette thèse qui m'est chère.

Je remercie vivement les autres membres du jury qui ont accepté d'apporter leur expertise pour juger ce travail: Mme Marie-Christine Rio, M. Francis Vacherot et M. Gwendal Lazennec.

Je tiens à remercier très sincèrement tout le laboratoire, car il est rempli de passionnés et d'une belle ambiance qui rappellent que la recherche est un vrai travail d'équipe et que c'est un vrai bonheur d'en faire partie! Je remercie tout particulièrement ma chère Marine : merci infiniment pour ton aide précieuse, ton intérêt, et tes doigts de fée! Eva, un grand merci pour tout ce que tu m'as appris et pour ton aide bienveillante. Félicie, merci pour ta gentillesse, ta finesse et pour les moments de partage.

Et sans oublier que l'oncologie est une discipline transversale, je remercie chaleureusement tout le service d'oncologie médicale au sein duquel j'ai passé mes années d'internat et clinicat, et tout particulièrement Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Brigitte Duclos, Veronica Goldborg, Sebastian Serra et Valère Litique.

Avec toute mon affection, je remercie tendrement mes chers parents, ma chère sœur et mes amies.

Charles, merci pour ta patience et ton soutien : tu m'as donné le temps et le calme dont j'avais besoin pour rédiger cette thèse. Merveilleux mari, merveilleux papa, tu nous fais vivre dans une chance qui nous sourit.

I.	INTRODUCTION	7
II.	EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DE LA PROSTATE	10
II.A.	Incidence, mortalité et disparités géographiques	10
II.B.	Etiologies du cancer de la prostate	11
II.B.a.	La distribution selon l'âge	11
II.B.b.	Hérédité	12
II.B.c.	Ethnie	12
II.B.d.	Facteurs environnementaux	12
II.B.e.	Les altérations moléculaires dans les cas sporadiques	13
III.	HISTOIRE NATURELLE DU CANCER DE LA PROSTATE	14
III.A.	Importance de l'imprégnation hormonale	14
III.B.	Anatomie de la prostate	16
III.C.	Anatomopathologie	17
III.D.	Stratégies thérapeutiques du cancer de la prostate	19
III.D.a.	La déprivation androgénique	19
III.D.b.	Les traitements actuels	21
III.D.c.	Les différentes options thérapeutiques	21
III.E.	Biologie moléculaire du cancer de la prostate	22
III.E.a.	Le gène de fusion impliquant le promoteur de <i>TMPRSS2</i> et les facteurs de transcription <i>ETS</i>	22
III.E.b.	NKX3.1	23
III.E.c.	C-MYC	24
III.E.d.	Perte de PTEN	24
III.E.e.	Le récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate	25
III.E.e.i	Un récepteur nucléaire	25
III.E.e.ii	Le récepteur des androgènes est impliqué dans la pathogenèse précoce prostatique	27
III.E.e.iii	Le récepteur des androgènes est impliqué dans la progression tumorale résistante à la castration	27
III.E.e.iv	Gènes cibles du récepteur des androgènes	28
IV.	STRUCTURE DU RECEPTEUR DES ANDROGENES (RA)	29
IV.A.	Les mécanismes moléculaires de l'indépendance hormonale	31
IV.B.	Les mutants du gène du récepteur des androgènes	34
IV.B.a.	Origine et structure des variants constitutivement actifs du RA	35
IV.B.b.	Modifications post-traductionnelles du RA conduisant à des isoformes tronqués	37
IV.C.	Fonctions des variants constitutivement actifs du RA	39
IV.C.a.	Activité transcriptionnelle ligand-indépendante	39
IV.C.b.	Localisation cellulaire et tissulaire tumorale prostatique	40

IV.C.c.	Signification clinique	40
IV.C.d.	En faveur de la progression tumorale prostatique	40
IV.C.e.	Sensibilité aux nouvelles thérapeutiques	41
V.	LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL	43
V.A.	Les composants cellulaires du microenvironnement tumoral	43
V.B.	Les CAFs (cancer-associated-fibroblasts)	45
V.C.	La communication épithélio-stromale	46
V.D.	Les Chemokines	47
V.E.	Le stroma tumoral dans le cancer de la prostate	49
V.E.a.	Le stroma tumoral prostatique est réactif	49
V.E.b.	Un rôle dans l'échappement à la déprivation androgénique	50
V.E.c.	Importance de l'effet du stroma tumoral selon le sous-type de cellules stromales	51
V.E.d.	L'interleukine-6 est sécrétée par le stroma tumoral prostatique	52
V.F.	La voie de l'interleukine-6 dans le cancer de la prostate	53
V.F.a.	La voie de l'interleukine-6	53
V.F.b.	Les voies de l'interleukine-6 et du récepteur des androgènes	56
V.F.b.i	Rôle potentiel dans les lignées cellulaires épithéliales exprimant le RAQ640X	57
VI.	MATERIEL ET METHODES	59
VI.A.	Lignées et cultures cellulaires	59
VI.A.a.	Lignées cellulaires épithéliales	59
VI.A.a.i	LNCaP et C4-2b	59
VI.A.b.	Lignées cellulaires stromales prostatiques	60
VI.B.	Milieu conditionné par les PrSC (CMPrSC)	60
VI.C.	Réactifs utilisés	61
VI.D.	Transfection	61
VI.D.a.	Les plasmides	61
VI.D.b.	Protocole de transfection transitoire	62
VI.E.	Tests fonctionnels	62
VI.E.a.	Tests Luciférase	62
VI.E.b.	Tests de prolifération cellulaire	63
VI.E.c.	Recherche de modifications morphologiques des LNCaP en co-culture avec les PrSC	63
VI.F.	Immunofluorescence	64
VI.G.	Immunoblots	65
VI.H.	Tests ELISA dosage pSTAT3 et STAT3	66

VI.I.	Analyse transcriptomique par IPA (Ingenuity Pathway Analysis)	66
VI.J.	RT-PCR en temps réel	67
VI.K.	Dosage cytokinique	70
VI.L.	Analyse statistique	70
VII.	RESULTATS ET DISCUSSION	72
VII.A.	Les cellules stromales prostatiques et les formes constitutivement actives du récepteur des androgènes coopèrent via STAT3 et la voie de l'interleukine-6 pour soutenir la progression tumorale du cancer de la prostate	72
VII.A.	Impact de la voie de l'interleukine-6 dans la coopération épithélio-stromale privilégiée impliquant les variants tronqués autonomes du RA	96
VII.A.a.	L'augmentation de pSTAT3 liée à l'exposition au CMPrSC	96
VII.A.a.i	Dosage de pSTAT3-Y705 et STAT3 dans les LNCaP	96
	Afin de conforter les résultats d'analyse protéique obtenus par immunoblots de pSTAT3, nous avons réalisé un dosage par ELISA dans les LNCaP exprimant les variants constitutifs du RA et exposées au milieu conditionnée par les PrSC ou non.	96
VII.A.a.ii	Distribution cellulaire de pSTAT3 dans les LNCaP	97
VII.A.a.iii	Etude de la transactivation de STAT3 et de l'interaction STAT3-RA	99
VII.A.b.	Etude des autres effecteurs de la cascade de la voie de l'interleukine-6 pouvant expliquer l'augmentation de pSTAT3 en présence de CMPrSC et l'augmentation de la transactivation de STAT3 en présence de CMPrSC et de RA tronqués constitutivement actifs	104
	gp130 et gp80	104
	JAK	107
	Tyrosine kinase Fer	108
VII.B.	Mise en évidence d'un profil transcriptomique spécifique	111
VII.B.a.i	Effet isolé du CMPrSC sur les LNCaP exprimant ou non le RAQ640X	111
VII.B.a.ii	Effet isolé de l'expression du RAQ640X sur les LNCaP exposées ou non au CMPrSC	116
VII.B.a.iii	Effet conjoint de l'exposition au CMPrSC et de l'expression du RAQ640X dans les LNCaP	119
VII.B.b.	Les propriétés fonctionnelles potentiellement acquises par l'expression conjointe de variants tronqués et de l'exposition au CMPrSC	121
	VII.B.b.i Recherche de modifications morphologiques des cellules épithéliales secondaires à l'expression du RAQ640X et de la co-culture directe avec les cellules stromales	121
	VII.B.b.ii Recherche d'une modification de la prolifération cellulaire des cellules épithéliales tumorales secondaire à l'expression du RAQ640X et à l'exposition au CMPrSC	123
VIII.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	126
IX.	REFERENCES	129

Liste des Figures

Figure 1: Axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope masculin	14
Figure 2: Biosynthèse des androgènes.....	15
Figure 3: Localisation anatomique de la glande prostatique	16
Figure 4: Les adénocarcinomes prostatiques sont en grande majorité situés dans la zone périphérique de la glande, alors que 5% sont dans la zone centrale et moins de 20% dans la zone de transition (A). L'aspect morphologique en HE est celui de cellules adénocarcinomateuses qui ont franchi la lame basale (B).	18
Figure 5: Score de Gleason.....	18
Figure 6: Schéma des thérapeutiques de déprivation androgénique.....	20
Figure 7: Schéma de la structure commune aux récepteurs nucléaires.....	26
Figure 8: Schéma de la structure du DBD des récepteurs nucléaires.....	26
Figure 9: Schéma de la structure du RA	30
Figure 10 (à partir de Cabrespine et al. 2004): Schéma de certaines des voies alternes responsables d'une activation ligand-indépendante du RA.....	32
Figure 11: Schéma des mutants tronqués du RA résultant de mutations non-sens (A.) ou d'épissage alternatif (B.).	38
Figure 12: Augmentation de la transactivation des facteurs AP-1 et NFAT avec l'expression des variants tronqués autonomes RAQ640X ou RAV7.	42
Figure 13 (à partir de Hanahan D and Weinberg R)	44
Figure 14 (à partir de Hanahan D and Weinberg R)	46
Figure 15 (à partir de Vindrieux D): Les chemokines dans le cancer de la prostate.....	48
Figure 16: Système d'activation des voies de l'IL-6.....	54
Figure 17: Dosage de pSTAT3 et STAT3 par ELISA dans LNCaP transfectées par des plasmides codant pour le RAQ640X, RAWT ou RAV7 et exposées 48h au CMPrSC ou milieu contrôle.....	96
Figure 18: Expression de pSTAT3 dans des extraits protéiques nucléaires.....	98
Figure 19: Expression de pSTAT3 dans des extraits protéiques cytoplasmiques.....	98
Figure 20: Effet de l'inhibition de l'activité de STAT3 sur l'activité SIE-luciférase dans les C4-2b exprimant le RAQ640X.....	101
Figure 21: Effet de l'inhibition de l'activité de STAT3 sur l'expression de pSTAT3-Y705 et STAT3 dans les C4-2b exprimant le RAQ640X.....	101
Figure 22: Interaction entre les RAQ640X, RAV7, RAW7 et STAT3 total dans des extraits protéiques nucléaires de LNCaP.....	102
Figure 23: Effet de l'exposition au CMPrSC pendant 48h sur l'activité SIE-luciférase dans les 22RV1 transfectées pour les plasmides codant pour le RAQ640X ou RAV7 ou RAR710X ou le plasmide vide.....	103
Figure 24: Expression de gp130 dans des extraits protéiques totaux.....	105
Figure 25: Expression de gp130 dans des extraits protéiques membranaires.....	106
Figure 26: Expression transcriptionnelle de <i>GP130</i> par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.....	106
Figure 27: Expression de JAK2 dans des extraits protéiques membranaires.....	107
Figure 28: Expression de Fer tyrosine kinase dans des extraits protéiques totaux.....	108
Figure 29: Expression transcriptionnelle de <i>GDF15</i> par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.....	113

Figure 30: Expression transcriptionnelle de <i>TNFSF10</i> par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.....	115
Figure 31: Expression transcriptionnelle de <i>DDIT3</i> par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.....	115
Figure 32: Expression transcriptionnelle de <i>TIPARP</i> et <i>NCOA3</i> par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.....	117
Figure 33: Expression transcriptionnelle de <i>CXCR4</i> par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.....	118
Figure 34: Observation des contours cellulaires des LNCaP en co-culture directe avec les PrSC.....	122
Figure 35: Prolifération cellulaire des LNCaP (A.) et des C4-2b (B.).....	123
Figure 36: Prolifération cellulaire des LNCaP exprimant le RAV7 et exposées au CMPrSC	124

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Référence des amorces de qPCR utilisées	69
Tableau 2: Effet du CMPrSC après analyse du transcriptome par mRNA array et IPA. Exemple de gènes identifiés dans les 2 premiers réseaux dans les analyses A et B.....	113
Tableau 3: Effet du RAQ640X après analyse du transcriptome par mRNA array et IPA. Exemple de gènes identifiés dans les 2 premiers réseaux dans les analyse A et B.	117
Tableau 4: Effet conjoint du CMPrSC et du RAQ640X après analyse du transcriptome par mRNA array et IPA. Exemple de gènes identifiés dans les 2 premiers réseaux dans les analyse A et B.	120

I. Introduction

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme et son développement ainsi que sa progression dépendent de la stimulation hormonale androgénique via le récepteur des androgènes. Ainsi, l'hormonothérapie ayant pour objectif la déprivation androgénique est le traitement de référence du cancer de la prostate localement avancé et métastatique. L'hormonothérapie permet un réel bénéfice clinique et une amélioration de la survie des patients ¹, mais la survenue d'une maladie résistante à la castration est inévitable.

Dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'échappement à l'hormonothérapie, les variants constitutivement actifs du récepteur des androgènes ont été décrits à différents stades de la maladie, et de façon intéressante au stade métastatique, illustrant leur rôle dans la progression de la maladie et la résistance aux thérapeutiques de déprivation androgénique ²⁻⁶. Ces variants du récepteur des androgènes avec troncature précoce résultent soit de mutations somatiques non-sens comme le RAQ640X, soit d'épissage alternatif comme le RAV7, et sont des protéines dont l'activité est ligand-indépendante et constitutive ^{5,7}. Notre laboratoire a mis en évidence la présence du RAQ640X dans des échantillons de cancer de la prostate métastatique osseux et a étudié les propriétés oncogéniques résultant de son expression dans des lignées cellulaires épithéliales cancéreuses de type LNCaP. Ainsi, le RAQ640X est responsable d'une hyper-transactivation de facteurs de transcription impliqués dans la progression tumorale ³ et d'une hyper-régulation positive de l'expression des marqueurs mésenchymateux ⁸. Ces résultats soulignent l'importance de ce type de variants tronqués du récepteur des androgènes dans la progression tumorale, l'acquisition de l'échappement hormonal et le développement probable d'un phénotype oncogénique agressif et précoce du cancer de la prostate.

Un des autres mécanismes impliqué dans l'invasion tumorale et la progression tumorale prostatique est la coopération épithélio-stromale ⁹. Le microenvironnement tumoral -ou stroma tumoral- est constitué de plusieurs types cellulaires (fibroblastes, cellules inflammatoires lymphocytaires, macrophagiques, dendritiques et cellules endothéliales vasculaires) et de la matrice extracellulaire. Le stroma tumoral sécrète des chémokines, des cytokines comme l'interleukine-6 (IL6) ¹⁰, des facteurs de croissance, du collagène, des métalloprotéases, qui vont générer différents signaux pour les cellules épithéliales ⁹. Ainsi, la communication épithélio-stromale va impacter les voies de signalisation au sein des cellules épithéliales tumorales et contribuer au développement et à la progression du cancer de la prostate résistant à la castration chez des patients traités par hormonothérapie ¹¹.

Dans l'objectif d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cancer de la prostate résistant à la castration, notre laboratoire s'est intéressé à la question de l'existence d'une relation entre le stroma prostatique et l'expression de variants constitutivement actifs du récepteur des androgènes dans des cellules épithéliales tumorales prostatiques. Après avoir mis en évidence un effet potentialisateur sur la transactivation de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire et l'invasion -déjà augmenté par l'expression de variants tronqués- en présence de milieu de culture conditionné par les cellules stromales fibroblastiques prostatiques, le rôle d'une coopération épithélio-stromale « privilégiée » en présence de variants du récepteur des androgènes était notre hypothèse d'étude. Nous avons donc analysé, dans des modèles cellulaires, les cytokines sécrétées par les cellules stromales prostatiques (PrSC), l'effet sur le transcriptome des cellules épithéliales tumorales exprimant les variants du récepteur des androgènes et exposées aux facteurs sécrétés par les PrSC, l'identification de gènes cibles et de voies de signalisation d'intérêt, et la recherche de propriétés fonctionnelles issues de la mise en évidence d'une coopération épithélio-stromale.

Introduction

II. Epidémiologie du cancer de la prostate

II.A. Incidence, mortalité et disparités géographiques

Le cancer de la prostate est l'un des cancers les plus fréquents en dehors des cancers cutanés et est responsable du décès d'environ un quart de million d'hommes à travers le monde ¹². C'est le 6^{ème} cancer le plus fréquent dans le monde -en incidence- et le 3^{ème} en importance chez l'homme puisqu'il représente 9,7% des cancers de l'homme (15,3% dans les pays développés et 4,3% dans les pays en voie de développement), avec une mortalité spécifique par cancer moindre (201 000 décès soit 5,6% de décès par cancer chez l'homme et 3,2% de décès pour toute cause de cancers) qui illustre le fait que beaucoup d'hommes sont en vie après un diagnostic de cancer de la prostate. Le cancer de la prostate est le cancer le plus prévalent chez l'homme et justifie sa place d'enjeu de santé publique.

L'incidence élevée du cancer de la prostate reflète non seulement des différences de risque de survenue de la maladie, mais également l'étendue des diagnostics très précoces de cancers dits « latents », issus de l'identification des personnes asymptomatiques et des diagnostics « fortuits » dans les pièces de prostatectomie ou d'autopsies. Ainsi le taux d'incidence de cancer de la prostate est très important aux Etats-Unis, en Australie et dans les pays scandinaves, rare en Asie, et variable en Europe, et suit une répartition selon un gradient nord-ouest/sud-est. Le nombre de cas est en augmentation constante sur les dernières décennies, en partie en raison de l'allongement de la durée de vie.

La survie est significativement plus importante dans les pays à forte incidence (80% aux Etats-Unis versus 40% dans les pays en voie de développement), notamment en raison d'une plus grande détection de cancers « latents » par les méthodes de diagnostic précoce. Le taux de mortalité est le plus élevé dans les populations afro-américaines, puisqu'il est 70% plus élevé que dans les populations blanches. La majorité des décès liés aux cancers de la prostate relève de l'évolution métastatique de la maladie avec 80% de premières localisations osseuses ¹³.

En France, l'Institut National de Veille Sanitaire relève une incidence de 62 245 nouveaux cas estimés en 2005, soit 34% de l'ensemble des cancers incidents. Il est au 2^{ème} rang des décès par cancer chez l'homme et au 4^{ème} rang dans l'ensemble de la population. L'incidence du cancer de la prostate a connu une forte augmentation depuis 1980, en raison de l'effet combiné du vieillissement de la population, de l'amélioration des moyens diagnostiques et de la diffusion du dosage du PSA

(Prostate Specific Antigen) (+6,3% par an entre 1980 et 2005 et +8,5% par an entre 2000 et 2005). La mortalité par cancer de la prostate a quant à elle diminué depuis 1990, cette diminution étant plus importante sur la période 2000-2005. Cette réduction faible mais constante de la mortalité peut être mise en rapport avec l'amélioration des conditions de prise en charge (amélioration de l'efficacité des traitements et diagnostic à un stade plus précoce). Le dosage du PSA sérique est actuellement utilisé dans le diagnostic du cancer de la prostate, et même s'il a ouvert la voie à un possible dépistage, aucun programme de dépistage systématique n'a été mis en place ni en France ni ailleurs dans le monde. En effet, plusieurs problématiques interviennent, comme la réduction de la mortalité pour la population concernée, les risques de « sur-diagnostic » et de « sur-traitement ».

II.B. Etiologies du cancer de la prostate

II.B.a. La distribution selon l'âge

Parmi les cancers de l'adulte, il n'y a pas d'autres cancers qui soient davantage reliés à l'âge que le cancer de la prostate. Le risque de cancer de la prostate augmente par paliers avec l'âge. L'incidence de cancer clinique est faible jusqu'à 50 ans, puis augmente rapidement après, et environ 75% des cas surviennent chez les hommes de 65 ans et plus.

Les pics d'incidence apparaissent à partir de 60 ans et plus, mais des micros foyers carcinomateux sont décrits à partir de 30 ans et plus¹⁴. Aux Etats-Unis, l'incidence chez les populations blanches de 2000 à 2004 était de 7/100 000 et de 780/100 000 respectivement aux âges de 40-44 ans et 80-84 ans, avec une augmentation croissante et continue selon les groupes d'âge, même si les données peuvent être biaisées par la moindre fréquence des biopsies aux âges très avancés, en raison des comorbidités.

II.B.b. Hérité

Il existe des formes héréditaires du cancer de la prostate dans environ 5% des cas. Les gènes impliqués n'ont pas encore été totalement identifiés. Le diagnostic de cancer de la prostate héréditaire est envisagé quand :

- trois apparentés sont atteints dans différentes générations,
- ou trois apparentés de premier degré sont atteints,
- ou un âge de survenue précoce (avant 55 ans) chez deux apparentés atteints.

Le risque de décès de la maladie augmente avec l'âge précoce au diagnostic des apparentés.

Les études génomiques dans les familles avec cancer de la prostate a permis d'identifier des allèles à haut risque, sans pour autant identifier la majorité des cas héréditaires, et les polymorphismes d'autres gènes de faible pénétrance sont importants, rendant l'identification des gènes de prédisposition difficile. Cependant, les gènes impliqués dans l'activation androgénique, la réparation de l'ADN, le métabolisme des agents carcinogènes et les voies de l'inflammation semblent jouer un rôle. Par exemple les hommes des familles porteuses de mutations du gène *BRCA2* ont un risque augmenté de cancer de la prostate.

II.B.c. Ethnie

Les différences de risque selon les origines ethniques suggèrent que les facteurs génétiques sont responsables des différences observées, mais les variations d'incidence avec le temps et les phénomènes migratoires suggèrent aussi que les différences liées à l'environnement et aux modes de vie sont à prendre en compte.

Des polymorphismes du gène du récepteur des androgènes (RA), du gène du récepteur de la vitamine D ou dans la voie de signalisation de l'IGF (insulin like growth factor) ont été rapportés sans qu'il y ait d'évidence pour une différence significative inter-ethnique.

II.B.d. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux ou comportementaux ont été étudiés, mais sans identification de facteur de risque spécifique. Les expositions environnementales impliquées concernent les agents chimiques professionnels/industriels et les prostatites chroniques.

II.B.e. Les altérations moléculaires dans les cas sporadiques

Alors que des mutations d'oncogènes classiques et de gènes suppresseurs de tumeurs ne sont pas fréquentes dans les cancers de la prostate, des altérations somatiques du génome ont été décrites. Ainsi, les altérations chromosomiques les plus fréquentes identifiées par CHG array sont les pertes de 1p, 6q, 8p, 10q, 13q, 16q, et 18q et les gains de 1q, 2p, 7, 8q, 18q, et Xq*.

Certains gènes ont été particulièrement décrits comme *NKX3.1* (NK3 homeobox 1), gène homéotique qui code pour un facteur de transcription dont la diminution d'expression est associée au cancer de la prostate, l'inactivation de *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome Ten), *P27*, *CDH1* (Cadherin 1) et les mutations de *TP53* (Tumor Protein 53) comme des événements tardifs dans les situations avancées et métastatiques.

Enfin, le gène du récepteur des androgènes (RA) joue un rôle clé dans le développement de la prostate, l'histoire naturelle du cancer de la prostate et la phase d'échappement à la castration androgénique.

* in *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, Chapter 3 « Tumours of the prostate », WHO, Blue Book Classification of Tumours, 2004*

III. Histoire naturelle du cancer de la prostate

III.A. Importance de l'imprégnation hormonale

La testostérone est essentielle pour le développement de la prostate durant la vie embryonnaire et pendant la puberté, mais est aussi nécessaire pour la fonction normale de la glande prostatique pendant la vie adulte. Les testicules sont sous l'influence de l'axe hypothalamo-hypophysaire avec la sécrétion de la LH par la glande pituitaire qui répond à la LHRH sécrétée par l'hypothalamus. Un rétrocontrôle négatif régule cette sécrétion (cf. Figure 1). Les cellules de Leydig produisent 90% de la testostérone libre circulante, le reste étant produit par le cortex surrénalien (cf. Figure 2).

L'effet de la testostérone sur le cancer de la prostate a été mis en évidence par Huggins et Hodges en 1941. La glande prostatique est principalement responsable de la sécrétion des facteurs qui améliorent la viabilité du sperme pendant la reproduction. A la fois le développement de la glande prostatique et l'entretien de ces fonctions sécrétrices requièrent des androgènes et leur récepteur¹⁵. Le RA peut être exprimé dans d'autres types cellulaires, mais les cellules épithéliales lumineuses dans les glandes prostatiques expriment un taux particulièrement important de RA¹⁶. Ces cellules sont spécialisées dans la sécrétion cellulaire de protéines spécifiques de la prostate, comme les kallikréines telles que le PSA¹⁷.

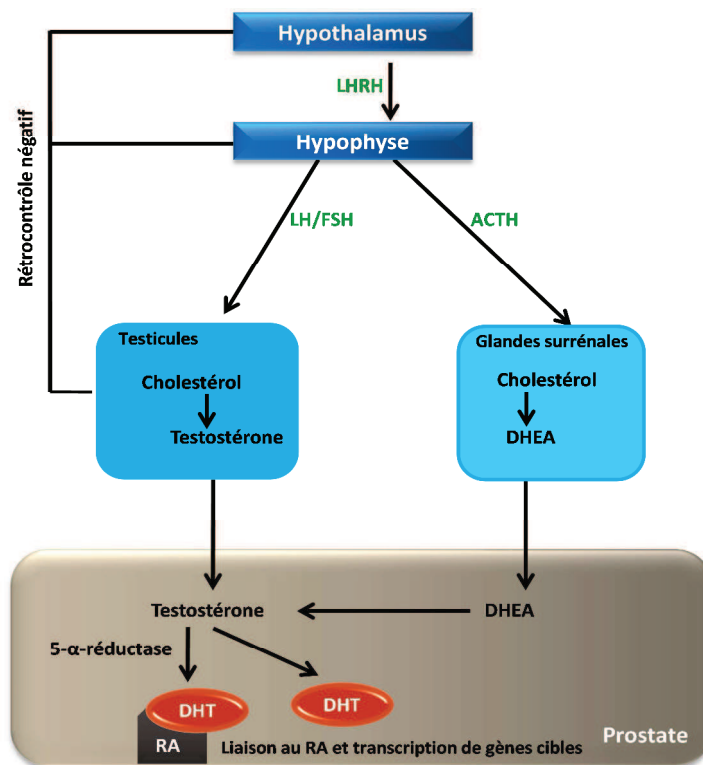


Figure 1: Axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope masculin

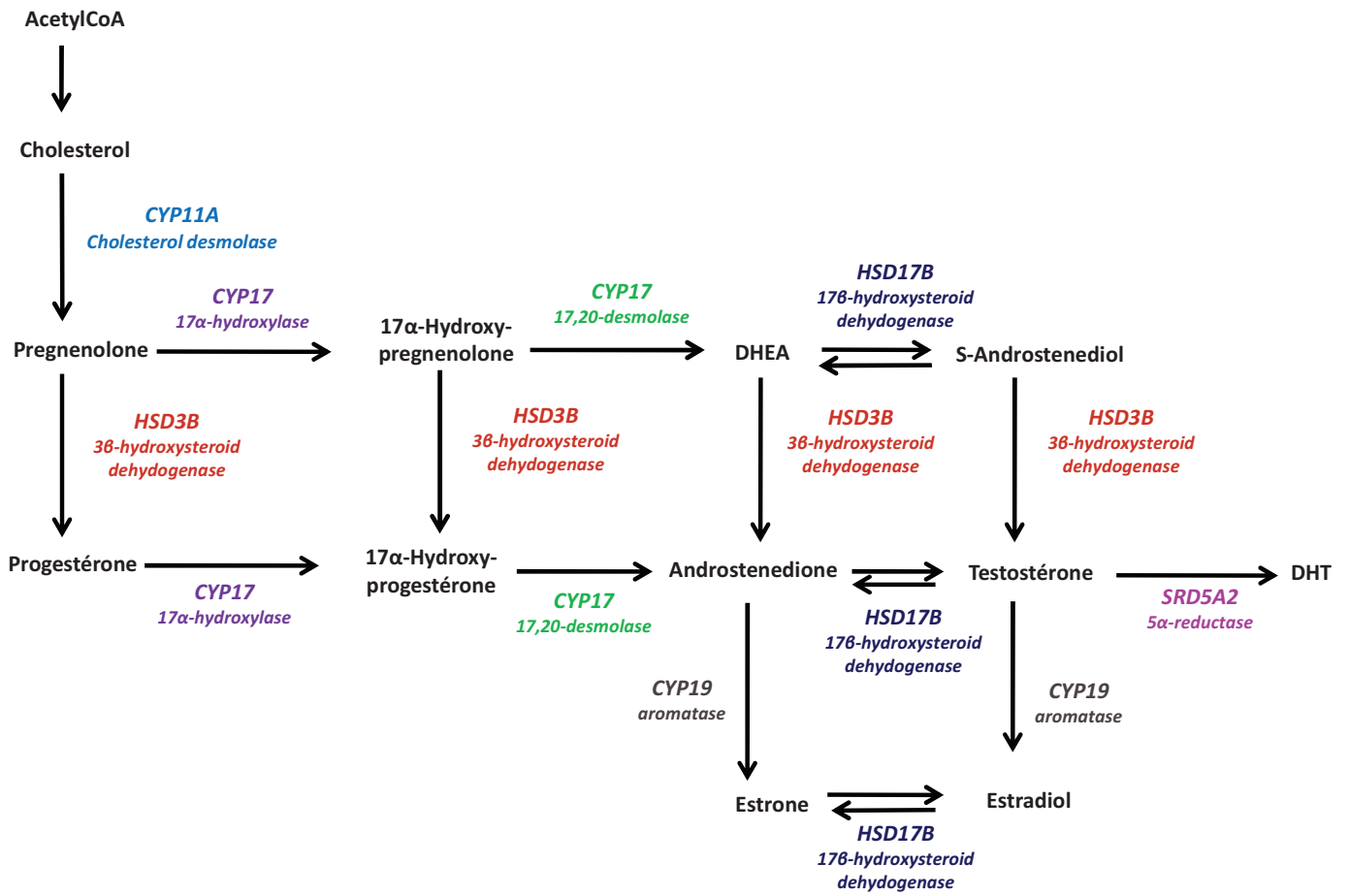


Figure 2: Biosynthèse des androgènes

III.B. Anatomie de la prostate

La prostate est une glande exocrine mesurant en moyenne 25cc et qui est constituée de glandes tubulo-alvéolaires organisées en lobules dont le produit de sécrétion emprunte les canaux excréteurs qui s'abouchent dans l'urètre prostatique. Le fluide prostatique est en majorité composé de sécrétions séminales et est riche en PSA.

La prostate est un organe pelvien, situé entre la vessie et son sphincter urinaire externe, le rectum et le pubis. En raison de sa localisation, le traitement du cancer de la prostate comporte des effets secondaires sur les fonctions de contrôle des sphincters vésicaux, rectaux et fonctions sexuelles (cf. Figure 3).

Bien que la plupart des cancers surviennent près de la capsule prostatique, dans la zone périphérique (contre 15% dans la zone de transition et très peu dans la zone centrale), la maladie est généralement multifocale et atteint plusieurs parties de la glande. L'extension tumorale locale se fait par franchissement de la capsule et envahissement des plexus vasculo-nerveux et des vésicules séminales, puis par contiguïté atteint la vessie et les muscles du plancher pelvien. La dissémination systémique est lymphatique iliaque externe, hypogastrique, obturatrice et pré-sacrée, et aussi artério-veineuse pour atteindre le tissu osseux –tropisme préférentiel des localisations métastatiques prostatiques-mais peut également donner des métastases hépatiques, pulmonaires, cérébrales.

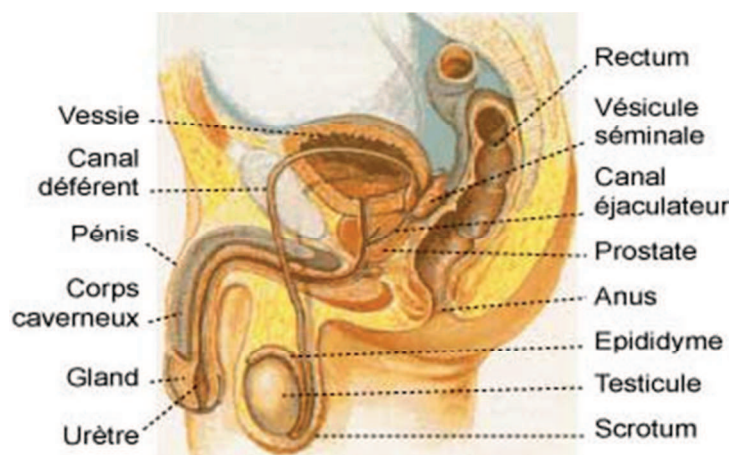


Figure 3: Localisation anatomique de la glande prostatique

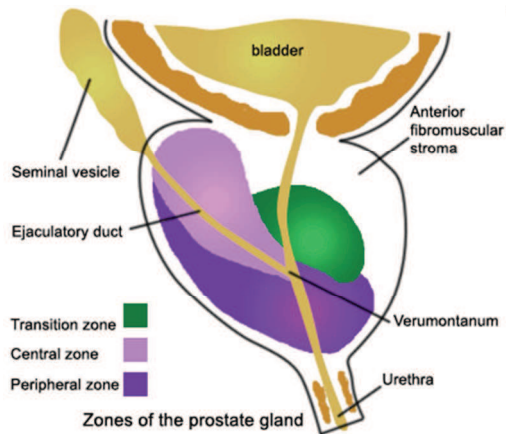
III.C. Anatomopathologie

L'épithélium normal prostatique est constitué d'un groupe hétérogène de cellules avec des niveaux distincts de différenciation. Les couches épithéliales sont constituées de cellules luminales sécrétrices très bien différenciées, non proliférantes, exprimant le RA et produisant du PSA. Les cellules sécrétrices dérivent des cellules basales, et passent par des segments prolifératifs intermédiaires de cellules variables en expression du RA et du PSA selon un gradient croissant du niveau basal au niveau luminal. De rares cellules neuroendocrines sont aussi présentes dans l'épithélium normal prostatique.

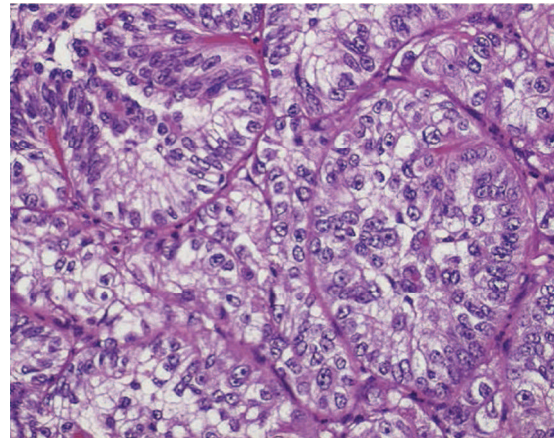
La grande majorité des cancers de la prostate correspond à des adénocarcinomes et surviennent dans les acini et canaux épithéliaux proximaux (cf. Figure 4). Les autres types tumoraux sont les carcinomes à petites cellules issus des cellules neuroendocrines et sont constitués de petites cellules rondes, indifférenciées, avec un immunomarquage positif pour la NSE, la synaptophysine et la chromogranine A.

Les lésions dites précurseurs des lésions carcinomateuses épithéliales invasives sont classiquement les lésions prolifératives intraductales dites « PIN » (prostatic intra-epithelial neoplasia). Néanmoins, l'association de conditions atrophiques et de situations hautement prolifératives telles que l'inflammation chronique, entraîne des lésions de type « atrophie proliférative inflammatoire » qui sont également des premières étapes du processus oncogénique.

Le score de Gleason est une des variables les plus importantes dans l'estimation du pronostic des patients atteints d'un cancer de la prostate. Il évalue les détails architecturaux des glandes carcinomateuses grâce à des critères décrivant un aspect « bien différencié » à « très peu différencié ou anaplasique », définissant 5 niveaux (cf. Figure 5). Le score final de Gleason est la somme des aspects les plus fréquents et des seconds aspects les plus représentés, soit un score allant de 2 (1+2) à 10 (5+5).



A.



B.

Figure 4: Les adénocarcinomes prostatiques sont en grande majorité situés dans la zone périphérique de la glande, alors que 5% sont dans la zone centrale et moins de 20% dans la zone de transition (A). L'aspect morphologique en HE est celui de cellules adénocarcinomeuses qui ont franchi la lame basale (B).

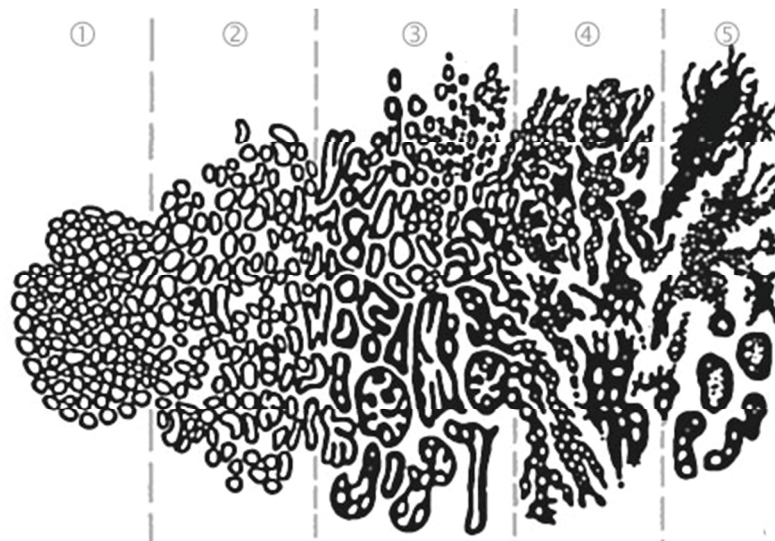


Figure 5: Score de Gleason.

1 : glandes uniformes et petites (très bien différenciées) ; 2 : glandes plus distantes ; 3 : infiltrat de cellules depuis les glandes jusqu'aux marges ; 4 : masses irrégulières de cellules avec peu de glandes ; 5 : pas de glande, cellules étalées (peu différenciées)

III.D. Stratégies thérapeutiques du cancer de la prostate

La prise en charge thérapeutique du cancer de la prostate localisé fait appel à la chirurgie, la radiothérapie, la curiethérapie et l'hormonothérapie adjuvante.

En phase métastatique, le traitement standard de première ligne est la déprivation androgénique¹⁸, qui est efficace pour la plupart des patients, jusqu'à l'apparition de l'échappement hormonal avec l'entrée en phase de résistance à la castration. De nombreux progrès thérapeutiques ont été réalisés ces dix dernières années, avec un arsenal thérapeutique conséquent dont la stratégie optimale est à définir. Ainsi, il faut prendre en compte toute la dimension des éléments cliniques, mais il faudrait aussi pouvoir être aidé par l'utilisation de biomarqueurs en pratique clinique, permettant d'anticiper et d'appréhender les mécanismes de résistance et de suivi des traitements.

III.D.a. La déprivation androgénique

La suppression de la testostérone circulante pour aboutir à des taux équivalents à une castration efficace (via l'orchidectomie bilatérale ou les agonistes/antagonistes de la LHRH) reste la pierre angulaire du traitement du cancer de la prostate métastatique (cf. Figure 6).

L'association aux anti-androgènes comme le flutamide ou le bicalutamide est classiquement utilisée au début du traitement par agoniste de la LHRH pour éviter le syndrome de « flare-up ». Cependant, l'efficacité d'une combinaison prolongée dans le temps est controversée¹⁹.

Dernièrement, l'essai CHAARTED a montré un bénéfice à l'association du docetaxel à la déprivation androgénique chez les patients atteints d'un cancer de la prostate versus la déprivation androgénique seule, à un stade précoce de la prise en charge ; alors que l'essai GETUG 15 n'avait pas réussi à montrer de bénéfice²⁰. Le troisième essai évaluant cette association précoce de taxanes et déprivation androgénique (essai STAMPEDE) est en cours.

Ces trois essais évaluant l'utilisation de taxanes précocement dans la prise en charge illustre l'hypothèse que la chimiothérapie attaquerait les clones cellulaires d'emblée résistants à la castration, à un moment de l'histoire de la maladie où ces clones sont encore vulnérables et les voies de résistance moins établies.

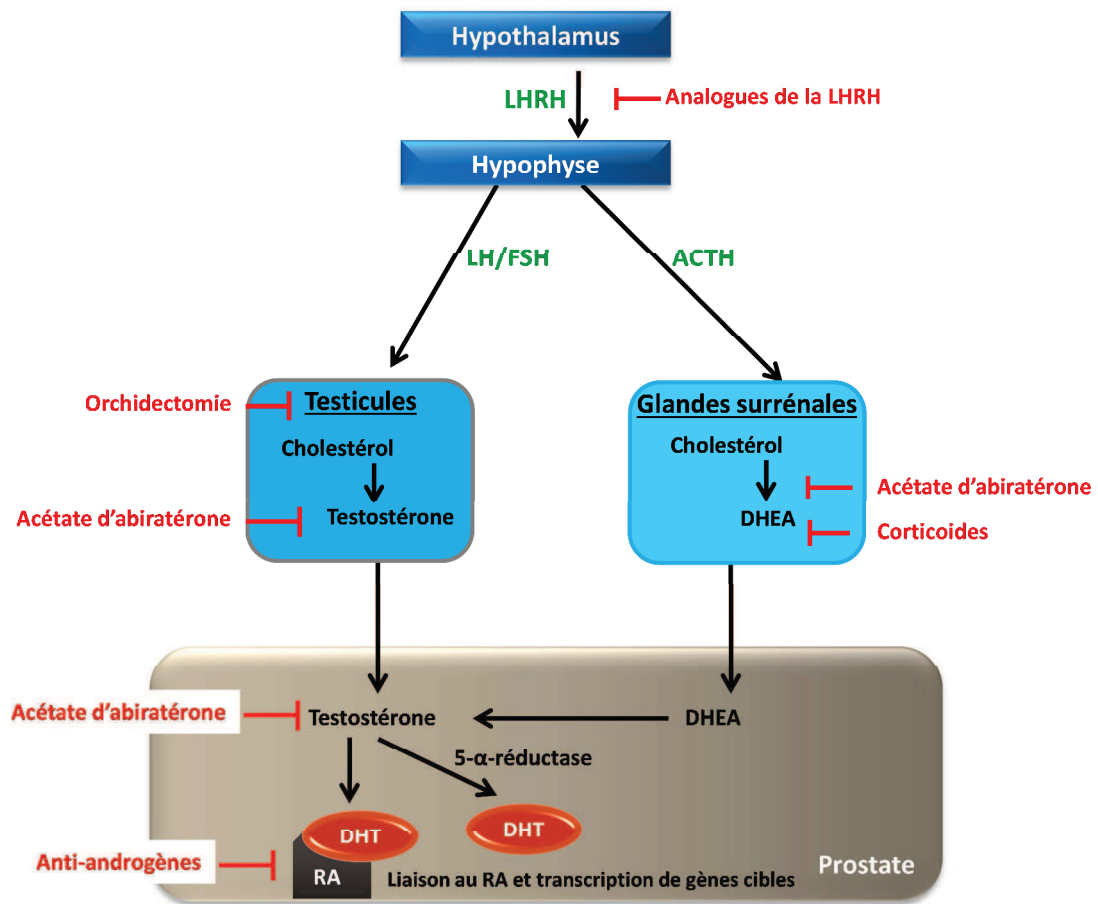


Figure 6: Schéma des thérapeutiques de déprivation androgénique dans le traitement du cancer de la prostate

III.D.b. Les traitements actuels

Les traitements actuels approuvés pour le cancer de la prostate hormono-résistant sont la chimiothérapie, les agents ciblant le RA, les immunothérapies et les radio-isotopes.

En 2004, deux essais cliniques comparant le docetaxel au standard de traitement ont démontré un bénéfice en survie globale ²¹, et plus récemment le cabazitaxel a montré un bénéfice chez les patients préalablement traités par docétaxel ²².

L'inhibition de l'axe du RA utilisant l'acétate d'abiratérone (inhibiteur de la stéroïdogénèse au niveau cellulaire via l'inhibition de la CYP17-20 lyase) ou l'anti-RA l'enzalutamide (qui se lie avec une haute affinité au RA pour l'inhiber) ont permis de fournir un bénéfice significatif pour les patients en phase métastatique et résistants à la castration (cf. Figure 6) ²³.

De plus, un vaccin, le sipuleucel-T et un radio-isotope le radium-223 pour les métastases osseuses, ont tous deux démontré un bénéfice en survie dans des essais de phase III ^{24,25}.

III.D.c. Les différentes options thérapeutiques

Avant l'apparition de drogues ciblant le RA, plusieurs agents étaient utilisés comme les anti-androgènes non-stéroïdiens, le ketoconazole, la cyprotérone, les glucocorticoïdes, le megestrol et les œstrogènes après progression sous un premier traitement déprivateur d'androgènes. Ces traitements permettaient une baisse du PSA de plus de 50%, avec une durée médiane de réponse de 2 à 6 mois, sans qu'aucune étude n'ait montré de bénéfice en survie ²⁶. Les avancées récentes ont permis le développement de traitements ciblant la voie du RA en cas d'échappement hormonal, avec l'acétate d'abiratérone (approuvé avant ou après le docetaxel grâce aux résultats des essais COU-AA-301 et 302) ou l'enzalutamide (approuvé avant ou après le docetaxel grâce aux résultats des essais AFFIRM et PREVAIL), avec actuellement un essai en cours évaluant l'intérêt de l'association enzalutamide-abiratérone.

Malgré ces résultats bénéfiques en survie globale, une résistance est inévitable et la recherche de biomarqueurs est indispensable.

Ainsi, l'identification de l'émergence de variants du RA, tels que les variants d'épissage (comme le RAV7) dans les cellules tumorales circulantes de 62 patients traités par abiratérone ou enzalutamide²⁷, illustre bien les mécanismes mutationnels de résistance acquise au niveau du RA. D'autres études ont mis en évidence d'autres mutations comme le RAF876L permettant de reverser l'activité antagoniste de l'enzalutamide en agoniste ²⁸, illustrant l'importance de l'apparition de ces mutants au cours des traitements ciblant le RA et donc de l'identification de ces biomarqueurs, et

l'intérêt de développer d'autres thérapeutiques inhibant les voies de coopération, avec l'exemple des inhibiteurs de CDK4/6²⁹.

Au-delà de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, la définition des stratégies thérapeutiques est importante. La compréhension et l'étude de la biologie moléculaire du cancer de la prostate est capitale pour l'identification de biomarqueurs.

III.E. Biologie moléculaire du cancer de la prostate

Bien que des altérations moléculaires aient été identifiées dans le cancer de la prostate, il n'y a que peu d'anomalies caractérisées dans des voies de signalisation bien définies (« mutations drivers ») qui seraient responsables de l'initiation et de la progression tumorale.

Sur le plan clinique, le cancer de la prostate est une maladie très hétérogène, avec des patients qui peuvent survivre des années sans maladie métastatique alors même qu'il n'y a pas eu de traitement de la maladie primaire, et d'autres qui décèdent très rapidement. Les paramètres cliniques, dont le score de Gleason, ne sont que modérément prédictifs de l'évolution clinique, et la compréhension des mécanismes moléculaires de progression tumorale sont des aspects indispensables de la recherche dans le cancer de la prostate.

III.E.a. Le gène de fusion impliquant le promoteur de *TMPRSS2* et les facteurs de transcription *ETS*

Au moins 60% des cas de cancers de la prostate contiennent des translocations impliquant les facteurs de transcription de la famille *ETS* (E-twenty-six-specific) qui sont bien décrits comme impliqués dans la pathogenèse tumorale des PNETs.

Grâce à une approche bioinformatique à partir d'analyses de DNA array et PCR, Tomlins et al³⁰ ont mis en évidence que ces facteurs de transcription tels que *ERG* et *ETV1* étaient hyper-exprimés dans 57% des cancers de la prostate et que leur expression transcriptionnelle était sous le contrôle du promoteur du gène *TMPRSS2* (transmembrane protease serine 2- erythroblast transformation specific family). *TMPRSS2* est un gène androgéno-régulé qui code pour une protéase transmembranaire présente de façon constitutive dans la prostate.

Ces transcrits de fusions *TMPRSS2-ETS* semblent résulter le plus souvent de délétion que de translocation, et seraient spécifiques du stade invasif, constituant ainsi une opportunité de diagnostic

précoce de maladie invasive dans des échantillons tumoraux prostatiques. Ils seraient également associés à des phénotypes tumoraux prostatiques plus agressifs, soulignant leur intérêt potentiel de biomarqueurs.

III.E.b. NKX3.1

La perte d'hétérozygotie de 8p21.2 est la plus fréquente des aberrations chromosomiques dans le cancer de la prostate, affectant 60% des PIN et 85% des cancers invasifs ³¹. Le gène le plus intéressant dans cette région est le facteur de transcription homéotique régulé par le RA, *NKX3.1*, dont l'expression coïncide avec le développement du cancer de la prostate dans le sinus urogénital pendant le développement fœtal. *NKX3.1* est supposé être un gène suppresseur de tumeur dans le cancer de la prostate. Cependant, il n'y a pas de mutation ou de délétion de *NKX3.1*, ce qui a conduit à l'hypothèse d'une perte d'hétérozygotie (LOH). Les études mécanistiques suggèrent que *NKX3.1* facilite la différenciation terminale : chez les souris castrées, l'introduction de la testostérone produit une réponse proliférative intense et précoce pour reconstituer le gland puis survient une différenciation et une quiescence. Chez les souris *NKX+/-* et *NKX-/-* il y a un report de la différenciation conduisant à une hypertrophie ³¹.

III.E.c. C-MYC

Le gain en 8q24 est une autre anomalie chromosomique fréquente dans le cancer de la prostate et est fréquemment observée dans les PIN, les carcinomes localisés et les lésions métastatiques. Les tumeurs primaires ont souvent une amplification du bras entier 8q alors que les lésions métastatiques ont souvent de nombreux amplicons au locus de *MYC* en 8q24. L'hyper expression de *MYC* est associée à la transformation dans les cellules primaires épithéliales prostatiques³² et les souris transgéniques exprimant C-MYC dans la prostate développent des PIN qui se transformeront en carcinomes invasifs³³.

III.E.d. Perte de PTEN

PTEN est un gène suppresseur de tumeurs, qui est éteint dans une grande partie des cancers de la prostate, par délétion, mutation ou silencing épigénétique³⁴. Plusieurs études ont confirmé que l'inactivation de *PTEN* est critique dans la pathogenèse du cancer de la prostate, sans avoir pu identifier si cet événement était précoce ou tardif dans la progression tumorale. L'activation de la voie PI3k/AKT/mTOR a été décrite dans le cancer de la prostate, notamment comme une conséquence de cette perte de *PTEN*.

Les taux importants d'IGF circulants sont associés à l'incidence du cancer de la prostate, et peuvent contribuer à la carcinogenèse soit par activation directe de la voie PI3K/AKT/mTOR dans les cellules prostatiques, soit par augmentation du risque d'obésité et de stimulation de la stéroïdogénèse³⁵.

La prévalence importante de mutations de *PTEN* dans le cancer de la prostate a ouvert la voie à des essais avec des inhibiteurs de mTOR (en préclinique dans des modèles avec perte de *PTEN*) mais assez décevants en phase clinique d'hormonorésistance, soulignant l'importance de la boucle de rétrocontrôle activatrice de PI3K.

III.E.e. Le récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate

Nous présentons dans cette partie une introduction aux rôles et fonctions du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate.

III.E.e.i Un récepteur nucléaire

Les récepteurs nucléaires sont présents dans de nombreuses espèces et jouent un rôle important dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaires en fournissant des liens directs entre les molécules de signalisation et la réponse transcriptionnelle.

Ces récepteurs intracellulaires sont regroupés en une superfamille de plus de 150 protéines différentes, et qui comprend notamment les récepteurs des hormones stéroïdes, de la vitamine D, des acides rétinoïques et des hormones thyroïdes. De plus, il a récemment été décrit que les acides gras, oxysterols, les métabolites du farnesol, le leucotriène B4 et la prostaglandine J2 peuvent agir en se liant aux récepteurs nucléaires comme des PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) ou FXR et LXR. En plus de ces récepteurs aux ligands connus, un certain nombre de récepteurs « orphelins », comme le NGFI-B (nerve growth factor IB) ont été décrits.

Les récepteurs nucléaires ont une structure commune (cf. Figure 7)

Pour effectuer leur fonction d'homéostasie, de prolifération, de développement et de reproduction, les récepteurs nucléaires interagissent directement avec les régions régulatrices des gènes cibles, grâce à leur domaine de liaison à l'ADN (cf. Figure 8). Ces régions régulatrices d'ADN sont des séquences qui consistent en la répétition directe de séquence A/GGTCA, séparée par un nombre variable de nucléotides (ce nombre détermine en partie la spécificité de reconnaissance des différents récepteurs). Ces éléments de réponse appelés HRE sont souvent présents en deux copies qui peuvent être orientées comme des palindromes (tête à tête)-notamment dans le cas du RA-, des répétitions directes ou des palindromes inversés (queue à queue). Ces récepteurs se lient à ces séquences comme des homodimères –notamment pour le cas du RA- ou des hétérodimères.

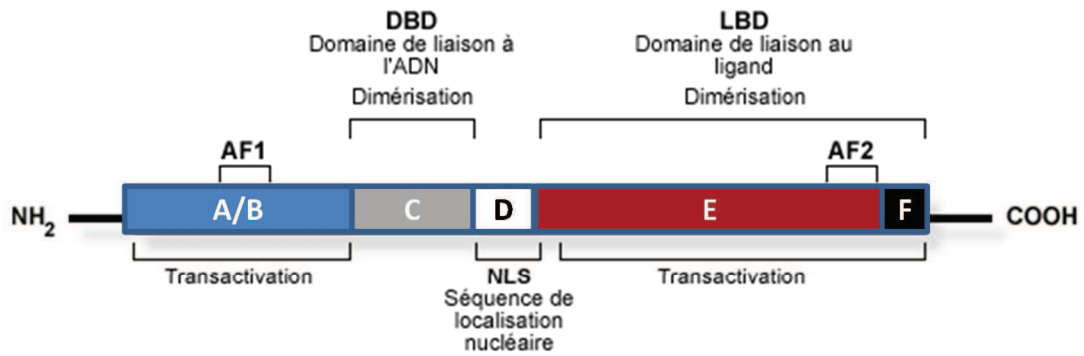


Figure 7: Schéma de la structure commune aux récepteurs nucléaires.

Le domaine variable N-terminal (région A/B) contient le domaine AF-1 de transactivation ligand-indépendant. Le domaine très conservé de liaison à l'ADN (DBD, région C) permet la reconnaissance des séquences spécifiques de liaison à l'ADN. La région D contient le signal de localisation nucléaire. Le domaine de liaison au ligand (LBD) contient le domaine de transactivation AF-2 ligand-dépendant au niveau de l'extrémité C-terminale du LBD.

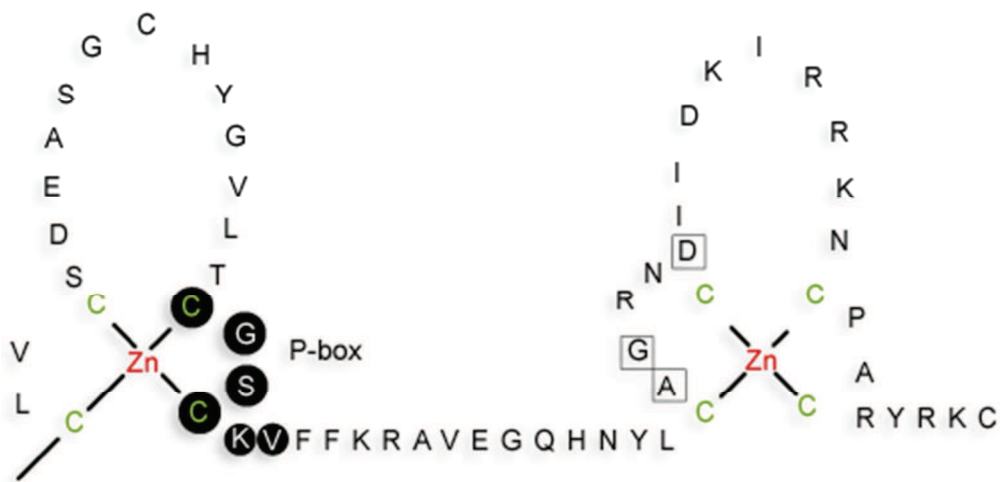


Figure 8: Schéma de la structure du DBD des récepteurs nucléaires.

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est la région la plus conservée, avec la plus grande homologie de séquence parmi les récepteurs nucléaires. Le motif en doigt de zinc permet la fixation à la double hélice d'ADN, la séquence d'acides aminés en cercle noir, « P-box » est celle qui assure la spécificité de reconnaissance de la séquence de liaison d'ADN. Sont présents également des acides aminés responsables de la dimérisation des récepteurs (entourés d'un carré sur ce schéma). Adapté de Pettersson and Gustafsson 2001. Annu. Rev. Physiol. 63 :165-192.

Le récepteur des androgènes (RA) est localisé sur le chromosome Xq12, et est un facteur de transcription de 110kD. Après l'activation classique par le ligand, il est responsable de l'activation de nombreux gènes impliqués dans la survie et la différenciation des cellules épithéliales prostatiques. L'activité du RA est requise pour le développement du tissu sain et du tissu cancéreux prostatique, comme en témoigne l'absence de développement et de croissance prostatique chez les hommes ayant subi une orchidectomie à un âge jeune ou porteur d'une mutation inactivatrice du RA. Le RA joue un rôle capital dans la pathogenèse précoce aussi bien que dans la progression tumorale et c'est pourquoi les traitements inhibiteurs de la fonction du RA restent les premiers traitements du cancer de la prostate.

III.E.e.ii Le récepteur des androgènes est impliqué dans la pathogenèse précoce prostatique

Il a été soulevé que l'hypothèse de l'accentuation de la signalisation liée au RA pouvait prédisposer les hommes à un risque augmenté de cancer de la prostate. Ainsi, les polymorphismes des gènes du RA, du CYP17 et de SRD5A2 ont été longuement étudiés comme à risque et à faible pénétrance, mais les résultats dans les populations sont hétérogènes et ne permettent pas de porter de conclusion³⁶. Les souris transgéniques qui sur-expriment le RA dans la prostate développent parfois des PIN³⁷. Ces éléments suggèrent que l'augmentation de fonction du RA est importante mais n'est pas unique pour la pathogenèse primaire du cancer de la prostate, en faveur d'autres mécanismes additionnels à élucider.

III.E.e.iii Le récepteur des androgènes est impliqué dans la progression tumorale résistante à la castration

En raison de la dépendance linéaire de la prostate aux fonctions cellulaires du RA, la castration chimique qui supprime la fonction sécrétrice testiculaire est devenue la principale étape du traitement systémique du cancer de la prostate. Dans le tissu normal prostatique, la castration résulte en une atrophie et une cessation de la production du PSA de façon stable jusqu'à la restauration des taux circulants de testostérone. Cependant, le cancer de la prostate progresse et devient « résistant à la castration » après une durée variable de réponse. Cette progression est accompagnée d'une restauration de l'élévation du PSA, témoignant d'une reprise de l'activité du RA et donc de la réactivation des voies RA dépendante³⁸. Les cancers résistants à la castration peuvent répondre aux anti-androgènes classiques (bicalutamide) et de nouvelle génération (enzalutamide)

ainsi qu'aux inhibiteurs de la biosynthèse des androgènes (acétate d'abiratérone et plus anciennement le kétoconazole).

Les altérations du gène du RA sont fréquemment associées à la résistance à la castration. Les mutations du *RA* qui résultent en une activation par d'autres stéroïdes comme les corticoïdes et anti-androgènes sont détectées dans des échantillons tumoraux lors d'évolution indépendante à la castration^{39,40}. L'hyper-expression du RA est observée dans la majorité des cancers résistants à la castration et des amplifications géniques dans 30% des cas^{41,42}, conférant une sensibilité à de très faibles doses d'androgènes. En plus de l'hyper-expression du *RA*, des enzymes impliquées dans la biosynthèse des androgènes peuvent également être hyper-exprimées, suggérant une synthèse locale d'androgènes comme mécanisme autocrine d'activation du RA³⁷. Beaucoup d'autres mécanismes d'activation du RA dans le cadre de faibles taux d'androgènes ont été étudiés, comme l'hyper-expression des co-activateurs β -caténine, des membres de la p160-SRC (steroid receptor coactivator) et p300^{38,39}. L'augmentation de la signalisation par des facteurs de croissance comme HER2, IGF-1, EGF et l'IL-6 peut aussi conférer une résistance à la castration^{43,44}.

III.E.e.iv Gènes cibles du récepteur des androgènes

Pour identifier et classer les gènes cibles du RA, on peut considérer les mRNA et les protéines selon leur sensibilité aux androgènes, mais aussi les régions régulatrices de ces gènes cibles comme critères supplémentaires de classification^{45,46}. Mais associer directement un site de liaison avec un gène donné et son expression est délicat car l'ADN génomique peut faire des boucles et former d'autres conformations structurales. Ainsi, les critères de classification détaillée pour les gènes cibles du RA varient d'une étude à l'autre mais typiquement des associations entre les sites de liaison du RA et les gènes sont inférées pour des distances jusqu'à 100kb.

La conclusion globale pour les gènes cibles du RA sont les gènes impliqués dans la consommation du glucose, le turnover lipidique et la production de biomasse/le métabolisme anabolique, à la fois dans la prostate saine et au moins dans les stades localisés du cancer de la prostate^{47,48}.

Bien que le RA occupe un rôle central dans la physiologie et la pathologie du cancer de la prostate, il y a peu de visibilité sur les gènes directement cibles du RA qui sont responsables de la progression de la maladie. Une des hypothèses est fondée sur la fréquence élevée du gène de fusion *TMPRSS2-ETS*

dans le cancer de la prostate, et un des effets primaires des anti-androgènes étant la réduction de l'expression de *TMPRSS2-ETS*, cet oncogène serait potentiellement une cible du RA.

Bien que le RA soit hyper-exprimé dans la plupart des stades avancés, il est décrit que beaucoup de gènes cibles du RA sont exprimés à des taux plus faibles dans les cancers de haut grade et lésions métastatiques^{30,49}. En effet, les cancers de haut grade de Gleason sont parfois associés à des taux faibles de PSA, reflétant la moins bonne différenciation cellulaire tumorale comme marqueur d'agressivité. Ainsi, la relation entre la voie du RA et la résistance à la castration peut également refléter l'état de différenciation des cancers au stade évolué. Un petit groupe de cancers de la prostate très agressifs n'expriment pas le RA.

Afin de mettre en évidence l'importance des variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate résistant à la castration, nous allons décrire les mécanismes responsables de la génération de ces variants et leurs propriétés.

IV. Structure du récepteur des androgènes (RA)

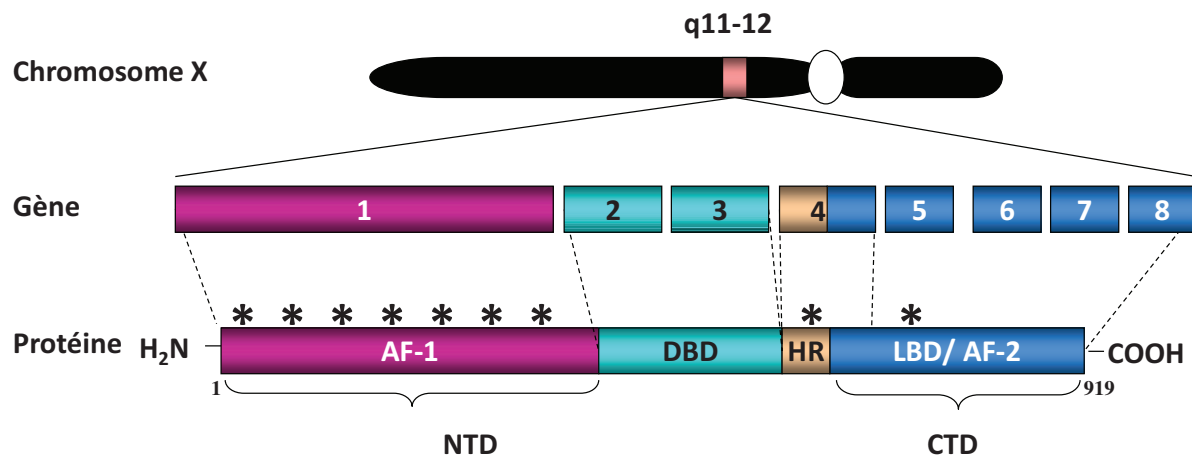
Le RA est un facteur de transcription hormono-dépendant, constitué de 4 domaines communs à la superfamille des récepteurs nucléaires (cf. Figure 9)⁷ :

1. un domaine amino-terminal (NTD) qui contient le site d'activation AF-1 et plusieurs sites de régulations de phosphorylation et de SUMOylation. Le NTD a une séquence non ordonnée et très flexible pour pouvoir adopter une structure et une conformation selon le milieu et les interactions protéiques. Le NTD contient 2 unités d'activation de la transcription qui se chevauchent: TAU-1 (acides aminés 1-370) qui permet l'activation transcriptionnelle du RA suite à la stimulation par un agoniste, et TAU-5 (acides aminés de 360-528) qui confère une activité constitutive au RA en l'absence du LBD⁵⁰.
2. une région centrale qui contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD)
3. une région en épingle (HR) qui contient le signal de localisation nucléaire
4. et une région carboxy-terminale (CTD) qui contient le domaine de liaison au ligand (LBD) et la zone AF-2.

En l'absence d'androgènes, le RA est localisé dans le cytoplasme et est associé aux Hsp (heat-shock proteins). Suite à la stimulation par un agoniste de type DHT, le RA se dissocie des Hsp et transloque dans le noyau, se dimérise, et se lie aux éléments de réponse aux androgènes (AREs) qui sont présents en régions *cis*-régulatrices des gènes cibles^{51,52,53}.

Le RA a des actions génomiques modulées par des co-régulateurs (co-activateurs et co-répresseurs), mais des co-répresseurs peuvent avoir des effets positifs de transactivation du RA^{54,55,56,57,58}.

Le RA peut aussi avoir une signalisation non génomique qui ne nécessite pas sa translocation nucléaire^{59,60} et qui aboutit à l'activation de la voie des MAPK/ERK⁶¹, et de la voie de PI3K/AKT également dans les cellules épithéliales sensibles aux androgènes⁵⁹.



* : sites de modifications post-traductionnelles

Figure 9: Schéma de la structure du RA

On observe une conservation des séquences d'acides aminés et des trois régions fonctionnelles communes aux récepteurs nucléaires au cours de l'évolution, à savoir une région N-terminale de longueur variable (entre 0-550 aa) qui contient le domaine d'activation AF-1, un domaine de liaison à l'ADN (DBD) qui possède un motif répété en doigt de zinc, un domaine en épingle (HR) et le domaine de liaison au ligand, situé près de l'extrémité N-terminale.

IV.A. Les mécanismes moléculaires de l'indépendance hormonale

L'émergence de clones cellulaires résistants à la castration peut résulter de la sélection de cellules initialement résistantes ou provenir de la stimulation anormale de voies de signalisation alternes induites par l'exposition aux traitements.

Les mécanismes d'échappement à la déprivation androgénique décrits sont nombreux et peuvent être classés en deux groupes. Ils ont pour objectif de restaurer la fonctionnalité du RA ^{62,38,63}.

1. Le premier groupe de mécanismes d'échappement permet à la voie de signalisation du RA de rester fonctionnelle et active suite à:
 - a) Une augmentation de la concentration en DHT dans la tumeur par hyper-régulation positive de l'expression de l'enzyme alpha réductase, et aussi d'autres enzymes impliquées dans la conversion des androgènes surrénaliens en DHT ³⁷
 - b) Une amplification et/ou une hyper-expression du gène sauvage du RA ⁶⁴
 - c) Une altération de l'expression ou de la fonction des protéines co-activatrices ou co-répressives du RA ⁶⁵
 - d) La restauration de la fonctionnalité du RA par communication avec des voies alternes de signalisation de cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la survie cellulaire et la prolifération ^{66,63}. Ainsi, de nombreux facteurs de croissance tels que l'EGF, le FGF-9, le FGF, le KGF, l'IGF-1, le HGF, le TGF β , le NGF, l'IL-4 et l'IL-6 ont été décrits comme stimulant la croissance cellulaire en restaurant l'activité du RA selon un mode ligand-indépendant et d'une façon synergique, via un jeu de phosphorylations activatrices du RA (cf. Figure 10).

La voie de signalisation Wnt peut aussi soutenir la croissance cellulaire androgéno-indépendante via la formation de complexes RA/ β -caténine ⁶⁷.

Selon le contexte cellulaire, la promotion de la croissance cellulaire androgéno-indépendante par l'IL-6 implique des interactions complexes impliquant les JAK (Janus kinases), l'activation du facteur de transcription STAT3 (signal transducer and activator 3) se liant au RA, et les voies de MAPK ^{54,68}. Les cellules du cancer de la prostate expriment l'IL-6R et l'IL-6 agit comme un facteur autocrine et un facteur de survie dans les lignées cellulaires agressives androgéno-indépendantes DU-145 et PC-3. Par contre, les lignées androgéno-dépendantes

LNCaP ne sécrètent pas d'IL6. Alors qu'une courte exposition des LNCaP à l'IL-6 entraîne un blocage de la croissance cellulaire et une différenciation en parallèle de l'activation de la voie JAK/STAT3, l'exposition à long terme à l'IL-6 promeut la prolifération cellulaire via un mécanisme autocrine⁶⁹. Les LNCaP-IL6+ (après une exposition chronique à l'IL-6) auraient un avantage sélectif de croissance⁷⁰.

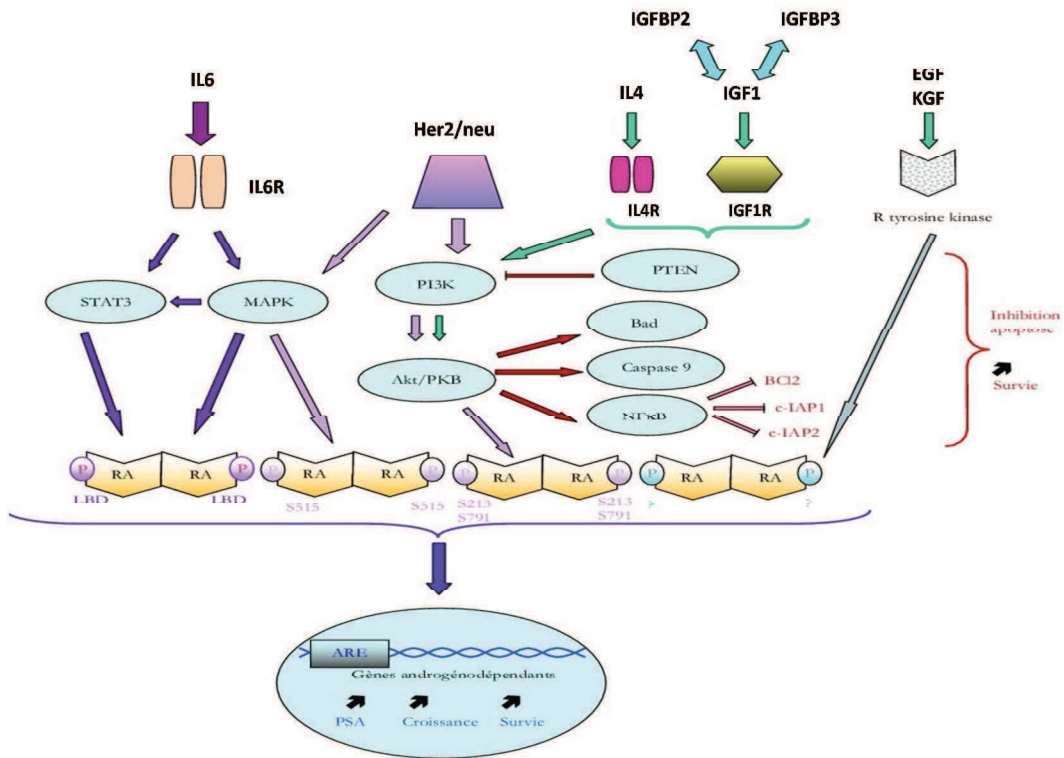


Figure 10 (à partir de Cabrespine et al. 2004): Schéma de certaines des voies alternes responsables d'une activation ligand-indépendante du RA.

Les mécanismes d'activation du RA ligand-indépendant impliquent les voies de MAPK et Akt, en réponse aux signaux extra-cellulaires médiés par des récepteurs membranaires.

2. Le second groupe de mécanismes d'échappement est représenté par les mutations du *RA*.

La fréquence des mutations du *RA* varie dans la littérature, allant de 0 à 44% pour les tumeurs localisées chez les patients non traités ^{71,72}, de 14 à 29% dans les échantillons de résections trans-urétrales de prostate de patients prétraités ⁷³ et de 10 à 36% dans les échantillons de localisations métastatiques ^{71,74}. Les mutations du *RA* sont respectivement plus fréquentes dans les localisations métastatiques et après échappement hormonal que dans la tumeur primitive au stade localisé et avant résistance à la castration, en faveur d'une acquisition mutationnelle par pression de sélection environnementale. Au sein de notre laboratoire, un test fonctionnel de levures a permis de mettre en évidence la présence de mutants du *RA* dans des échantillons tumoraux de cancer de la prostate ⁴⁰ et l'étude de ces variants selon leur répartition entre site primaire et site métastatique, ainsi que la caractérisation de leurs propriétés fonctionnelles font l'objet de travaux actuels.

IV.B. Les mutants du gène du récepteur des androgènes

Les variants mutés du *RA* dans le cancer de la prostate conduisent à un gain de fonction de la protéine, et plus de 70 substitutions de bases ont été décrites, survenant le plus souvent dans le NTD ou le LBD, au niveau de régions impliquées dans les interactions ligand-récepteur et protéines-récepteur.

Certaines mutations peuvent survenir de façon spontanée et résultent d'une instabilité génétique des cellules épithéliales cancéreuses ⁷⁵, mais la majorité des mutations sont acquises et c'est l'exposition aux anti-androgènes qui faciliterait la survenue de ces mutations du *RA* via l'induction d'un statut hyper mutationnel ⁷⁶. La fréquence élevée de ces mutants observée au stade métastatique est en faveur de cette hypothèse et peut aussi évoquer un rôle spécifique de ces mutants dans les phases avancées de la maladie dans la croissance tumorale ou l'acquisition d'un phénotype métastatique ⁷¹.

Environ un tiers des mutations ponctuelles surviennent dans le NTD, dont le domaine AF-1 interagit avec de nombreux co-régulateurs du *RA*.

Les mutations survenant dans le DBD ne sont pas fréquemment décrites dans le cancer de la prostate et leurs conséquences fonctionnelles rarement explorées.

Notre laboratoire a rapporté la coexistence d'une mutation p.Thr575Ala dans le DBD avec une mutation p.Thr877Ala dans le LBD sur les mêmes transcrits *RA* d'un mutant identifié dans une métastase osseuse d'un cancer de la prostate chez un patient déjà traité par de nombreuses lignes d'hormonothérapies. Ce double mutant du *RA* a ainsi acquis une modification de son affinité pour d'autres ligands et une modification de son activité transcriptionnelle sur des promoteurs indépendants du *RA* ⁷⁷. Nous avons également décrit un variant d'épissage, le RA23, à partir d'une métastase osseuse après échappement hormonal ⁷⁸, qui résulte d'un épissage aberrant entre les exons 2 et 3, avec rétention de 69 nucléotides de l'intron 2 et donc 23 acides aminés insérés en position 588 du DBD. Cette variation d'épissage a pour conséquence l'abolition complète de la liaison à l'ADN et la translocation nucléaire, favorisant ainsi un rôle cytoplasmique et empêchant des actions génomiques.

Les mutations situées dans la région HR du LBD affectent l'affinité pour le ligand et le recrutement de co-activateurs et ont pour conséquence fonctionnelle l'acquisition d'une

sensibilité du RA à d'autres hormones sexuelles comme les œstrogènes ou les progestatifs, les stéroïdes ou autres ligands exogènes.

IV.B.a. Origine et structure des variants constitutivement actifs du RA

Les RA tronqués dans le cancer de la prostate ont été décrits dans les xénotransplantes de tumeurs CWR22R résistantes à la castration et dans les lignées cellulaires dérivées CWR-R1 et 22Rv1^{79,80}. L'identification de RA tronqués dans les lignées 22Rv1 a conduit à l'identification de nouvelles origines à l'échappement hormonal via la capacité à être constitutivement actif par la perte de la région régulatrice LBD⁸⁰.

Les mutations situées dans le LBD sont à l'origine de RA tronqués avec perte du domaine C-terminal (cf. Figure 11). Ces mutants ont conservé leur activité de liaison à l'ADN et ont une activité transcriptionnelle constitutive ligand-indépendante, confirmant l'inhibition exprimée par AF-2 sur la transactivation intrinsèque d'AF-1 en l'absence de ligand.

Les mutations non-sens concernant les 5^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} exons (p.Trp741X, p.Trp796X ou p.Ser853X) et aboutissant à la troncature de la partie carboxy-terminale du LBD ont été identifiées dans le cancer de la prostate et leur caractérisation est en faveur d'une perte de leur activité transcriptionnelle^{71,74}. Cependant, d'autres études ont mis en évidence une activité de transactivation conservée pour ce type de mutants^{81,82}.

Notre laboratoire a identifié des mutations aboutissant à des codons stops prématurés dans le HR du RA, entre la fin du DBD et le début du LBD, dans des échantillons de cancer de la prostate (cf. Figure 11)^{2,3}. Dans l'analyse de 23 échantillons métastatiques osseux de cancer de la prostate, 6 avaient des cellules cancéreuses métastatiques prostatiques observées, et après réalisation du test fonctionnel de levures, 5 échantillons étaient associés à une croissance anormale des levures, conduisant à l'identification de plusieurs mutations non-sens responsables de RA tronqués en C-terminal dans 5 des 5 échantillons analysés³. Ces mutants du RA étaient isolés dans 8 des 44 échantillons (18%) de cancers localisés.

Le RAQ640X a une distribution exclusivement nucléaire, en présence ou absence du ligand naturel androgénique, avec une distribution sous forme de spots nucléaires dans les cellules de cancer de la prostate, alors que le RAWT (RA sauvage) activé par la DHT a une distribution nucléaire homogène. En raison de la perte de la région CTE, les complexes d'activation transcriptionnelle formés autour du RAQ640X dans les LNCaP diffèrent de ceux

formés autour du RAWT, et le co-activateur SRC-2 est absent des spots nucléaires formés par le RAQ640X, tandis que le CBP et TBP sont fortement présents et co-localisés avec ces spots de RAQ640X ⁷.

L'identification du double mutant RAQ640X/T877A dans une lésion métastatique osseuse d'un patient en progression tumorale après échappement à la castration, a pu mettre en évidence qu'une mutation non-sens conduisait à un RA tronqué constitutivement actif et pouvait être un mode d'échappement hormonal à la castration ^{2,3}.

La mutation T877A est connue pour être acquise par pression de sélection sous flutamide. Le changement de la glutamine en position 640 pour un codon stop résulte d'une mutation non-sens et avait déjà été décrite dans un syndrome d'insensibilité complète aux androgènes chez un patient 47,XXY ⁸³. La troncature prématurée de ce RA en position 640 qui est située dans la région en épingle à cheveux du RA juste après le DBD et le premier signal bipartite de localisation nucléaire (en position 605-638), peut conférer des capacités constitutives de transactivation. Ce RAQ640X est une protéine qui requiert une phosphorylation ⁸⁴, peut s'hétérodimériser ⁸⁵, même avec le RA sauvage, et transactiver l'expression de gènes. Ainsi, CBP et C-Jun sont recrutés par le RAQ640X pour activer les activités transcriptionnelles d'AP-1, NFAT et NF-κB, ce qui n'a pas été mis en évidence avec le RA sauvage et est donc en faveur d'un mécanisme contribuant à la résistance à la castration ⁸⁴. De même, l'action du sorafenib sur l'inhibition multi-kinase a conduit à l'inhibition de l'activation via phosphorylation du RA sauvage et du RAQ640X ⁸⁶.

D'autres mécanismes peuvent être à l'origine de variants constitutivement actifs, comme les variants d'épissage. Les variants d'épissage du RA ont d'abord été décrits il y a 20 ans chez un patient atteint de syndrome d'insensibilité aux androgènes ⁸⁷, puis dans des cas de cancers du sein ⁸⁸. Dans les deux cas, le variant d'épissage contenait une rétention de l'intron 3 et codait pour un RA qui n'avait pas de second doigt de zinc dans le DBD.

Puis la description d'un variant d'épissage dans le cancer de la prostate métastatique était celui d'une rétention de l'intron 2 qui code pour une séquence de 23 acides aminés entre les deux doigts de zinc du DBD ⁷⁸. Ce variant a été décrit comme surtout localisé dans le cytoplasme, mais pouvait transloquer dans le noyau et exercer une activité transcriptionnelle dans les LNCaP.

La plupart des modèles d'études des variants d'épissage du RA utilisent le modèle des lignées de 22Rv1 qui expriment un taux important de formes courtes du RA (protéolytiques) avec

différents poids moléculaires, et plusieurs descriptions de variants d'épissage ^{6,89,90}, dont l'ARV7 résultant d'une insertion de l'intron 3 qui est souvent rapportée comme prédominant ⁹⁰. Grâce à un test fonctionnel de levures ⁴⁰, 2 nouveaux variants ont été identifiés, par insertion de séquence intronique entre deux exons 3 dupliqués ou entre les exons 3 et 4 (cf. Figure 11) ⁴. Ces insertions conduisent à un codon stop prématuré et donc à un RA tronqué. D'autres variants ont été décrits dans des tissus tumoraux de cancers résistants à la castration ⁹¹.

La différence de niveau et de type d'expression de ces variants d'épissage entre les tissus tumoraux et les lignées cellulaires dont les 22Rv1, mettent en exergue l'importance du contexte cellulaire.

IV.B.b. Modifications post-traductionnelles du RA conduisant à des isoformes tronqués

Un des autres mécanismes décrits dans la génération de RA tronqués est la protéolyse des RA de taille normale par les calpaines, des protéinases calcium-dépendantes, qui peuvent avoir pour substrat la superfamille des récepteurs des hormones stéroïdes ^{92,93}. Ainsi, il a été décrit dans les lignées cellulaires CWR-1R, la diminution du taux de RA de faible poids moléculaire secondaire à l'administration d'inhibiteurs de la calpaine (la calpeptine ou siRNA ciblant la calpaine 2 ou inhibiteur de Erk qui active la calpaine) ⁹⁴, et dans les LNCaP, la génération de RA tronqués en C-terminal après administration de bortezomib (inhibiteur du protéasome) ⁹⁵ qui serait responsable de l'activation de la calpaine.

On a pu ainsi décrire des variations des taux de calpaine 2 au cours de l'évolution du cancer de la prostate, avec des taux faibles dans l'hypertrophie bénigne, élevés dans les cancers localisés et très élevés dans les lésions métastatiques ⁹⁶. Ainsi, la protéolyse des RA de pleine taille est un des mécanismes qui conduit à l'expression de formes tronquées du RA soutenant la résistance à la castration. Mais Il n'est pas évident de déterminer la contribution de ce mécanisme en pratique clinique.

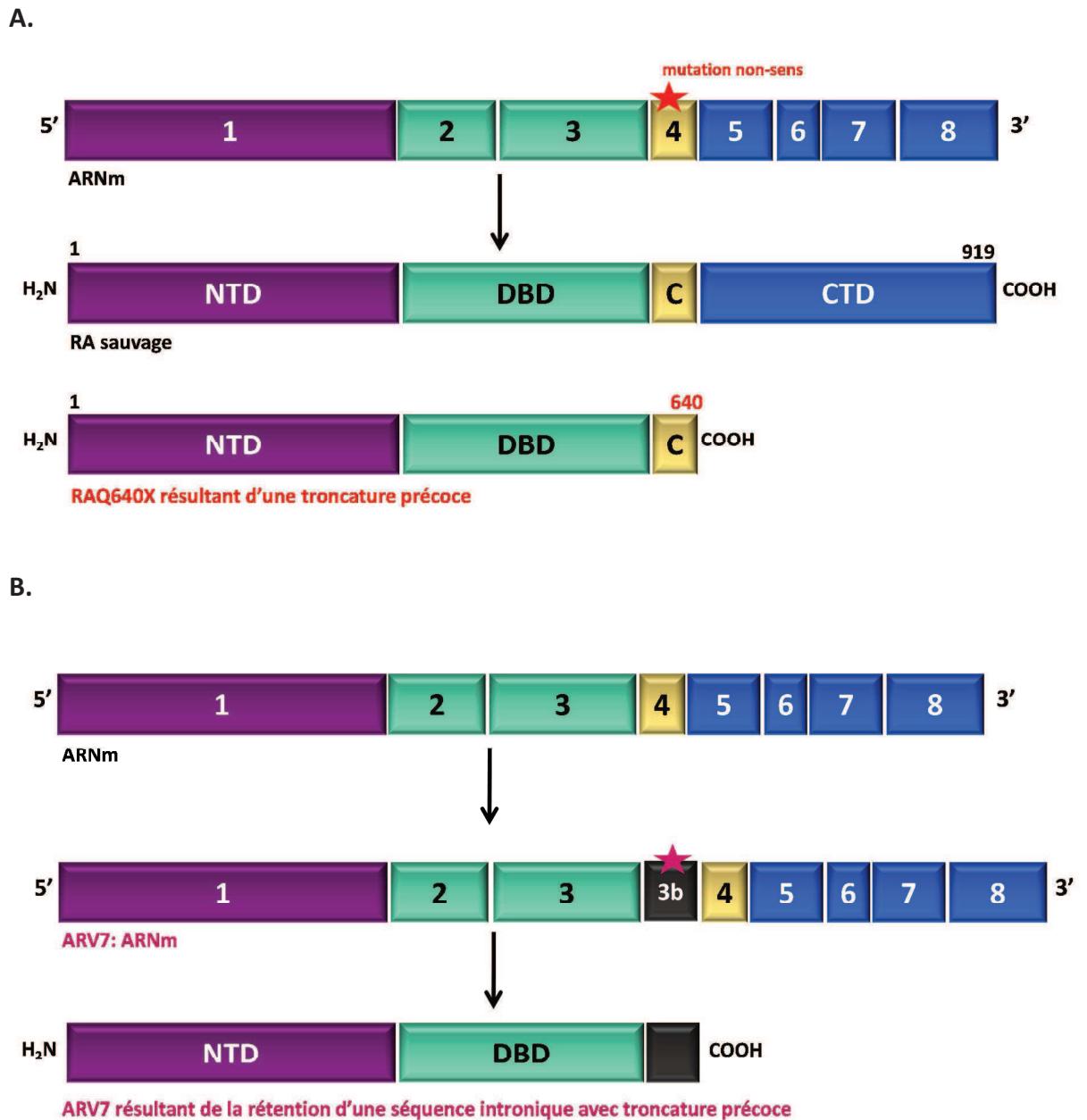


Figure 11: Schéma des mutants tronqués du RA résultant de mutations non-sens (A.) ou d'épissage alternatif (B.).

A. La survenue d'une mutation non-sens dans l'exon 4 du gène du RA conduit à un codon stop en position 640 et à un RAQ640X avec troncature précoce et perte du domaine C-terminal et du LBD. Le RA sauvage est présenté pour comparaison. **B.** La rétention d'une séquence intronique 3b –due à un épissage au niveau de l'exon cryptique– conduit à un codon stop et à un RA tronqué précocement, l'ARV7.

IV.C. Fonctions des variants constitutivement actifs du RA

Ces mutants résultant de mutations ponctuelles comme le RAQ640X ou d'épissage alternatif comme l'ARV7, ont des structures différentes mais des propriétés fonctionnelles acquises communes liées à la perte de l'extrémité C-terminale. Les fonctions acquises par ces variants permettent la transactivation androgène-indépendante⁶, et passe donc par une translocation nucléaire facilitée.

IV.C.a. Activité transcriptionnelle ligand-indépendante

Le RAQ640X et l'ARV7 ont des activités transcriptionnelles ligand-indépendantes constitutives, et comparées au RAWT activé par la DHT, ces activités sont très importantes vis-à-vis de promoteurs androgène-dépendants. Nous avons ainsi montré que l'expression du RAQ640X ou de l'ARV7 dans les LNCaP aboutit à l'augmentation des activités des facteurs de transcription AP-1 et NFAT (cf. Figure 12), suggérant l'existence de nouvelles connexions avec les voies de signalisation cellulaire permettant aux cellules d'échapper à la dépendance hormonale⁸⁴.

Le profil transcriptionnel du RAQ640X, même s'il peut se chevaucher avec celui du RA sauvage, contient certains gènes spécifiquement régulés par le RAQ640X, comme *RHOB* (Ras Homolog Family Member B). *RHOB* est une protéine impliquée dans la migration et les modifications morphologiques observées quand le RAQ640X est hyper-exprimé dans les LNCaP. Il en est de même pour l'ARV7, avec une cohorte de gènes bien différents de ceux décrits avec le RA sauvage⁹¹, comme des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

De façon intéressante, l'activité de l'ARV7 est régulée par la voie PTEN-AKT médiée par FOXO⁹⁷.

De plus, l'hyper-expression du RAQ640X conduit dans les LNCaP à une augmentation du taux de PSA par une augmentation de l'expression du RA endogène³.

IV.C.b. Localisation cellulaire et tissulaire tumorale prostatique

Au niveau cellulaire, l'expression ectopique d'ARV7 dans les LNCaP est responsable d'une résistance à la castration, et son expression est importante dans les tumeurs résistantes à la castration versus les tumeurs hormono-naïves ⁸⁹ et est aussi corrélée à la progression tumorale ⁹⁰.

Les études de Guo et Hu ^{89,90} ont rapporté que l'ARV7 se localise à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules en culture et des tissus tumoraux, et que la localisation nucléaire n'est pas dépendante de la présence du RA sauvage.

Au niveau tissulaire prostatique, l'expression de l'ARV7 a été observée dans les cellules basales prostatiques et stromales versus son absence dans les cellules épithéliales saines de prostate ⁸⁹.

IV.C.c. Signification clinique

La relation entre la présence de variants constitutivement actifs du RA et la rechute du cancer de la prostate a été étudiée, avec des résultats contradictoires sur la valeur prédictive de la rechute selon le taux circulants de mRNA d'ARV7 ⁹⁸.

Des taux d'expression des variants ARv567es, ARV7 et ARV1 ont été mis en évidence dans les lésions métastatiques osseuses ⁹⁹, en faveur du caractère acquis sous hormonothérapie de ces variants.

IV.C.d. En faveur de la progression tumorale prostatique

Notre laboratoire a également montré que l'expression du RAQ640X conduit à l'expression de marqueurs de la progression tumorale et de la transition épithélio-mésenchymateuse comme la N-Cadhérine, la vimentine, SNAIL et ZEB1 ⁸.

De façon encore plus surprenante, l'expression du RAQ640X dans les LNCaP aboutit à une stimulation paracrine (facteurs paracrines sécrétés non identifiés) responsable d'une translocation et activation du RA sauvage des cellules avoisinantes en l'absence de DHT ³, en faveur d'une communication inter-épithéliale entre les différents clones porteurs de RA sauvage/RA tronqués et favorisant la progression tumorale.

IV.C.e. Sensibilité aux nouvelles thérapeutiques

De façon non surprenante, l'ARV7 est réfractaire à l'enzalutamide, car n'a pas le LBD qui est nécessaire à l'activité de cet antagoniste du RA de nouvelle génération¹⁰⁰.

Notre laboratoire a largement étudié les propriétés fonctionnelles de ces variants tronqués en C-terminal, dont le RAQ640X (p.Gln640X) et l'ARV7, et nos données indiquent que ces mutants tronqués, non seulement participent à l'échappement hormonal, mais sont également liés à des propriétés fondamentales de la progression tumorale prostatique comme l'angiogenèse, l'invasion tumorale et la progression métastatique.

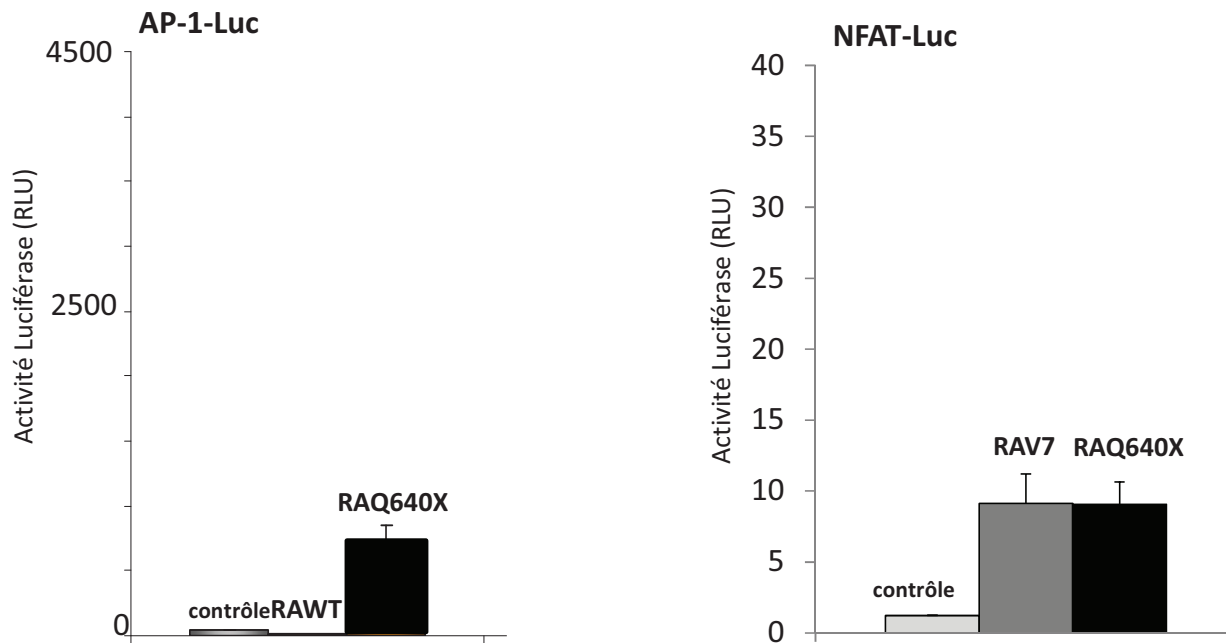


Figure 12: Augmentation de la transactivation des facteurs AP-1 et NFAT avec l'expression des variants tronqués autonomes RAQ640X ou RAV7.

Les LNCaP étaient transfectées, dans du milieu complet, pour les plasmides pE-RAWT ou pE-RAQ640X ou pE-RAV7 ou plasmide vide (contrôle) et pour les plasmides rapporteurs AP-1-Luc, NFAT-Luc et Renilla. La mesure de l'activité luciférase était réalisée 48 h après transfection.

Après avoir décrit l'importance des variants tronqués du RA dans l'échappement à la castration, nous présentons ci-après le microenvironnement tumoral afin d'introduire notre hypothèse d'étude autour du rôle d'une coopération épithélio-stromale « privilégiée » en présence de variants du récepteurs des androgènes.

V. Le microenvironnement tumoral

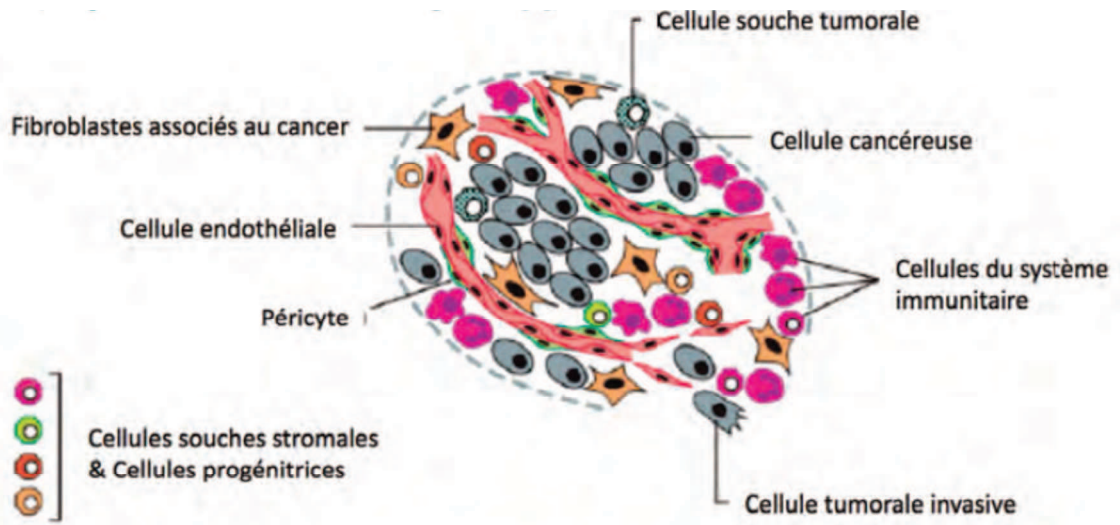
V.A. Les composants cellulaires du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement « normal » est un environnement complexe et dynamique, et est composé de fibroblastes, cellules vasculaires, cellules dendritiques, cellules du système immunitaire etc...) qui baignent dans la matrice extracellulaire elle-même composée d'acides hyaluroniques et protéoglycanes, de collagènes, de laminines et fibronectines. Tous ces éléments constitutifs du microenvironnement interagissent entre eux et avec les cellules épithéliales, via des contacts directs et/ou des facteurs solubles sécrétés.

Dans des conditions physiologiques, le microenvironnement joue un rôle de suppresseur de tumeur, mais aussi, à l'inverse, peut jouer un rôle pro-oncogénique. Les transformations cellulaires épithéliales jouent aussi un rôle sur le microenvironnement. Le microenvironnement tumoral est appelé « stroma tumoral » et est toujours constitué des mêmes types cellulaires, mais qui sont modifiés et qui ont acquis des propriétés particulières, notamment de sécrétion de facteurs solubles tels que les chemokines, le TFG β , les protéases et s'accompagnent d'une modification de la matrice extracellulaire avec une balance élevée des collagènes de type I, ténascine C et fibronectine.

Ainsi, il existe différents microenvironnements dans les tumeurs : la multiplicité des types cellulaires au sein du stroma tumoral crée une succession de microenvironnements tumoraux qui changent avec les capacités d'invasion de la tumeur dans le tissu sain (cf. Figure 13). L'abondance, l'organisation histologique et les caractéristiques phénotypiques des types cellulaires du stroma et de la matrice extracellulaire évoluent pendant la progression tumorale, permettant ainsi la croissance primaire, l'invasion puis la dissémination métastatique (cf. Figure 133) ¹⁰¹.

A.



B.

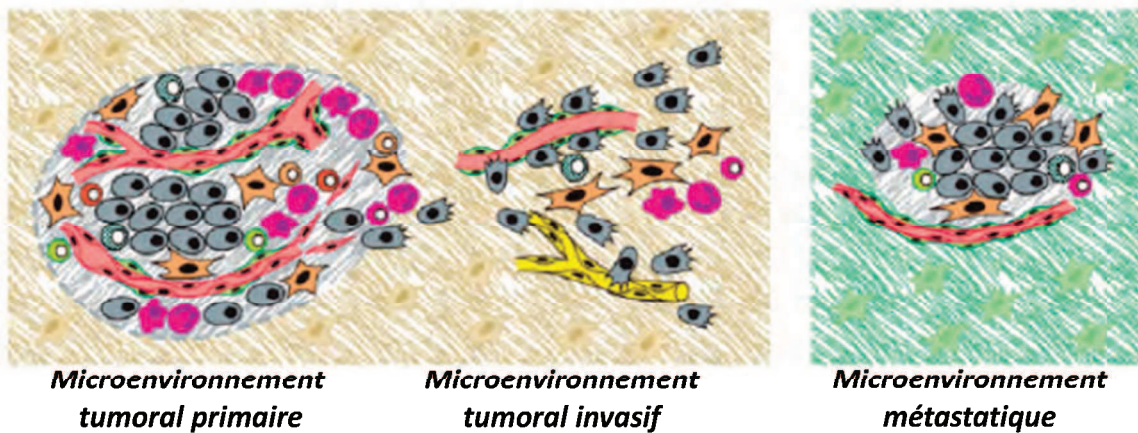


Figure 13 (à partir de Hanahan D and Weinberg R)

A. Les composantes cellulaires du microenvironnement tumoral. **B.** Le stroma tumoral évolue de façon dynamique dans ses composants et interactions au cours de la progression tumorale

V.B. Les CAFs (cancer-associated-fibroblasts)

Les cellules cancéreuses participent à la création d'un microenvironnement favorable en interagissant avec les cellules stromales et en déclenchant le « homing » d'une variété de cellules au site tumoral. Parmi ces cellules, les CAFs, qui ont à la fois une origine fibroblastique et sont issues de cellules stromales mésenchymateuses ¹⁰², sont des promoteurs de la carcinogénèse. L'équipe de Weinberg a démontré que les CAFs isolés des cancers du sein sécrètent différents types de chemokines dont CXCL12, qui en retour agissent sur les cellules épithéliales cancéreuses en favorisant leur prolifération, alors que les fibroblastes isolés à partir de régions non-cancéreuses du sein n'avaient qu'un rôle modeste sur la croissance tumorale ¹⁰³. Les CAFs favorisent la croissance tumorale via des stimulations directes de la prolifération des cellules cancéreuses et en augmentant l'angiogénèse via le recrutement de cellules endothéliales dans les carcinomes ¹⁰³.

Les fibroblastes sont largement identifiés dans les carcinomes, étant souvent le type cellulaire le plus représenté du stroma tumoral. Les CAFs représentent au moins deux types cellulaires distincts :

1. Les cellules avec des caractéristiques fibroblastiques et qui créent des fondations structurelles pour soutenir la plupart des tissus épithéliaux normaux.

2. Les myofibroblastes dont les rôles biologiques et les propriétés sont très différents. Les myofibroblastes sont identifiables par leur expression de l' α -actine muscle lisse (SMA), et augmentent transitoirement en abondance dans les blessures et les sites d'inflammations chroniques, comme décrits dans les lésions cicatricielles de type fibrose chronique pulmonaire, hépatique ou rénale.

Les deux types cellulaires ont été décrits, dans des modèles *in vivo*, comme contribuant à la cancérologénèse, notamment la prolifération cellulaire, l'angiogénèse, l'invasion et les métastases ^{104, 105}.

Les CAFs via leur fonction sécrétrice d'une variété de composants de la matrice, sont impliqués dans la formation du stroma desmoplasique qui caractérise les carcinomes avancés, mais les relations entre les cellules épithéliales et les CAFs qui contribuent à la pathogénèse tumorale sont à étudier.

V.C. La communication épithélio-stromale

Les facteurs permettant la progression tumorale cancéreuse, et notamment prostatique, sont multiples et différents. Au-delà des facteurs liés aux dysfonctions ou aux propriétés acquises ou portées par les cellules épithéliales, le microenvironnement tumoral joue un rôle régulateur dans la croissance, la progression, l'invasion tumorale, soit par le biais de liaisons directes, soit par des facteurs solubles sécrétés par les cellules du microenvironnement, responsables d'action paracrine et de boucle d'activation (cf. Figure 14).

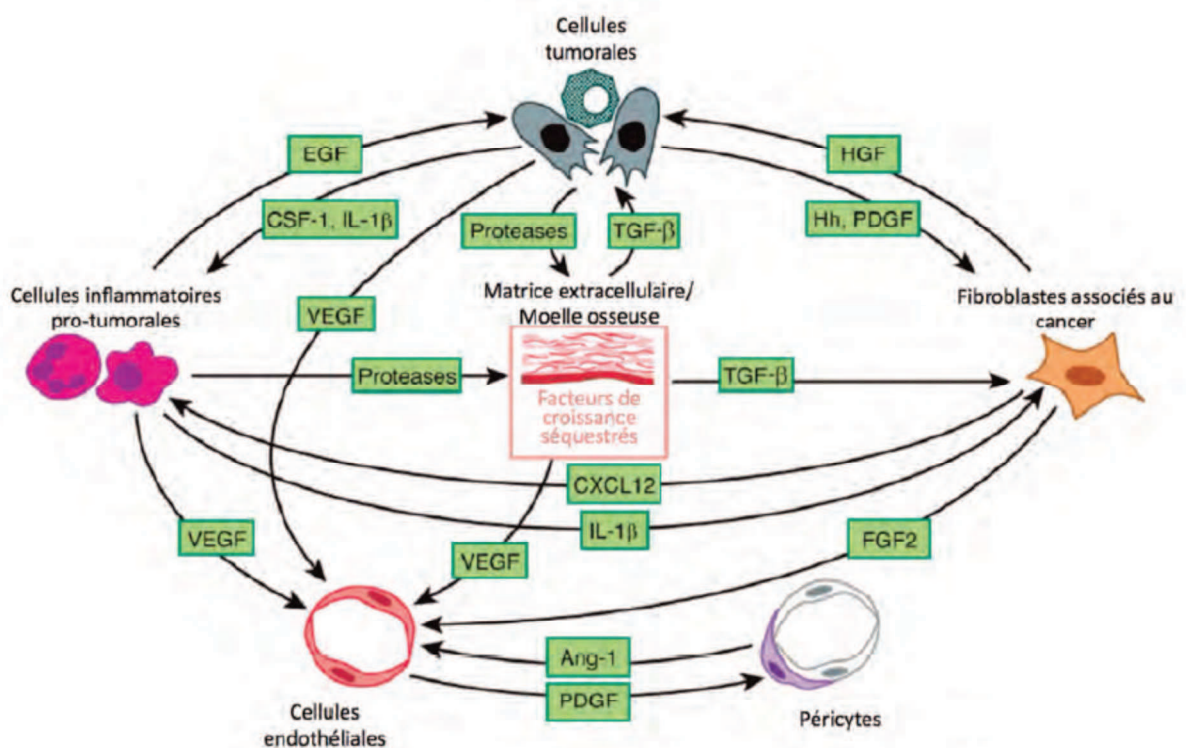


Figure 14 (à partir de Hanahan D and Weinberg R)

Exemples d'interactions réciproques entre les différentes composantes cellulaires du stroma tumoral et des cellules tumorales au cours de la progression tumorale.

La communication entre les cellules épithéliales tumorales et les cellules du stroma tumoral est impliquée dans la capacité à promouvoir une croissance tumorale invasive et une dissémination métastatique^{106,107,108}. Des signaux issus du stroma tumoral peuvent impacter les cellules carcinomateuses et agir sur leurs capacités tumorales, comme la sécrétion de CCL5/RANTES par les cellules souches mésenchymateuses du stroma tumoral en réponse aux cellules tumorales, avec l'action de CCL5 sur les cellules épithéliales cancéreuses pour stimuler l'invasion tumorale¹⁰⁹. Par exemple, à la périphérie de la tumeur, les macrophages du stroma peuvent favoriser l'invasion locale en sécrétant des métalloprotéases et des cathepsines, sous l'action de l'IL-4 produites par les cellules épithéliales cancéreuses¹¹⁰ ou via des boucles paracrines entre les macrophages associés à la tumeur et les cellules épithéliales¹⁰⁷.

Ces exemples sous-tendent que les phénotypes de malignité de haut grade n'apparaissent pas strictement d'une façon autonome et isolée, et que leur manifestation ne peut être appréhendée uniquement par l'analyse du génome des cellules épithéliales tumorales.

Mais comment se tient cette communication épithélio-stromale dans le processus dynamique oncogénique, dans le passage aux différentes étapes d'invasion/progression ?

La fonction du stroma tumoral dans la progression tumorale peut se concevoir comme l'activation réactionnelle des fibroblastes à la présence de cellules carcinomateuses, générant une différenciation myofibroblastique, associée à l'activation de métallo-protéases (MMPs), la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et de facteurs de croissance. Mais il peut également être considéré comme le partenaire d'une communication paracrine épithélio-stromale, afin de promouvoir la prolifération cellulaire, et acquérir ainsi l'expression de marqueurs tumoraux « tissu-spécifiques ».

V.D. Les Chemokines

Parmi les facteurs sécrétés médiateurs de la carcinogenèse, les chemokines sont de plus en plus étudiées dans la progression du cancer de la prostate¹¹¹. Les chemokines sont membres d'une superfamille de cytokines chimiotactiques (environ 45 chez l'homme), initialement décrites et caractérisées en raison de leur association aux réponses inflammatoires et de leur stimulation du chimiotactisme leucocytaire pendant

l'inflammation. Durant les différentes phases du cancer de la prostate, l'expression des chemokines (CXCL8, CXCL12 et CXCL2) et de leurs récepteurs est décrite non seulement au niveau des cellules épithéliales prostatiques, mais aussi des cellules stromales telles que les CAFs, les cellules endothéliales ou les cellules infiltrantes (macrophages, lymphocytes) (cf. Figure 15)^{112, 113}. CXCL8 a été étudiée dans l'échappement hormonal, avec un rôle potentiel dans l'expression et l'activité du RA permettant la croissance des lignées cellulaires de façon androgène-indépendante¹¹⁴.

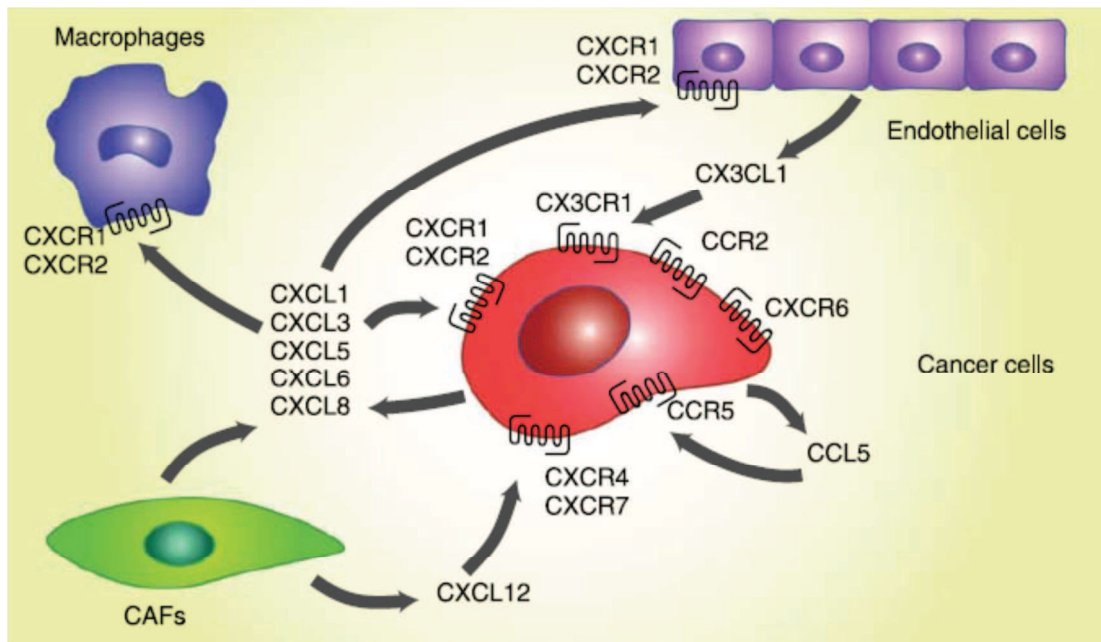


Figure 15 (à partir de Vindrieux D): Les chemokines dans le cancer de la prostate.

Les cellules épithéliales tumorales prostatiques expriment des chemokines et les récepteurs des chemokines. Ces chemokines interagissent avec les CAFs et les cellules endothéliales. La production de chemokines par les cellules tumorales et les cellules stromales aboutit à l'infiltration leucocytaire, dont le recrutement de macrophages.

V.E. Le stroma tumoral dans le cancer de la prostate

Dans la prostate saine, la couche épithéliale glandulaire est séparée structurellement du stroma environnant par une membrane basale laminaire.

Dans le cancer de la prostate, les cellules épithéliales cancéreuses infiltrantes forment des contacts directs avec les cellules stromales, et comprendre les mécanismes d'interactions épithélio-stromales est une priorité pour comprendre la progression tumorale prostatique.

V.E.a. Le stroma tumoral prostatique est réactif

La présence d'un stroma tumoral réactif est bien décrite dans des cancers tels que le cancer du sein où les cellules myofibroblastiques sont communément observées dans le stroma sain. Mais dans la prostate, le stroma sain est fibromusculaire, et les changements ou modifications comparables à l'initiation de l'expression de l' α -actine muscle lisse est de fait moins apparente.

En dépit de ces limites, le stroma humain prostatique a été montré comme activé dans la réponse à la progression cancéreuse, résultant en la formation d'un stroma réactif dont la présence et la nature ont une valeur pronostique^{115, 116}. Ainsi, le stroma tumoral réactif dans le cancer de la prostate a été identifié comme facteur prédictif de rechute biologique et est associé à la mortalité spécifique indépendamment des autres facteurs clinico-biologiques^{117, 118, 119}.

L'analyse transcriptomique du stroma tumoral réactif découpé à partir de 6 échantillons d'adénocarcinomes prostatiques avec un score de Gleason ≥ 7 , de stade pN0, a été comparée au profil d'expression du stroma sain prostatique. Cette analyse a identifié des gènes de la voie Wnt et des facteurs de transcription dont *NKX3-1*¹²⁰. Une autre analyse transcriptomique du stroma tumoral réactif dans 17 échantillons tumoraux versus le stroma sain, a mis en évidence une hyper-régulation de 544 gènes et une hypo-régulation de 606 gènes, avec des modifications dans les processus de neurogenèse, axogenèse, les voies de réparation de l'ADN et l'augmentation des profils d'expression des cellules souches¹²¹.

Dans des modèles de xénogreffes issues de LNCaP et de cellules stromales, les gènes *C-KIT*, *Bmi1*, *Gli2* et *COMP* ont été mis en évidence comme hyper-exprimés dans les cellules stromales et responsables de la progression épithéliale tumorale prostatique¹²².

V.E.b. Un rôle dans l'échappement à la déprivation androgénique

Le tissu stromal péri-tumoral prostatique a déjà été incriminé dans la progression tumorale métastatique et l'échappement hormonal ¹²³.

Dans un modèle de LNCaP en co-culture avec des cellules stromales de type myofibroblastiques, les LNCaP peuvent survivre à la déprivation androgénique ¹²⁴ et des modifications génomiques et de l'expression protéique étaient observées à la fois dans les LNCaP et les cellules stromales ¹²⁵. Ceci illustre à la fois le rôle dans l'androgène-indépendance des cellules stromales et les conséquences pour les deux types cellulaires de l'interaction épithélio-stromale, avec même une description de « fusion LNCaP-cellules stromales » contribuant à la progression tumorale androgène-indépendante ¹²⁶.

Une activation ligand-indépendante du RA, via la sécrétion de facteurs solubles par le stroma (IL6, FGF, VEGF, TGFβ...) interagissant via leurs récepteurs spécifiques situés sur la membrane épithéliale constitue l'hypothèse la plus courante d'implication du stroma tumoral dans l'échappement à la déprivation androgénique ¹²⁷. Notamment, la phosphorylation activatrice du RA en sérine 81 par l'activation de la voie de MAPK, en présence de milieu de culture conditionné par des fibroblastes prostatiques, a été mise en évidence ¹²⁸. Cependant, la compréhension des mécanismes et relations entre les protéines adaptatrices de ces voies intracellulaires et le RA n'est pas complètement élucidée ¹¹. Les protéines intracellulaires sont responsables du relais de signalisation des MAPK au complexe transcriptionnel du RA. La transduction du signal se fait à partir du microenvironnement, dont la sécrétion de facteurs de croissance, active le domaine SH2 des protéines adaptatrices via les récepteurs aux facteurs de croissance ou à tyrosine kinase. Ceci en retour permet le recrutement de protéines adaptatrices intracellulaires comme CRKL pour interagir avec les motifs tyrosine phosphorylés ou régions riches en proline des protéines cibles comme le RA. Le domaine SH3 des protéines adaptatrices est alors supposé médier les interactions protéines-protéines pour l'activité transcriptionnelle du RA. Ainsi, les protéines adaptatrices sont supposées responsables des événements intracellulaires qui font le lien directement entre le RA et le stroma tumoral pour permettre l'activité transcriptionnelle et maintenir la croissance et la survie des cellules épithéliales tumorales ¹¹.

Ainsi, un des mécanismes d'activation du RA lors de l'échappement hormonal, proviendrait de la stimulation par le microenvironnement stromal péri-tumoral. Des facteurs

de croissance sécrétés par le stroma interagiraient avec la membrane épithéliale prostatique, activant des éléments des voies de signalisation intracellulaires, qui pourraient soit activer le RA directement par phosphorylations, soit augmenter son expression transcriptionnelle.

V.E.c. Importance de l'effet du stroma tumoral selon le sous-type de cellules stromales

En dépit de l'importance évidente des cellules stromales dans le développement de la prostate, sa fonction et sa pathogenèse tumorale, la compréhension des programmes transcriptionnels spécifiques à ces cellules selon leur sous-type et le niveau pathologique fait défaut. Bien que les cellules stromales prostatiques venant d'origines histologiques et pathologiques différentes aient en commun des paramètres phénotypiques tels que leur morphologie, leur temps de doublement, la distribution dans le cycle cellulaire, la réponse aux génotoxiques et aux agents chimiques, ils diffèrent dans certains aspects, comme leur capacité d'ancrage dans une matrice (les CAFs sont supérieurs aux fibroblastes de la prostate normale ¹²⁹), leur capacité à induire une croissance tumorale agressive dans des modèles de xénogreffes (les CAFs sont supérieurs aux cellules stromales d'hyperplasie bénigne de la prostate ¹³⁰) et l'expression de certains facteurs comme le TGFβ1 qui est exprimé à des taux importants dans les CAFs versus très peu dans les cellules stromales prostatique saines ¹²⁹.

Ainsi, en étudiant par cDNA array les profils transcriptomiques de cellules stromales issues de différentes zones prostatiques chez 18 patients adultes : zone de transition normale (TZ), zone de périphérie normale (PZ), hyperplasie bénigne de la prostate (BPH) et cancer de la prostate (CA), Zhao et al ont pu mettre en évidence des profils transcriptionnels différents entre la BPH et le CA ¹³¹.

Les CAFs ont été étudiés dans la genèse du cancer de la prostate, dans la phase d'initiation tumorale à partir de l'hypertrophie bénigne de la prostate (lignées cellulaires et xénogreffes sous capsulaires rénales). Les CAFs expriment des taux élevés de TGFβ1 et de CXCL12, induisant en réponse l'augmentation de l'expression de CXCR4 au niveau des cellules épithéliales, élément qui permet la tumorigenèse des cellules en réponse aux CAFs et induit l'activation d'AKT dans les cellules épithéliales tumorales ¹³².

Les CAFs ont également été décrits comme engendrant une transition épithélio-mésenchymateuse des lignées cellulaires de type PC3 via l'activation de la voie COX2-HIF1α/NFκB et la down-régulation des miRNA205 ¹³³. Ainsi est supposé comme mécanisme que les CAFs sécrètent des métalloprotéases (MMP2 et MMP9) qui activent la transition

épithélio-mésenchymateuse dans les PC3 en favorisant la voie pro-inflammatoire COX-2. Les radicaux libres produits par l'activité de COX-2 favorisent la stabilisation de HIF-1 α qui en retour induit la répression transcriptionnelle de miR-205. La down-régulation des miRNA induit la dépression de ses cibles ZEB1/2 et PKC ϵ , permettant en conséquence et respectivement la transition épithélio-mésenchymateuse et la sécrétion d'IL-6 par les PC3, alimentant donc une boucle positive vers les CAFs ¹³³.

V.E.d. L'interleukine-6 est sécrétée par le stroma tumoral prostatique

L'expression et les fonctions des cytokines pro-inflammatoires ont été étudiées dans le cancer de la prostate en raison de leur rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de la migration de l'invasion et de l'angiogenèse ¹³⁴, et parmi ces cytokines, l'IL-6 a été étudiée dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate ^{69,135,136,137}.

Des taux élevés d'IL-6 chez les hommes avec un cancer de la prostate au stade local et localement avancé ont fait de l'IL-6 un potentiel biomarqueur du développement du cancer de la prostate et de la progression tumorale, en mesurant les taux plasmatiques d'IL-6 et sIL-6R ¹³⁸, et les taux d'IL-6 ont été étudiés dans différents stades de la maladie cancéreuse prostatique ^{137,139}, et même corrélés à l'élévation du score de Gleason >6 ¹⁴⁰. Mais l'IL-6 est aussi élevée dans le plasma des patientes obèses, en cas d'inflammation et d'infection, et n'est donc pas spécifique.

Dans les lignées cellulaires prostatiques, l'expression d'IL-6 en IHC était identifiée dans les couches basales épithéliales des hypertrophies bénignes, mais par contre gp130 était uniquement situé dans les cellules stromales ¹⁴¹, et seules les cellules stromales en culture sécrétaient de l'IL-6 ¹³⁶. Dans le cancer de la prostate, gp130 était identifié dans le stroma et l'épithélium et son expression augmentait avec le score de Gleason ¹⁴¹. De plus, toutes les lignées cellulaires cancéreuses (LNCaP, DU145 et PC3) ont été décrites comme exprimant de l'IL-6 et ses récepteurs ^{142,143}.

L'IL-6, cytokine pléiotropique, est impliquée dans la régulation de la physiologie prostatique et dans le cancer de la prostate, au niveau de son initiation et de sa progression. L'IL-6 agit comme un stimulateur paracrine et autocrine au niveau des cellules prostatiques saines et tumorales.

V.F. La voie de l'interleukine-6 dans le cancer de la prostate

V.F.a. La voie de l'interleukine-6

L'IL-6 est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires, dont la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse, la différenciation, et la régulation de la réponse immunitaire⁶⁹.

Cette protéine est une cytokine pléiotropique synthétisée par différents types cellulaires, comme les cellules B et T, les macrophages, les monocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et mésothéliales, les kératinocytes, les cellules mastocytaires, les cellules stromales, des cellules nerveuses et des cellules cancéreuses¹⁴⁴, et parfois par les adipocytes¹⁴⁵.

L'activité biologique de l'IL-6 est initiée quand la cytokine se lie au complexe récepteur, qui est constitué de (cf.

Figure 16) :

- a) une partie de 80 kDa. Cette sous-unité α -récepteur de non signalisation, IL-6R ou gp80, qui est uniquement exprimée par les hépatocytes, les neutrophiles, les monocytes/macrophages et quelques lymphocytes,
- b) et deux composés de transduction du signal de 130kDa ou gp130 dont l'expression est ubiquitaire¹⁴⁶.

La dimérisation d'IL-6/IL-6R/gp130 aboutit à l'initiation de la signalisation intracellulaire, via JAK-STAT (Janus Kinase et Signal Transducer and Activator of Transcription), MAPK et PI3K/Akt¹⁴⁷, aboutissant à l'expression de différents gènes impliqués dans l'inflammation et le développement tumoral.

Ce mécanisme est la voie de signalisation classique¹⁴⁸. Quand l'IL-6 se lie à son récepteur, STAT3 est activé de façon JAK dépendante qui aboutit notamment à une augmentation de l'expression de RANKL.

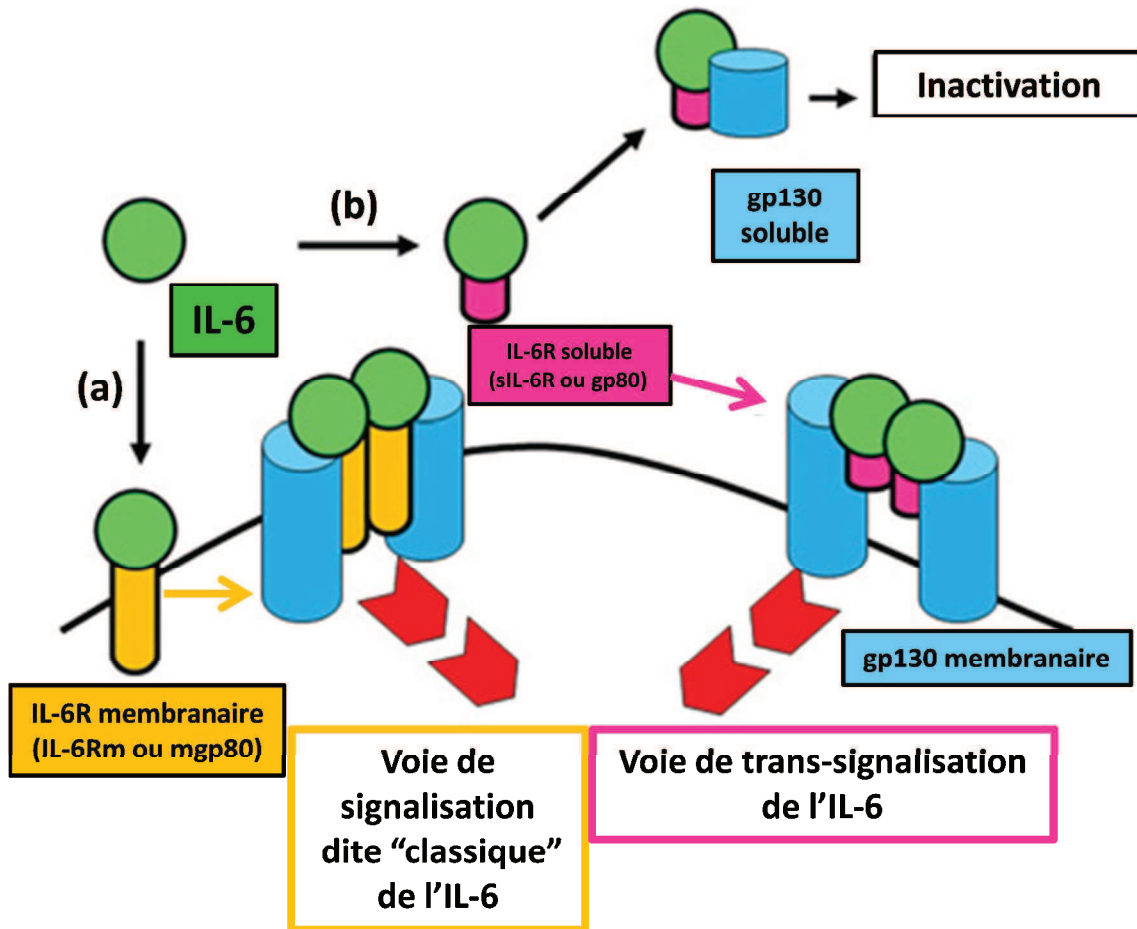


Figure 16: Système d'activation des voies de l'IL-6.

L'IL-6 se lie à gp80-membranaire (IL-6Rm) puis s'hétérodimérise avec gp130 pour former le complexe fonctionnel IL-6/gp80/gp130 (a). Mais l'IL-6 peut aussi se lier à la portion soluble de gp80 (sIL-6R, portion soluble qui a perdu la partie intracytoplasmique de gp80m soit par clivage enzymatique de gp80m soit par épissage alternatif), et se lier à gp130 pour former un autre complexe IL-6/sgp80/gp130 et permettre la transduction du signal (b). La portion soluble de gp130, sgp130, a un rôle de régulateur négatif de la transmission du signal par ce complexe IL-6/sIL-6R/gp130 en se liant à IL-6/sIL-6R et en empêchant sa liaison à mgp130.

L'IL-6 peut aussi activer AKT via l'activité de PI3K elle-même dépendante de l'augmentation de JAK et aboutir à une signalisation favorisant la survie cellulaire et l'anti-apoptose.

De façon concomitante, l'augmentation de l'activité de MAPK sous l'activation de JAK peut aboutir à une hyper-régulation de la croissance cellulaire, la prolifération et la mitose ¹⁴⁹.

Certaines cellules expriment des taux très faibles de récepteur transmembranaire à l'IL-6, et alors l'IL-6 se lie à une forme soluble de l'IL-6R, le sIL-6R. Dans ce cas, grâce à un procédé appelé la trans-signalisation, le complexe IL-6/sIL-6R se lie à gp130 et les voies de signalisation intracellulaire sont activées (cf.

Figure 16) ^{148,149}. Comme sIL-6R n'a pas de domaine transmembranaire, les voies de signalisation intracellulaire sont différentes, bien que la trans-signalisation de l'IL-6 aboutisse aussi à la phosphorylation et à l'activation de STAT3, AKT et MAPK.

Chez les humains, sIL-6R peut être généré par clivage protéolytique (90%) du récepteur transmembranaire, médié par des métalloprotéases comme les désintégrines et les métalloprotéases 10 et 17 ¹⁵⁰ ou par épissage alternatif (10%) ¹⁵¹.

Une forme soluble de gp130 est présente (sgp130) dans le sérum des sujets sains ¹⁵². Il a été décrit que l'IL-6 seul n'interagissait pas avec sgp130 ¹⁵³. Ainsi, la signalisation via l'élément de membrane IL-6R n'est pas inhibée par sgp130 (cf.

Figure 16) ¹⁵³. Il a donc été supposé que le sgp130 endogène pouvait être un antagoniste naturel du complexe IL-6/sIL-6R *in vivo*, probablement pour prévenir la trans-signalisation systémique de l'IL-6 dans les maladies inflammatoires chroniques ¹⁵³, et donc sgp130 est en compétition avec le complexe sans interférer avec la voie classique de l'IL-6.

La voie de l'IL-6 peut être impliquée dans la progression tumorale et l'androgéno-indépendance.

L'action de l'IL-6 a été décrite comme inducteur paracrine de croissance sur les LNCaP ^{154,142,155} et inducteur autocrine sur les lignées DU145 et PC3, résistantes à la castration ^{156,157}, mais également paracrine ¹⁵⁸. Mais les effets de l'IL-6 sur les LNCaP restent controversés, avec des descriptions d'effets pro-proliférant ^{156,155} et inhibiteur ¹⁵⁷, laissant suggérer que l'IL-6 peut avoir des fonctions différentes sur les LNCaP selon leur caractéristiques phénotypiques.

V.F.b. Les voies de l'interleukine-6 et du récepteur des androgènes

Au cours des traitements déprivateurs en androgènes, le RA peut être activé par des cytokines et des facteurs de croissance, comme le KGF, l'EGF, l'IGF-1 et l'IL-6^{54,44,159}, favorisant le développement et la croissance du cancer de la prostate hormono-résistant.

L'IL-6 provoque l'activation du RA qui est alors environ à 50% de son activité maximale (induite par les androgènes), et à des faibles concentrations d'androgènes, les androgènes sont potentialisés par l'IL-6 conduisant à une activation synergique du RA⁶². La voie de l'IL-6 active le RA via un mécanisme qui est dépendant des MAPK et de la voie STAT3 dans les cellules épithéliales tumorales prostatiques, en condition de déprivation androgénique, aboutissant ainsi à une hyper-régulation de l'expression des gènes cibles du RA comme le PSA^{160,11}.

Dans les LNCaP et les DU-145, l'IL-6 active le RA d'une façon ligand-indépendante⁴³, et une longue stimulation des LNCaP par l'IL-6 conduit à une augmentation de l'expression et de l'activité du RA^{161,43}. L'hyper-expression d'IL-6 protège les LNCaP de l'apoptose induite par la castration⁶², en faveur d'un rôle de l'IL-6 dans la maintenance et la différenciation des cellules épithéliales tumorales prostatiques. L'IL-6 produite par les LNCaP de manière autocrine (après transfection stable des LNCaP avec de l'IL-6) peut avoir un rôle suppresseur sur la croissance tumorale et permettre l'acquisition d'un phénotype androgène-indépendant dans des conditions de déprivation androgénique¹⁶².

Les effets de l'activation du RA par l'IL-6 impliquent de multiples voies de signalisation comme STAT3, PI3K, MAPK^{43,161}. Dans les LNCaP, la voie JAK-STAT est impliquée dans l'activation du RA par l'IL-6¹⁶³, avec un détail important qui est le nombre de passages des LNCaP influant sur la compréhension des effets de l'IL-6 sur la voie du RA¹⁶⁴. Par ailleurs, l'inhibition de STAT3 a été décrite comme entraînant une suppression de la progression tumorale¹⁶⁵ et une diminution de l'expression de gènes cibles de STAT3 comme *VEGF*, *Bcl-X* et *cycline D1*, aboutissant à l'apoptose¹⁶⁶. Des xélogreffes tumorales à partir de lignées LNCaP-IL-6+, PC3 et LuCaP35 avaient une croissance diminuée après traitement par un anticorps monoclonal anti-IL-6 (CNTO 328)^{167,168,169}.

Ainsi, la voie de l'IL-6 semble être un régulateur clé dans le développement du cancer de la prostate et la progression tumorale via la voie du RA¹⁷⁰, et peut être envisagée comme une cible thérapeutique potentielle dans le cancer de la prostate hormono-résistant¹⁷¹. C'est

pourquoi cibler la voie de l'IL-6 a été évalué dans des essais cliniques de phase I/II ^{169,172} avec une efficacité modeste soulignant l'importance de mieux sélectionner les patients qui pourraient bénéficier d'une thérapeutique inhibant l'IL-6.

V.F.b.i Rôle potentiel dans les lignées cellulaires épithéliales exprimant le RAQ640X

Notre émettons l'hypothèse d'une coopération épithélio-stromale « privilégiée » impliquant les variants constitutivement actifs du RA et le stroma prostatique, existante à un stade précoce de l'histoire naturelle de la maladie. Cette coopération épithélio-stromale privilégiée serait responsable d'un phénotype tumoral plus agressif et impacterait la progression tumorale prostatique.

Matériel et Méthodes

VI. MATERIEL ET METHODES

VI.A. Lignées et cultures cellulaires

VI.A.a. Lignées cellulaires épithéliales

VI.A.a.i LNCaP et C4-2b

Nous avons utilisé des lignées cellulaires androgéno-dépendantes de type LNCaP des passages P6 à P15 (clone FCG, ECACC, Salisbury, UK) et de type C4-2b de P16 à P26 (ViroMed Laboratories, Minnetonka, MN, USA). Les cellules LNCaP dérivent de métastases ganglionnaires d'un adénocarcinome prostatique humain. C'est un modèle d'étude de CaP humain à un stade précoce, avec un minimum de potentiel métastatique¹⁷³. Les cellules C4-2B dérivent de LNCaP injectées conjointement avec des cellules mésenchymateuses osseuses humaines à des souris, et qui ont donné des cellules tumorales métastatiques osseuses (ViroMed Laboratories, Minnetonka, MN, USA). Ce sont des cellules épithéliales tumorales prostatiques qui expriment le PSA, mais aussi des marqueurs de différenciation osseuse.

Le RA des LNCaP comporte une mutation originelle dans son site de liaison au ligand, qui résulte de la substitution d'une thréonine en alanine en position 877 (T877A)^{174,175}. Ce RA, dit « endogène », présente une haute affinité pour la testostérone et la DHT, ainsi que pour d'autres stéroïdes (œstrogènes, progestérone), et des anti-androgènes tel que le flutamide. C'est un modèle cellulaire de cancer de la prostate adapté pour étudier la réponse cellulaire à une stimulation hormonale et les mécanismes d'échappement hormonal.

Les cellules LNCaP et C4-2b sontensemencées dans du milieu complet RPMI 1640 supplémenté de 10% de SVF décomplémenté, 2mM de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline, 100mg/ml de streptomycine (Sigma-Aldrich, France), 10mM de tampon HEPES pH 7.3 et 1mM de pyruvate de sodium (Invitrogen, Fisher Scientific, France).

Pour activer le RA endogène, les cellules LNCaP et les C4-2b sont incubées dans le milieu décrit ci-dessus auquel est rajouté 10nM de DHT, pendant les 24h de transfection, puis toute la durée des changements de milieu, avec un changement toutes les quarante-huit heures.

VI.A.b. Lignées cellulaires stromales prostatiques

Les cellules stromales prostatiques PrSC dérivent de cellules humaines stromales prostatiques saines (Lonza, Levallois Perret, France), utilisées aux passages P3 à P4, etensemencées dans du milieu SCBM (stromal cell basal medium, CC-3204, Clonetics) additionné de SCGM® SingleQuots (CC-3205, Clonetics) composé de FBS, hFGF-B, insuline, gentamicine/amphotéricine et autres suppléments selon les instructions du fournisseur (Lonza, Levallois Perret, France). Quarante-huit heures après ensemencement, le milieu SCGM® est remplacé par du milieu de culture cellulaire pour lignées épithéliales, soit du RPMI-1640 supplémenté de 5% de SVF décomplémenté, afin de constituer un milieu de culture conditionné par les PrSC, que nous appellerons par la suite CMPrSC (*conditionned medium from PrSC*). Après 48h d'incubation, le CMPrSC est récupéré, centrifugé à 1700tr/min pendant 7min et conservé à -20°C.

VI.B. Milieu conditionné par les PrSC (CMPrSC)

Le CMPrSC est donc du milieu de culture cellulaire épithélial, composé de milieu complet RPMI-1640 +5% de SVF décomplémenté, qui a été mis au contact des PrSC pendant 48h. Nous supposons donc que le CMPrSC contient toutes les cytokines et les facteurs de croissance sécrétés par les PrSC. Le milieu de contrôle (CTL) utilisé pour nos expériences était du milieu complet RPMI-1640 + 5% SVF décomplémenté.

VI.C. Réactifs utilisés

- a) la dihydrotestostérone (DHT) (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) était diluée dans de l'éthanol. Le diluant seul était utilisé à 0.1% final comme contrôle négatif.
- b) l'anticorps neutralisant anti-IL-6 (IgG1 monoclonal de souris anti-hIL-6, clone 6708.111, R&D Systems, Minneapolis, USA). Pour son utilisation, les milieux de culture CMPrSC ou CTL étaient préalablement incubés avec l'Ac (dose=1 ou 2 ou 5 ou 10 µg/ml) ou l'isotype (isotype contrôle IgG1 monoclonal de souris, clone 11711, R&D Systems, Minneapolis, USA) ou du PBS pendant 2h à 37°C, puis les milieux étaient ensuite déposés sur les cultures cellulaires selon les expériences.
- c) L'inhibiteur de STAT3, Stattic (STAT three inhibitory compound), qui est le 6-nitro-benzothiophene-1,1-dioxide, inhibe de façon sélective l'activation, la dimérisation et la translocation nucléaire de STAT3, à 37°C, via l'inhibition du domaine SH2 de STAT3 quel que soit l'état de phosphorylation de STAT3^{176,177}. Stattic était conservé à -20°C dans du DMSO (solution à 10,6 mg/ml), pendant 1 mois, selon les instructions du fabricant (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). Le contrôle utilisé était le solvant DMSO.

Une gamme de doses de 0,5µM à 10µM (0,5-1-2-3-4-5-10) a été réalisée, avec différents temps d'exposition -1h, 4h, 12h, 48h- des LNCaP transfectées et exposées aux milieux (CMPrSC + Stattic ou DMSO ou CTL + Stattic ou CTL + DMSO) avec un test de viabilité cellulaire en parallèle.

VI.D. Transfection

VI.D.a. Les plasmides

Le plasmide pEGFP-C3 provient de BD Clontech. Le plasmide pE-C3 est issu du pEGFP-C3 par excision de la séquence EGFP entre les sites NheI et XhoI. Les ADNc du RA sauvage (RAWT) et du RAQ640X ont été intégrés dans les plasmides pEGFP-C3 et pE-C3 pour donner les vecteurs d'expression pEGFP-RAWT, pE-RAWT, pEGFP-RAQ640X et pE-RAQ640X. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage. Les plasmides pEGFP-RAWT et pEGFP-RAQ640X conduisent à l'expression du RA sauvage ou muté en fusion avec l'EGFP et sont utilisées dans les expériences d'immunofluorescence. Les constructions pE-RAWT et pE-RAQ640X permettent l'étude fonctionnelle de ces deux RA sans interférence de la GFP.

Pour les analyses d'expressions transcriptionnelle et protéique, les plasmides pE-ARQ640X, pE-ARWT et pE-ARV7 ont été construits en insérant l'ADNc du RA correspondant entre les sites de NheI et BamHI dans le plasmide pE-C3⁸.

VI.D.b. Protocole de transfection transitoire

L'agent de transfection utilisé est le JetPEITM (Polyplus Transfection, Ozyme, France) un polymère soluble-dérivé de polyéthyléminine-, qui forme des agrégats stables avec l'ADN plasmidiques permettant leur endocytose. Dans les endosomes, le JetPEITM se comporte comme une pompe à protons, ce qui conduit à la rupture de l'endosome libérant ainsi dans le cytoplasme le complexe JetPEITM /ADN. Le protocole de transfection suivi est celui de PolyPlus-Transfection SA, Illkirch.

Les lignées cellulaires épithéliales LNCaP, C4-2b étaientensemencées dans du milieu complet dans des plaques 96 puits à 1×10^4 /puits or dans des plaques 6 puits à 3×10^5 /puits. Après 3 jours, le milieu de culture était remplacé et les cellules étaient transfectées dans du milieu de culture sans sérum +10nM of DHT, avec 250 ng du plasmide dans 0.5 μ l de JetPEITM pour des plaques 96 puits ou avec 3 μ g de plasmide dans 6 μ l of JetPEITM pour les plaques 6 puits. Après 24h, le milieu de culture de transfection était changé et remplacé par le CMPrSC ou CTL pendant 48h, selon les expériences.

VI.E. Tests fonctionnels

VI.E.a. Tests Luciférase

Les transactivations du gène rapporteur Luciférase dépendantes de STAT3 ou NFAT ou AP-1 ont été quantifiées dans les LNCaP et les C4-2B.

Les cellules étaientensemencées dans des plaques 96 puits pendant 72h puis transfectées avec du JetPEITM pour un plasmide rapporteur SIE-Luciférase (pGL4.47[*luc2P*/SIE/Hygro], Promega Corporation, USA) ou NFAT-Luciférase (Promega Corporation, USA) ou AP-1 Luciférase (Promega Corporation, USA) et un plasmide rapporteur Renilla (Promega Corporation, USA) afin de normaliser la luminescence. Les cellules étaient également transfectées dans du milieu de culture sans serum + 10 nM de DHT pour les plasmides pE-ARQ640X ou pE-ARV7 ou pE-ARWT ou pE-C3, puis incubées pendant 48h dans du CMPrSC ou CTL. Après une étape de lyse cellulaire, la luminescence des luciférases Firefly et Renilla étaient quantifiées à l'aide du Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) sur un luminomètre Glomax[®] (Promega).

VI.E.b. Tests de prolifération cellulaire

La prolifération des LNCaP (de P6 à P11) et C4-2b (P21), transfectées pour les plasmides pE-ARQ640X ou pE-ARWT ou pE-C3, et exposées au CMPrSC+/- DHT ou CTL+/- DHT était quantifiée à T0 (avant changement de milieu), à T48h et à T6 jours d'exposition aux milieux (avec un refeed à 4 jours) après une étape de lyse cellulaire, à l'aide du Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) sur un luminomètre Glomax® (Promega). Un contrôle par comptage cellulaire a été effectué en parallèle pour la première expérience.

VI.E.c. Recherche de modifications morphologiques des LNCaP en co-culture avec les PrSC

Les LNCaP étaient ensemencées dans des plaques 6 puits (à $2,5 \cdot 10^5$ /puits) dans du milieu complet RPMI-1640 pendant 72h puis transfectées pour les plasmides p-EGFP-ARQ640X ou p-EGFP-ARWT ou p-EGFP-C3 dans du milieu sans sérum+10nM de DHT. Après 24h de transfection, les LNCaP étaient décollées à l'acutase, centrifugées et comptées pour déposer $1 \cdot 10^5$ /puits sur un tapis de PrSC dans du milieu RPMI-1640 sans sérum +5%SVF (CTL).

Le tapis de PrSC était réalisé après ensemencement de PrSC dans du SCGM dans des LabTeck 2 chambres à $2 \cdot 10^4$ /puits (le même jour que la transfection des LNCaP), puis après 24h d'ensemencement, le SCGM était retiré et les LNCaP transfectées étaient déposées sur le tapis de PrSC.

Après 3 jours de co-culture directe, les cellules étaient traitées selon le protocole d'immunofluorescence décrit ci-après, fixées au PFA 2%, puis bloquées au PBS/BSA1%/Triton 0,1% pendant 30 min à TA, puis incubées avec les anticorps primaires puis secondaires.

VI.F. Immunofluorescence

Les LNCaP étaient ensemencées dans des P6 à $2,5 \cdot 10^5$ /puits dans du milieu complet +10nM DHT pendant 3 jours, puis transfectées pour les plasmides p-EGFP-ARQ640X, p-EGFP ARWT ou p-EGFPC3 pendant 24 heures, puis décollées à l'acutase et ensemencées dans Lab-Tek II 2 chambres à 10^5 /puits pour être incubées pendant 72h avant fixation et immunomarquage.

Les PrSC étaient ensemencées en parallèle dans des Lab-Tek II 2 chambres à $2 \cdot 10^4$ /puits.

Après rinçage au PBS et fixation au PF2%, les cellules étaient bloquées et perméabilisées avec du Triton 0,1%/BSA1%/PBS pendant 30 min à TA.

Les cellules étaient par la suite incubées avec l'anticorps primaire ou l'isotype à 4°C toute la nuit.

Les anticorps primaires étaient :

-l'anticorps anti-Cytokératines 5/8, (C50 ; sc-8021, Santa Cruz Biotechnology) : IgG1 monoclonal de souris, dilution 1/50, 4°C overnight, à 4 µg/mL

Isotype: IgG1, Kappa from murine myeloma, Clone Number MOPC 21, Cat.# M9269, Sigma-Aldrich

-l'anticorps anti α -actine muscle lisse (clone EPR5368, Rabbit Monoclonal, Cat.# MABT381, EMD Millipore), dilution 1/250, 4°C overnight, à 2 µg/mL

Isotype: Normal Rabbit IgG: sc-2027, Santa Cruz Biotechnology

- et l'anticorps anti-vimentine (D21H3, XP, Rabbit Monoclonal IgG, Cat.# 5741, Cell Signaling Technology) dilution 1/100, 4°C overnight, à 1 µg/mL

Isotype: Normal Rabbit IgG: sc-2027, Santa Cruz Biotechnology

Après lavage au PBS, les LNCaP étaient incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante.

Les anticorps secondaires étaient :

- l'Alexa Fluor 568 goat anti-mouse à 2 µg/mL, émission dans le rouge (Invitrogen, Fischer Scientific, France)

- l'Alexa Fluor 350 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), dilution 1/1000^{ème}, 1h TA obscurité, émission dans le bleu (Cat.# A11046, Invitrogen)

Les cellules étaient montées entre lame et lamelle dans la solution Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako North America, Inc.).

Les lames obtenues étaient ensuite observées au microscope à fluorescence (Leica DM 5000B).

VI.G. Immunoblots

Après transfection, les cellules LNCaP étaient rincées avec du PBS froid et lysées dans le tampon NP-40 composé de 10mM Tris-HCl pH=7, 140mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0.5x Igepal, 5mM DTT, 1X d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases, et 1X d'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases. La concentration protéique des extraits a été déterminée par le BCATM Protein Assay Kit (Pierce), selon les instructions du fournisseur.

Une quantité d'extraits protéiques allant de 10 à 100µg de protéines totales était déposée sur gel de SDS –PAGE à 7,5% (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Après migration et transfert sur une membrane de nitrocellulose, les membranes étaient saturées avec du TBS (Tris-buffered saline)/0.1%v/v Tween/5%w/v BSA (Bovine Serum Albumin) pendant 1h et incubées à 4°C toute la nuit avec l'anticorps primaire.

L'anticorps primaire pouvait être, selon les expériences:

- 0.5 µg/mL d'anti-STAT3 monoclonal de lapin (Cell signaling technology®, France)
- ou 1 µg/mL d'Ac anti-phospho-STAT3 (Tyr705) monoclonal de lapin (D3A7, Cell signaling technology®, France),
- ou 1 µg/ml d'Ac anti-RA monoclonal de lapin (IgG2a, clone G122-434, BD Pharmingen®).
- ou 0.2 µg/ml d'Ac anti β-tubuline monoclonal de souris (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) comme contrôle interne.

Après lavages, les immunocomplexes étaient détectés avec 0.2 µg/ml d'IgG-HRP-conjugué de chèvre anti-lapin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Tebu-bio, France) ou 0.2 µg/ml d'IgG-HRP-conjugué de chèvre anti-souris (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Tebu-bio, France) et révélés par chemoluminescence (ImmobilonTM Western, Millipore, Molsheim, France).

VI.H. Tests ELISA dosage pSTAT3 et STAT3

Les LNCaP (de P7 à P9) étaient ensemencées dans des plaques 12 puits à 8.10^4 /puits dans du milieu complet pendant 3 jours, puis transfectées pour les plasmides p-E-ARQ640X ou p-E-ARV7 ou p-E-ARWT ou p-E-ARC3 dans du milieu sans sérum +10nM de DHT pendant 24h puis exposées au CMPrSC ou CTL pendant 48h. Après lavage PBS et lyse cellulaire, les extraits cellulaires ont été transférés dans une plaque 96 puits et le dosage de pSTAT3 (Tyr705) et STAT3 ont été réalisés grâce au STAT3 (total/phospho) InstantOne™ ELISA, selon les instructions du fournisseur (eBioscience, Inc. San Diego, USA). La mesure de l'absorbance à 450 nm a été réalisée au spectrophotomètre Glomax® (Promega).

VI.I. Analyse transcriptomique par IPA (Ingenuity Pathway Analysis)

Les LNCaP étaient ensemencées dans des plaques 6 puits dans du milieu complet pendant 72h puis transfectées pour les plasmides pE-ARQ640X ou pE-C3 dans du milieu sans sérum pendant 24 heures, puis exposées à du CMPrSC ou CTL pendant 48 heures avant extraction d'ARN. L'extraction d'ARN était réalisée grâce au NucleoSpin® RNA XS assay (Macherey-Nagel, France) selon les instructions du fournisseur et la quantité et qualité d'ARN évaluées par le Nanodrop bioanalyzer (NanoDrop 2000® Spectrophotometer, ThermoScientific, France). Les échantillons étaient réalisés en quadruplicat pour chaque condition définie ainsi: "640p" (pE-ARQ640X + CMPrSC), "640m" (pE-ARQ640X + CTL), "C3p" (pE-C3 + CMPrSC), and "C3m" (pE-C3 + CTL).

Pour le profil d'expression génique, les échantillons d'ARN totaux étaient marqués en utilisant le protocole dédié (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis-Low Input Quick Amp Labeling » version 6.5, Mai 2010, Part Number G4140-90040) et les signaux étaient lus avec le scan C d'Agilent "AgilentHD_GX_1Color (scan resolution: 5µm, Tiff: 20 bit). L'analyse des images était réalisée en utilisant le protocole dédié (Feature Extraction GE_1_1010_Sep10) et l'extraction des données de chaque array était faite sur le programme d'Agilent (Feature Extraction, version 10.10.1.1). Les arrays ont été réalisés à l'IGBMC, Strasbourg, France.

Les données ont été normalisées selon les méthodes LOWESS et QUANTILE (n=65977). Le test de variance ANOVA a été réalisé pour $p < 0.005$, aboutissant à la sélection de 1770 gènes. Les données de ces 1770 sondes ont été utilisées pour construire l'analyse de core dans le logiciel « Ingenuity

Pathway Analysis » (IPA; Ingenuity Systems). Nous avons déterminé 4 groupes d'intérêt grâce à un test de Student pour $p < 0.05$:

- "640p/640m" pour étudier l'impact du CMPrSC sur les LNCaP exprimant le RAQ640X (n=1342),
- "C3p/C3m" pour étudier l'impact du CMPrSC les LNCaP exprimant leur RA endogène ligand-dépendant (n=960),
- "640p/C3p" pour étudier l'impact du RAQ640X sur les LNCaP exposées au CMPrSC (n=656),
- "640m/C3m" pour étudier l'impact du RAQ640X sur les LNCaP, en l'absence de CMPrSC (n=1059).

Les réseaux et voies de signalisation hyper- ou hypo-régulés dans les cellules ont été identifiés grâce au logiciel IPA, en partant des gènes identifiés comme régulés (et de l'expression des valeurs correspondantes qui étaient chargées dans l'application pour construire l'analyse de core). Chaque gène était ainsi intégré dans les réseaux selon leur niveau d'hyper ou d'hyporégulation, et les réseaux étaient générés par des algorithmes basés sur leur connexion et ordonnés selon leur importance présumée.

VI.J. RT-PCR en temps réel

L'extraction des ARN totaux était réalisée grâce au NucleoSpin® RNA XS assay (Macherey-Nagel, France) selon les instructions du fournisseur et les concentrations et qualité des ARN étaient quantifiées en mesurant l'absorbance à 260nm et 280nm (NanoDrop 2000® Spectrophotometer, ThermoScientific, France). Les transcriptions inverses étaient réalisées à partir d'1 µg d'ARN en utilisant le kit RT Omniscript (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ARN étaient dilués dans 13 µL et dénaturés à 65°C pendant 5 minutes. Un mix de réaction de 7 µL contenant 1xRT template, 0.5 mM de chaque dNTP, 1 µM oligodT, 10 U de RNase inhibiteur et 4 U de transcriptase inverse Omniscript était ajouté et la réaction incubée pendant 1h à 37°C, puis arrêtée par chauffage jusqu'à 93°C pendant 5 minutes.

Les quantifications des niveaux d'expression transcriptionnelle des gènes *STAT3*, *S100A4*, *LOX*, *ITGB2*, *DDIT3*, *FOS*, *NCOA3*, *IGFBP3*, *PIAS1*, *HIF1α*, *PMEPA1*, *GP130*, *GDF15*, *CXCR4*, *GADD45A*, *SMAD2*, *TNFSF10*, *TIPARP* étaient réalisées par PCR en temps-réel en utilisant le LightCycler 480 (Roche Applied Science, Meylan, France). Pour les réactions de PCR 5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, France) et 1 µL des amorces spécifiques (cf. Tableau 1) étaient mélangés avec 4 µL de

dilution 1/5 d'ADNc. Les résultats étaient normalisés en utilisant le gène de ménage *PBGD* (Porphobilinogen deaminase) (Qiagen, QuantiTect Primer). La spécificité d'amplification était vérifiée en analysant les courbes de fusion. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat et répétées 3 fois. La quantification relative a été utilisée pour déterminer la variation du taux d'expression par la méthode des $\Delta\Delta Ct$. Chaque valeur est exprimée comme la moyenne des $\Delta\Delta Ct$ et SEM. Les résultats sont analysés avec le test T de Student et une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative.

Tableau 1 : Référence des amorces de qPCR utilisées

Amorces	Référence QuantiTect	Amplicon (pb)	N°accession GenBank
PBGD (HMBS)	QT00014462	107	NM_000190
STAT3	QT00068754	95	NM_003150
S100A4	QT00014259	120	NM_002961
LOX	QT00017311	68	NM_001178102
ITGB2	QT00052584	75	NM_000211
DDIT3	QT00082278	247/194/171/35/ 90	NM_001195053/54/55/56/ NM_004083
FOS	QT00007070	123	NM_005252
NCOA3	QT00053956	88	NM_001174087
IGFBP3	QT00072737	148	NM_000598
PIAS1	QT00031248	94	NM_016166
HIF1 α	QT00083664	104	NM_001243084
PMEPA1	QT00086191	108	NM_020182
GP130	QT00091294	112	NM_001190981
GDF15	QT00082558	114	NM_004864
CXCR4	QT000223188	106	NM_001008540
GADD45A	QT00014084	167	NM_001199741
SMAD2	QT00004207	149	NM_001003652
TNFSF10	QT00079212	141	NM_003810
TIPARP	QT00004347	115	NM_001184717

VI.K. Dosage cytokinique

L'IL-6 a été dosée dans les milieux CMPrSC et CTL en utilisant le kit IL6 enzyme-labeled chemiluminescent sequential immunometric (Immulite 1000®, Siemens). Les cytokines IL-8, IL-10 et TNF α ont également été dosées par kit ELISA. Les dosages ont été réalisés en triplicat, au laboratoire de biochimie et biologie moléculaire du CHU Hautepierre, Strasbourg, France.

VI.L. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM et sont issues d'au moins 3 expériences distinctes (triplicat), sauf exception alors précisée.

Les analyses statistiques ont été faites en utilisant un test T de Student. Les valeurs de $p < 0.05$ étaient considérées comme significatives.

Résultats et Discussion

VII. RESULTATS et DISCUSSION

Nous présentons nos résultats en deux parties :

- Une première partie sous la forme d'un article scientifique en cours de rédaction et dont l'objectif est la soumission dans une revue à comité de lecture, *Endocrine Related Cancer*. Cet article a pour objectif de détailler notre première hypothèse qui était celle d'une participation de la voie de l'interleukine-6 via STAT3 dans la coopération PrSC-LNCaP/ARQ640X.
- Une seconde partie pour présenter et discuter les autres résultats liés à l'exploration de l'hypothèse de la voie de l'IL-6 comme voie privilégiée dans la coopération épithélio-stromale impliquant les formes constitutivement actives du RA, mais aussi les autres acteurs potentiels dans cette coopération épithélio-stromale.

VII.A. Les cellules stromales prostatiques et les formes constitutivement actives du récepteur des androgènes coopèrent via STAT3 et la voie de l'interleukine-6 pour soutenir la progression tumorale du cancer de la prostate

Cet article a pour objectif de discuter cette hypothèse via les résultats suivants :

1. Le CMPrSC contient diverses cytokines, donc l'interleukine 6, en quantité importante comparé au milieu CTL
2. La transactivation de STAT3 est plus importante dans les LNCaP et C4-2b exprimant le RAQ640X comparée au RAWT, et est potentialisée avec l'exposition au CMPrSC dans les cellules exprimant le RAQ640X, comparé au milieu CTL
3. L'inhibition de l'IL-6 sécrétée par les PrSC diminue fortement l'expression protéique de pSTAT3-Tyr705 et la transactivation de STAT3 dans les LNCaP et C4-2b exprimant le RAQ640X.
4. L'analyse transcriptomique du modèle cellulaire exposé au CMPrSC et exprimant le RAQ640X met en évidence une hyper-régulation de certains gènes impliqués dans la progression tumorale en présence de RAQ640X et CMPrSC, dont les gènes *LOX*, *ITGB2* et *S100A4*, dont l'hyper-expression transcriptionnelle est en partie diminuée par l'inhibition de l'IL-6 dans le CMPrSC.

Prostate stromal cells and constitutively active androgen receptor variants cooperate via STAT3 and interleukin-6 pathway to support tumor progression in prostate cancer

Abstract

Constitutively active androgen receptor (AR) variants and stromal microenvironment are involved in castration resistant prostate cancer (CRPC), but their relationship remains unknown. We describe the effects of interleukin-6 (IL6) secreted from prostate stromal fibroblast cells (PrSC) towards prostate epithelial cancer cells expressing constitutively active AR variants. Conditioned culture medium from PrSC (CMPrSC) contained high levels of IL6 and led to an increased STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription factor 3) transcriptional activity in LNCaP and C4-2b cells expressing the constitutively active ARQ640X variant ($r=23.4$, $p=0.03$ and $r=7.0$, $p=0.002$, compared to wild-type AR expression, respectively). This STAT3 activity was significantly diminished in the presence of neutralizing antibody anti-IL6. Gene expression analysis using mRNA array and RT-qPCR highlighted a CMPrSC-induced S100A4 (S100 calcium binding protein A4) and ITGB2 (integrin- β 2) up-regulation in LNCaP-ARQ640X cells ($r=5.7$ $p=0.005$ and $r=18.5$ $p=0.002$, respectively), which decreased with IL6 neutralization.

Overall, PrSC-secreted IL6 induces pY705-STAT3 activation that results in an increased STAT3 transactivation in epithelial prostate cancer cells expressing constitutively active AR variants ARQ640X and ARV7. Altogether, our data suggest that PrSC and constitutively active AR variants cooperate via IL6 to promote the expression of genes involved in prostate cancer progression. Indeed, inhibiting IL6/STAT3 pathway could be a therapeutic target in prostate cancer patients harboring constitutively active AR variants.

Short title

Androgen receptor variants and stromal cells

Key words

Constitutively active AR variants, IL6, STAT3, Stromal microenvironment, Prostate cancer progression

Word count (excluding references and figure legends)

4807 words (max 5000)

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer in men and depends on androgenic stimulation through the androgen receptor (AR). Androgen ablation therapy for advanced and metastatic PCa is associated with clinical responses and overall survival benefit (Damber 2005), but castration-resistant prostate cancer (CRPC) is an ineluctable event in the disease course. In the understanding mechanisms of androgen escape, constitutively active AR variants have been described in PCa at different disease stages, especially at metastatic stage (Ceraline, et al. 2004; Dehm, et al. 2008; Lapouge, et al. 2007; Marcias, et al. 2010; Ware, et al. 2014) and are involved in disease progression and resistance to androgen deprivation treatment. These truncated AR variants result from somatic nonsense mutations such as ARQ640X or alternative splicing such as ARV7, leading to ligand-independent, constitutively active proteins (Bergerat and Ceraline 2009; Ware et al. 2014). We have previously reported that the truncated ARQ640X variant was responsible for paracrine activity onto full-length AR-expressing prostate tumor cells (Lapouge et al. 2007), and also for an up-regulation of mesenchymal markers expression (Cottard, et al. 2013). These results demonstrate the importance of truncated AR variants properties in PCa progression.

However, it is now accepted that PCa progression and CRPC also involves epithelial-stromal cells cooperation that impacts cancer invasion and metastasis (Mueller and Fusenig 2004). Stromal microenvironment is composed of several cell types (fibroblasts, vascular components and inflammatory cells) and extra-cellular matrix that will secrete chemokines, cytokines such as interleukin-6 (IL6) (Cardillo and Ippoliti 2006), growth factors, collagen and metalloproteases, which generate different signals for epithelial cells (Mueller and Fusenig 2004). This epithelial-stromal cooperation impacts signaling pathways involved in PCa development and progression to promote the onset of CRPC in patients treated with hormonal therapy (Reebye, et al. 2011). In PCa, interleukin-6 (IL6) can be secreted by epithelial tumor cells, but also by stromal cells from the microenvironment (Cardillo and Ippoliti 2006; Hobisch, et al. 2000). Interleukin-6 (IL6) can be secreted by B and T-cells, macrophages, endothelial cells and fibroblasts and is involved in immune response, cell proliferation and angiogenesis (Azevedo, et al. 2011). IL6 classical signaling pathway is based on the cytokine binding to its receptor complex IL6R (gp80/gp130), leading to Signal Transducer and Activating of Transcription factor 3 (STAT3) activating phosphorylation in Tyr705 through Janus Kinase (JAK) activation to promote cell proliferation and survival (Masuda, et al. 2010). IL6 may also activate the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K/Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways to promote cell survival and cell proliferation, respectively (Azevedo et al. 2011; Mihara, et al. 2012). IL6 pathway has been previously described to be involved in CRPC progression via a cross-talk with AR regulation (Chen, et al. 2000; Culig 2003, 2004; Hobisch et al. 2000; Lin, et al. 2001). In LNCaP cells,

direct interaction between pY705-STAT3 and endogenous full-length AR involves a large binding site on AF-1 domain (1-558aa, GenBank: AH002607.1) of the AR N-terminal domain (Ueda, et al. 2002). Consequently, IL6 stimulation activates AR-dependent gene expression in LNCaP cells (Chen et al. 2000). Moreover, IL6 also activates AR through p-Thr202/Tyr204-MAPK in LNCaP cells promoting AR-regulated genes expression (Reebye et al. 2011; Suzuki, et al. 2003). IL6 pathway may be an alternative pathway for growth and proliferation of PCa cells, under androgen deprivation conditions. Indeed, IL6 levels are different in patients' serum with locally advanced (median 2.56 pg/mL) or metastatic disease (median 11.85 pg/mL) (Nakashima, et al. 2000), and have an unfavorable prognostic impact beyond the cut-off value of 13.31 pg/mL (George, et al. 2005). Thus, IL6 appears to be a key regulator of PCa development and progression via AR pathway (Azevedo et al. 2011), and could be considered as a promising therapeutic target in CRPC (Sansone and Bromberg 2010; Teixeira, et al. 2009). Targeting IL6 pathway in CRPC has been evaluated in phase I/II trials (Dorff, et al. 2010; Hudes, et al. 2013; Wallner, et al. 2006) with minimal efficacy, emphasizing the need to better select patients who may benefit from IL6 inhibition therapy.

In this study, we hypothesized that IL6 secreted by stromal cells impact PCa progression via a crosstalk between truncated AR variants and STAT3 pathways. In order to decipher the underlying mechanisms, we investigated the relation between prostate stromal cells and epithelial cancer cells expressing the ARQ640X or ARV7 truncated AR variants. We demonstrated that prostate stromal cells secrete cytokine IL6, which is responsible for STAT3 activation in prostate epithelial tumor cells LNCaP and C4-2b cells, leading to a significant increase of STAT3 transactivation in presence of constitutively active AR variants. In the light of our results we describe how epithelial-stromal cells and constitutively active truncated AR variants co-operate and might play a key role in the biology of CRPC.

Material and methods

Cells culture

The human prostate carcinoma LNCaP cell line from P6 to P15, clone FGC (ECACC, Salisbury, United Kingdom) and the C4-2b cell line from P16 to P26 (ViroMed Laboratories, Minnetonka, MN, USA) were maintained in RPMI-1640 complete medium containing 10%v/v fetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, France) and 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen, Fisher Scientific, France).

The human prostate stromal cells PrSC cell line from P3 to P4 (Lonza, Levallois-Perret, France) were maintained in SCBM (stromal cell basal medium, CC-3204, Clonetics) plus SCGM SingleQuots (CC-3205, Clonetics) composed by FCS, h-FGF-B, insulin, gentamicin/amphotericin (Lonza, Levallois-

Perret, France). After 48h seeding, PrSC were maintained in RPMI-1640 complete medium containing 5 %v/v deplemented FCS for 48h to generate the stromal cells conditioned medium (CMPrSC).

Stromal cells conditioned medium (CMPrSC)

The stromal cells conditioned medium (CMPrSC) was composed by RPMI-1640 complete medium containing 5%v/v of deplemented FCS which had been maintained on PrSC cells during 48h and centrifuged at 1700tr/min during 7 min and stored at -20°C. The CMPrSC contains all cytokines and growth factors secreted by PrSC. The control medium (CTL) used for experiments was RPMI-1640 complete medium containing 5%v/v of deplemented FCS.

Transfection

For gene expression analysis and Western-blot, pE-ARQ640X, pE-ARWT and pE-ARV7 plasmids were constructed by inserting the corresponding AR cDNA between the NheI and BamHI sites in pE-C3 (Cottard et al. 2013). For transfections, the JetPEITM transfection reagent (Polyplus Transfection, Ozyme, France) was used according to the manufacturer's protocol. LNCaP or C4-2b cells were seeded in complete culture medium in 96-wells plate at 1x10⁴/well or in 6-wells plate at 3x10⁵/well. Three days later, complete culture medium was removed and cells were transfected in serum-free culture medium +10nM of DHT, with 250 ng of the indicated plasmid using 0.5 µl of JetPEI transfection reagent for 96-wells plate or with 3 µg of plasmid using 6 µl of JetPEI for 6-wells plate. Culture medium was removed 24h after and cells were incubated up to 48h according to the experiments.

Luciferase and cell viability assays

The transactivation of STAT3-driven luciferase reporter gene was quantified in LNCaP and C4-2B cells. Cells were seeded in 96-well plates for 72h and transfected with the JetPEITM transfection reagent for a SIE- luciferase plasmid reporter (pGL4.47[luc2P/SIE/Hygro], Promega Corporation, USA) and a renilla plasmid (pGL4.70[hRluc2P], Promega Corporation, USA) reporter to normalize the luminescence. Cells were also transfected in serum-free culture medium + 10 nM of DHT, for plasmid encoding for pE-ARQ640X or pE-ARV7 or pE-ARWT or pE-C3 (empty plasmid used as control), and then incubated for 48h in CMPrSC or CTL medium. If using neutralizing anti-IL6 antibody (anti-hIL-6, purified mouse monoclonal IgG1, clone 6708.111, R&D Systems, Minneapolis, USA), CMPrSC or CTL medium were previously incubated with the anti-IL6 antibody (dose=1 or 2 or 5 or 10 µg/mL) or

isotype (Monoclonal Mouse IgG1 Isotype Control, clone 11711, R&D Systems, Minneapolis, USA) or PBS (Phosphate buffered saline) during 2h at 37°C. After a lysis step the luminescence of the firefly and the renilla luciferases were quantified using the Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) on a Glomax[®] (Promega).

Immunoblots

Cells were lysed in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH7, 140 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5x Igepal, 5 mM DTT, 1x phosphatase inhibitor, and 1x protease inhibitor. Protein concentration for each sample was quantified using BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's procedure. A quantity of 15 µg to 100 µg of total proteins was loaded on 7.5%w/v SDS-PAGE. After migration and transfer to nitrocellulose membrane, membranes were saturated with TBS (Tris-buffered saline)/0.1%v/v Tween/5%w/v BSA (Bovine Serum Albumin) during 1h and incubated at 4°C overnight with 0.5 µg/mL rabbit monoclonal anti STAT3 (Cell signaling technology[®], France) or 1 µg/mL rabbit monoclonal anti phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7, Cell signaling technology[®], France), or 1 µg/mL mouse monoclonal anti AR (IgG2a, clone G122-434, BD Pharmingen[®]). Rabbit anti β -tubulin antibody at 0.2 µg/mL (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA) was used as internal control. After washes, immunocomplexes were detected with 0.2 µg/mL goat anti-rabbit IgG-HRP conjugated (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Tebu-bio, France) or 0.2 µg/mL goat anti-mouse IgG-HRP conjugated (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Tebu-bio, France) and finally revealed by chemiluminescence (ImmobilonTM Western, Millipore, Molsheim, France).

Ingenuity pathway analysis

Culture cells and total RNA extraction

LNCaP cells were cultured in 6-wells plate in complete culture medium during 72h and then transfected for plasmids pE-ARQ640X or pE-C3 (empty plasmid) in serum-free culture medium. After 24h, transfected-LNCaP cells were exposed to CMPrSC or control medium (CTL) during 48h before RNA extraction. RNA extraction was performed using NucleoSpin[®] RNA XS assay (Macherey-Nagel, France) according to the manufacturer's procedure and RNA quality was assessed with a Nanodrop bioanalyzer (NanoDrop 2000[®] Spectrophotometer, ThermoScientific, France). Samples were realized in quadruplicate for each condition defined as: "640p" (pE-ARQ640X + CMPrSC), "640m" (pE-ARQ640X + CTL), "C3p" (pE-C3 + CMPrSC), and "C3m" (pE-C3 + CTL).

mRNA microarray analysis

For gene expression profiling, total RNA samples were labeled using the protocol « One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis-Low Input Quick Amp Labeling » version 6.5, May 2010, Part Number G4140-90040, and signals were read using the scan C from Agilent “AgilentHD_GX_1Color (scan resolution: 5µm, Tiff: 20 bit). Images analyzing was performed using the protocol « Feature Extraction GE_1_1010_Sep10 », and data’s extraction from each array was performed on the « Feature Extraction, version 10.10.1.1 » Agilent’s program. The arrays were processed at the IGBMC, Strasbourg, France, following all appropriate manufacturers’ instructions.

Data analysis

Data base were normalized according to the LOWESS method and the QUANTILE method (n=65977). The ANOVA variance test was performed with a p<0.005, resulting in the selection of 1770 genes. This data base of 1770 probes was used to build the core analysis in Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems). We determined 4 groups of interest after using the Student’s test with a p<0.05:

-“640p/640m” to study the impact of CMPrSC onto ARQ640X (n=1342),

-“C3p/C3m” to study the impact of CMPrSC onto ligand-dependent endogenous AR (n=960),

- “640p/C3p” to study the impact of ARQ640X in presence of CMPrSC (n=656),

- “640m/C3m” to study the impact of ARQ640X in absence of CMPrSC (n=1059).

Pathway analysis

Networks of up- and down- regulated genes in LNCaP cells transfected with the pE-ARQ640X or the empty plasmid control and exposed to CMPrSC or control culture medium (CTL) were generated through the use of Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems). A data set of the regulated genes containing gene identifiers and their corresponding expression values was uploaded into the application to build a core analysis. Each identified gene was mapped to its corresponding gene object in the Ingenuity Pathway Knowledge Base. The uploaded genes, called focus genes, were overlaid onto a global network developed from information contained in the Ingenuity Pathway Knowledge Base. Networks of these focus genes were then algorithmically generated based on their connectivity and ordered depending on their putative importance.

Quantitative real-time PCR

Total cellular RNA was extracted from cell lines using NucleoSpin® RNA XS assay (Macherey-Nagel, France) according to the manufacturer’s procedure. RNA concentrations and purity were quantified

measuring the absorbance at 260 nm and 280 nm (NanoDrop 2000® Spectrophotometer, ThermoScientific). The reverse transcription was performed from 1 µg RNA using RT Omniscript assay (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA were diluted into 13 µL and denatured at 65°C during 5 minutes. A 7 µL reaction mix containing 1xRT template, 0.5 mM of each dNTP, 1 µM oligodT, 10 U RNase inhibitor and 4 U Omniscript Reverse Transcriptase was added and the reaction was incubated 1h at 37°C. The reaction was stopped by heating to 93°C for 5 minutes. STAT3, ITGB2, LOX (lysyl oxidase) and S100A4 mRNA levels were quantified using real-time PCR with LightCycler 480 (Roche Applied Science, Meylan, France). For PCR reactions, 5 µL of GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, France) and 1 µL of specific primers STAT3 (Cat N°QT00068754), ITGB2 (QT00052584), LOX (QT00017311) and S100A4 (QT00014259) (Qiagen, QuantiTect Primers, Courtaboeuf, France) were mixed with 4 µL of 1:5 cDNA dilution. Results were normalized using housekeeping gene PBGD (Porphobilinogen deaminase) (Qiagen, QuantiTect Primer). Amplification specificity was verified by analyzing melting curve. All experiments were realized in triplicate and repeated 3 times. Relative quantification was used to determinate fold change in expression level by the $\Delta\Delta C_t$ method. Each value is expressed as the mean $\Delta\Delta C_t$ and SEM. Results were analyzed with Student t test and p-value, 0.05 was considered significant.

IL6 quantification

Cytokine IL6 was measured in CMPrSC and control medium (RPMI-1640 + 5% decomplexed FCS) culture supernatants by using IL6 enzyme-labeled chemiluminescent sequential immunometric assay (Immulite 1000®, Siemens). Dosages were repeated in triplicate.

Results

PrSC-derived interleukin-6 (IL6) induced a higher STAT3 transactivation in prostate epithelial cancer cells expressing constitutively active AR variants

Prostate stromal cells are known to secrete high levels of IL6. Indeed, IL6 levels in conditioned medium obtained from a 48h PrSC culture in RPMI+5%FCS reached 668 ng/L \pm 91 (SEM), while the non-conditioned control medium (CTL medium) contained less than 2 ng/L IL6 (figure 1). To analyze the impact of constitutively active AR variants onto the IL6 signaling pathway in prostate cancer epithelial cells in response to CMPrSC exposure, we studied the expression of STAT3, a surrogate, downstream effector of IL6 pathway and its activated, phosphorylated pSTAT3(Y705) form in LNCaP cells. LNCaP cells were transfected with pE-ARQ640X (ARQ640X), pE-ARV7 (ARV7), pE-ARwt (ARWT) or with the empty plasmid control pE-C3 as control and incubated in the presence of 10 nM DHT.

Twenty-four hours later, medium was replaced and cells were incubated in CMPrSC or CTL medium for 48h. As shown in figure 2a, exposure to CMPrSC induced intense phosphorylation of STAT3 in LNCaP cells, with no variation due to transfected AR variants or to DHT treatment. Similar results were obtained in C4-2b cells (cf. Figure 2b). To further establish that IL6 was responsible for STAT3 phosphorylation, we repeated the pY705-STAT3 and total STAT3 immunoblots assay at 48h of exposure to CMPrSC + 5µg/ml of neutralizing anti-IL6 antibody or isotype IgG1 prior to total protein extraction. As presented in figure 2b figure 2c, pSTAT3(Y705) signal strongly decreased when anti-IL6 antibody was added to CMPrSC, thus confirming that activation of STAT3 is related to IL6 in CMPrSC. Taken together, these data demonstrated that IL6 present in the CMPrSC is the main factor responsible for STAT3 activation and phosphorylation. Expression of the ARWT and the truncated AR variants (ARQ640X and ARV7) after transfection was controlled in LNCaP cells stimulated by DHT and exposed to CMPrSC: similar expression of the truncated ARs and the ARWT was observed (cf. figure 2d).

To analyze the impact of the constitutively active AR variants onto STAT3 transcriptional activity in prostate cancer epithelial cells in response to CMPrSC exposure, we performed luciferase assays after co-transfection with p-SIE-luciferase reporter plasmid containing sis-inductible elements(SIE), which are consensus binding sites for STAT proteins. As presented in figure 2c figure 3a, following exposure to CMPrSC a significant increase of SIE-Luc activity was observed in LNCaP in the presence of ARQ640X ($r=21.9$, $p=0.03$) when compared with cells exposed to CTL medium. A slight increase of SIE-luc activity was observed in the presence of ARWT ($r=2.5$, $p=0.01$) (in LNCaP control: $r=1.1$, $p=0.7$). Similar results were obtained in C4-2b cells. Surprisingly, SIE-luc activity was lower in LNCaP or C4-2b cells expressing ARV7 and exposed to CMPrSC ($r=0.6$, $p=0.5$; $r=4.2$, $p=0.001$, respectively) than that one obtained in the presence of ARQ640X. Taken together, these experiments demonstrated that both a CMPrSC component and truncated AR variants ARQ640X and ARV7 are required to significantly increase STAT3 transactivation in epithelial prostate cancer cells. To ensure that IL6 was indeed one of the CMPrSC components responsible for STAT3 activation, CMPrSC were incubated with 5 µg/ml of neutralizing anti-IL6 antibody or isotype IgG1 for 2 hours at 37°C prior to assess SIE-luciferase activity. As presented in figure 2d figure 3b, IL6 neutralization in CMPrSC resulted in a 1.8 fold decrease ($p=0.02$) of the STAT3 transcriptional activity in LNCaP cells and a 1.9 fold decrease ($p=0.006$) in C4-2b cells in the presence of ARQ640X.

CMPPrSC exposure to LNCaP cells induces networks of gene activation involving cell proliferation, migration and epithelio-mesenchymal transition, with a specific pattern induced by ARQ640X expression

To explore mRNA response of prostate epithelial tumor cells expressing the constitutively active AR variant to PrSC-secreted factors, we performed a transcriptome analysis using IPA. This experiment was performed in LNCaP cells transfected by either pE-ARQ640X and exposed to either CMPPrSC (640p) or CTL medium (640m), or transfected with the empty plasmid pE-C3 and exposed to either CMPPrSC (C3p) or CTL medium (C3m) in order to detect the contribution of CMPPrSC, ARQ640X, or both onto gene profile expression. Table 1 presents the main cells functions significantly selected in IPA for “C3p/C3m” group and demonstrated that cell functions involved in “cell death and survival” ($2.71.10^{-3} < p < 4.47.10^{-2}$) and in “cell movement” ($1.59.10^{-2} < p < 4.06.10^{-2}$) are the main cell functions induced by CMPPrSC alone. The impact of ARQ640X expression is described in the analysis of the “640m/C3m” group (Table 1), with main cells functions such as “prostate cancer cell lines transformation” ($p = 7.84.10^{-3}$), “generation of reactive oxygen species” ($p = 1.68.10^{-2}$) and “entry into phase S” ($p = 4.6.10^{-2}$). The main cell functions identified by IPA to explore the effects of both CMPPrSC and ARQ640X (“640p/640m” and “640p/C3p” groups) were “cell development and movement” ($3.88.10^{-3} < p < 9.05.10^{-3}$), “cell-cell interaction, EMT, and migration” ($1.79.10^{-3} < p < 1.66.10^{-2}$). Altogether these data suggest the existence of a crosstalk between constitutively active AR variant expressed in prostate cancer cells and cytokines and growth factors factors secreted by stromal cells to promote the expression of genes involved in EMT, cell migration and invasion.

As STAT3 was identified by IPA analysis as a surrogate gene of CMPPrSC exposure, we analyzed its position in signaling pathway networks ordering. STAT3 is a capital gene in the first signaling network (score=15) in the “640p/640m” group, but is only represented in the third signaling network (score=6) of “C3p/C3m” group (Table 1). Using RT-qPCR experiments in LNCaP cells exposed to CMPPrSC, STAT3 up-regulation was more pronounced in the presence of ARQ640X ($r = 2.7$, $p = 6.10^{-4}$) than in controls ($r = 1.7$, $p = 0.001$) (figure 3a figure 4b).

To further explore the co-operative effects of CMPPrSC and constitutively active AR variant ARQ640X on gene expression profile in LNCaP cells, focusing on cell functions identified by IPA (EMT, cells migration and movement, cell-cell interaction) we analyzed ITGB2 (integrin- β 2), S100A4 (S100 calcium binding protein A4) and LOX (lysyl oxidase) expression, as they were prominent in IPA when considering the joint effect of CMPPrSC and ARQ640X (figure 3b figure 4a). Using RT-qPCR experiments, we confirmed that ITGB2, S100A4 and LOX were up-regulated in the presence of

ARQ640X compared to controls (ITGB2: $r=2.6$, $p=0.01$; S100A4: $r=1.5$, $p=0.007$; LOX: $r=8.1$, $p=0.002$), and that ITGB2 and S100A4 expression was further increased when cells were exposed to CMPrSC (ITGB2: $r=18.5$, $p=0.002$; S100A4: $r=5.7$, $p=0.005$) (figure 3b figure 4b). To further determine the contribution of the IL6/STAT3 pathway in the expression of these three genes, LNCaP cells transfected with pE-ARQ640X were exposed to CMPrSC pre-treated with $5\mu\text{g/ml}$ of the neutralizing anti-IL6 antibody. As presented in figure 4 figure 5, a slight decrease in the expression level of STAT3, ITGB2 and S100A4 ($r=1.2$, $p=0.008$ / $r=1.2$, $p=0.001$ / $r=1.8$, $p=6.4.10^{-5}$, respectively) was observed compared to controls.

Taken together, these experiments suggest that soluble factors secreted by PrSC could cooperate with constitutively active AR variants pathways in LNCaP cells to up-regulate the expression of genes involved in migration, invasion and EMT, and that the IL6/STAT3 pathway contribute to these communication between stromal cells and PCa cells expressing these constitutively active AR variants.

Discussion

As CRPC is a cornerstone in PCa evolution, understanding the mechanisms involved in CRPC progression is mandatory to develop new treatments. Truncated AR variants and stromal microenvironment are considered as key points in CRPC progression (Ceraline et al. 2004; Mueller and Fusenig 2004), but to our knowledge, their relationship has never been studied. We present here how cell functions due to the constitutively active truncated AR variant ARQ640X can be modulated by PrSC's secreted factors, and more specifically IL6.

We report that PrSC's secreted factors among which is IL6- and constitutively active AR variants induce an enhanced SIE-inducible gene expression through STAT3 activation. Our results demonstrated that truncated AR variants-enhanced STAT3 transactivation was not related to activated pY705-STAT3 protein quantity, but on its activation. Previous studies reported that p-STAT3 translocate into the nucleus and binds directly to the N-terminal domain (NTD) of activated AR which act as a transcriptional co-activator for STAT3 (Matsuda, et al. 2001), by relieving STAT3 from its inhibitory complex STAT3-PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated STAT3) through a physical protein-protein competition to promote STAT3 transactivation (Yamamoto, et al. 2003). Thus, constitutively active AR variants may enhance PrSC-induced STAT3 transactivation through a more stable protein-protein interaction or through different transcriptional co-activators recruitment. While our results are evident with ARQ640X expression, there are more complex with ARV7 expression, as we did not

confirm a significant enhanced STAT3 transactivation although pY705-STAT3 protein expression was induced by CMPrSC exposure in ARV7 transfected LNCaP cells. We supposed that mechanisms involved in STAT3 transactivation may be different with ARV7 than with ARQ640X. As the truncated ARV7 variant lacks the HR (hinge region) as opposed to ARQ640X, ARV7 may not translocate into the nucleus to interact with PIAS3/STAT3 complex with the same ability of ARQ640X. Moreover, NTD is an intrinsically disordered protein (IDP) that lacks a fixed or ordered three-dimensional structure, thus generating flexibility and plasticity to interact with multiple partners (McEwan 2012; Myung, et al. 2013; Simons and Kumar 2013). Consequently, if transcriptional co-activators recruited by ARV7 are different than those dedicated to ARQ640X, ARV7's NTD can be modified in its three-dimensional structure and not be able to interact with STAT3. Unfortunately, little is known about co-activators specifically dedicated to truncated AR variants.

We also confirmed that conditioned medium from benign prostate stromal fibroblast cells (CMPrSC) contained high dose of IL6, (Cardillo and Ippoliti 2006; Sivashanmugam, et al. 2004; Uemura, et al. 2005) which was responsible for a pY705-STAT3 activation and a CMPrSC-induced transcriptional STAT3 up-regulation. In LNCaP and C4-2b androgen-sensitive cells, CMPrSC induced a moderate STAT3 transactivation. Our results from the transcriptome profile resulting from CMPrSC exposure onto LNCaP androgen-sensitive cells ("C3p/C3m" group) are consistent with previous reported data about IL6-STAT3 pathway and protection from apoptosis in LNCaP cells (Lee, et al. 2004). To analyze the ARQ640X or ARV7 impact, we created a co-culture of cancer epithelial cells (LNCaP or C4-2b cells) expressing the androgen-sensitive full-length AR and the constitutively active truncated AR variant, to mimic different cells populations' effects which probably take place during CRPC progression. ARQ640X expression and CMPrSC exposure strongly enhanced STAT3 transactivation and SIE-inducible genes expression compared to full-length AR expression, despite no variation between ARQ640X and ARWT protein expression. IPA through mRNA array demonstrated a specific transcriptome profile due to ARQ640X expression and CMPrSC exposure onto LNCaP cells ("640p/640m" and "640p/C3p" groups) characterized by cell proliferation, cell-cell interaction, EMT and migration, with a positive STAT3 up-regulation. To further explore invasion and migration functions, we analyzed ITGB2, S100A4 and LOX expression although our core analysis with IPA, using "PCa in cell-model" fields, did not identify these genes in a specific cell function or network because their relationship with PCa is not currently described. However, mRNA array confirmed their enhanced fold change with ARQ640X and CMPrSC and their position as "Top molecules" in IPA. We confirmed by RT-qPCR experiments that truncated AR variant ARQ640X and PrSC's secreted factors-within among IL6- enhanced ITGB2 and S100A4 expression, thus promoting cell motility, cell migration (Huttenlocher and Horwitz 2011), EMT (Stein, et al. 2006), tumor development and

metastasis (Grum-Schwensen, et al. 2005). Moreover, the ARQ640X–induced LOX up-regulation highlighted the impact of the constitutively active truncated ARQ640X on cell invasion, migration, metastasis and EMT (Mayorca-Guiliani and Erler 2013). Other signaling pathways such as IGF-1R, EGFR, PDGFR lead to STAT3 activation, and analyzing their role might be of interest in the understanding mechanisms of STAT3 activation.

In conclusion, prostate stromal cells and epithelial tumor cells expressing constitutively active AR variants co-operate via STAT3/IL6 pathway to promote PCa progression. Targeting STAT3/IL6 pathway in PCa patients harboring constitutively active AR variants may be an interesting therapeutic field.

Declaration of interest

The authors have declared that no conflicts of interest exist.

Funding

This work was supported by the University of Strasbourg; the Ligue Contre le Cancer, the Alsace Contre le Cancer; and the Association pour la Recherche sur les Tumeurs Prostatiques (ARTP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgements

We thank Doulaye Dembele at IGBMC, Strasbourg, France for mRNA array's statistical analysis and IPA use. We thank Charline Ratomponirina and Erwan Pencreach at CHU Hautepierre, Strasbourg, France for dosage of IL6 in CMPrSC.

References

Azevedo A, Cunha V, Teixeira AL & Medeiros R 2011 IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol* 2 384-396.

Bergerat JP & Ceraline J 2009 Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum Mutat* 30 145-157.

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

Ceraline J, Cruchant MD, Erdmann E, Erbs P, Kurtz JE, Duclos B, Jacqmin D, Chopin D & Bergerat JP 2004 Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int J Cancer* 108 152-157.

Chen T, Wang LH & Farrar WL 2000 Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 60 2132-2135.

Cottard F, Asmane I, Erdmann E, Bergerat JP, Kurtz JE & Ceraline J 2013 Constitutively active androgen receptor variants upregulate expression of mesenchymal markers in prostate cancer cells. *PLoS One* 8 e63466.

Culig Z 2003 Role of the androgen receptor axis in prostate cancer. *Urology* 62 21-26.

Culig Z 2004 Androgen receptor cross-talk with cell signalling pathways. *Growth Factors* 22 179-184.

Damber JE 2005 Endocrine therapy for prostate cancer. *Acta Oncol* 44 605-609.

Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL & Tindall DJ 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.

Dorff TB, Goldman B, Pinski JK, Mack PC, Lara PN, Jr., Van Veldhuizen PJ, Jr., Quinn DI, Vogelzang NJ, Thompson IM, Jr. & Hussain MH 2010 Clinical and correlative results of SWOG S0354: a phase II trial of CNT0328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 16 3028-3034.

George DJ, Halabi S, Shepard TF, Sanford B, Vogelzang NJ, Small EJ & Kantoff PW 2005 The prognostic significance of plasma interleukin-6 levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 9480. *Clin Cancer Res* 11 1815-1820.

Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukanidin E & Ambartsumian N 2005 Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res* 65 3772-3780.

Hobisch A, Rogatsch H, Hittmair A, Fuchs D, Bartsch G, Jr., Klocker H, Bartsch G & Culig Z 2000 Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue. *J Pathol* 191 239-244.

Hudes G, Tagawa ST, Whang YE, Qi M, Qin X, Puchalski TA, Reddy M, Cornfeld M & Eisenberger M 2013 A phase 1 study of a chimeric monoclonal antibody against interleukin-6, siltuximab, combined

with docetaxel in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest New Drugs* 31 669-676.

Huttenlocher A & Horwitz AR 2011 Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 a005074.

Lapouge G, Erdmann E, Marcias G, Jagla M, Monge A, Kessler P, Serra S, Lang H, Jacqmin D, Bergerat JP, et al. 2007 Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harboring a new class of androgen receptor mutation--a new paradigm for cooperation among prostate tumor cells. *Int J Cancer* 121 1238-1244.

Lee SO, Lou W, Johnson CS, Trump DL & Gao AC 2004 Interleukin-6 protects LNCaP cells from apoptosis induced by androgen deprivation through the Stat3 pathway. *Prostate* 60 178-186.

Lin DL, Whitney MC, Yao Z & Keller ET 2001 Interleukin-6 induces androgen responsiveness in prostate cancer cells through up-regulation of androgen receptor expression. *Clin Cancer Res* 7 1773-1781.

Marcias G, Erdmann E, Lapouge G, Siebert C, Barthelemy P, Duclos B, Bergerat JP, Ceraline J & Kurtz JE 2010 Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCa) cell line. *Hum Mutat* 31 74-80.

Masuda M, Wakasaki T, Suzui M, Toh S, Joe AK & Weinstein IB 2010 Stat3 orchestrates tumor development and progression: the Achilles' heel of head and neck cancers? *Curr Cancer Drug Targets* 10 117-126.

Matsuda T, Junicho A, Yamamoto T, Kishi H, Korkmaz K, Saatcioglu F, Fuse H & Muraguchi A 2001 Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 283 179-187.

Mayorca-Guiliani A & Eler JT 2013 The potential for targeting extracellular LOX proteins in human malignancy. *Onco Targets Ther* 6 1729-1735.

McEwan IJ 2012 Intrinsic disorder in the androgen receptor: identification, characterisation and drugability. *Mol Biosyst* 8 82-90.

Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M & Shiina M 2012 IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 122 143-159.

Mueller MM & Fusenig NE 2004 Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4 839-849.

Myung JK, Banuelos CA, Fernandez JG, Mawji NR, Wang J, Tien AH, Yang YC, Tavakoli I, Haile S, Watt K, et al. 2013 An androgen receptor N-terminal domain antagonist for treating prostate cancer. *J Clin Invest* 123 2948-2960.

Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakura H & Murai M 2000 Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6 2702-2706.

Reebye V, Frilling A, Habib NA & Mintz PJ 2011 Intracellular adaptor molecules and AR signalling in the tumour microenvironment. *Cell Signal* 23 1017-1021.

Sansone P & Bromberg J 2010 Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *J Clin Oncol* 30 1005-1014.

Simons SS, Jr. & Kumar R 2013 Variable steroid receptor responses: Intrinsically disordered AF1 is the key. *Mol Cell Endocrinol* 376 81-84.

Sivashanmugam P, Tang L & Daaka Y 2004 Interleukin 6 mediates the lysophosphatidic acid-regulated cross-talk between stromal and epithelial prostate cancer cells. *J Biol Chem* 279 21154-21159.

Stein U, Arlt F, Walther W, Smith J, Waldman T, Harris ED, Mertins SD, Heizmann CW, Allard D, Birchmeier W, et al. 2006 The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* 131 1486-1500.

Suzuki H, Ueda T, Ichikawa T & Ito H 2003 Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 10 209-216.

Teixeira AL, Ribeiro R, Morais A, Lobo F, Fraga A, Pina F, Calais-da-Silva FM, Calais-da-Silva FE & Medeiros R 2009 Combined analysis of EGF+61G>A and TGFB1+869T>C functional polymorphisms in the time to androgen independence and prostate cancer susceptibility. *Pharmacogenomics J* 9 341-346.

Ueda T, Bruchofsky N & Sadar MD 2002 Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem* 277 7076-7085.

Uemura H, Ishiguro H, Nagashima Y, Sasaki T, Nakaigawa N, Hasumi H, Kato S & Kubota Y 2005 Antiproliferative activity of angiotensin II receptor blocker through cross-talk between stromal and epithelial prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 4 1699-1709.

Wallner L, Dai J, Escara-Wilke J, Zhang J, Yao Z, Lu Y, Trikha M, Nemeth JA, Zaki MH & Keller ET 2006 Inhibition of interleukin-6 with CNT0328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchiectomized mice. *Cancer Res* 66 3087-3095.

Ware KE, Garcia-Blanco MA, Armstrong AJ & Dehm SM 2014 Biologic and clinical significance of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 21 T87-T103.

Yamamoto T, Sato N, Sekine Y, Yumioka T, Imoto S, Junicho A, Fuse H & Matsuda T 2003 Molecular interactions between STAT3 and protein inhibitor of activated STAT3, and androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 306 610-615.

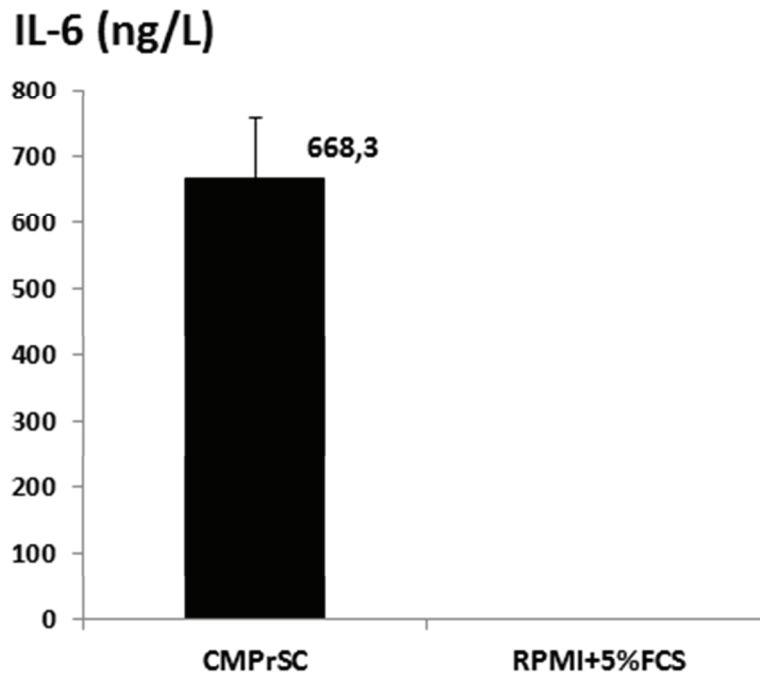


Figure 1: Dose of interleukin-6 in CMPrSC. PrSC were seeded in T75 plates at 5.10^5 cells in SCGM medium during 48h and then exposed to RPMI-1640 complete medium containing 5% of decompemented FCS during 48h to constitute CMPrSC. IL6 quantification was realized using an enzyme-labeled chemiluminescent sequential immunometric assay (Immulite 1000®, Siemens). RPMI-1640 + 5% FCS was used for control medium. Experiments were repeated in triplicate. CMPrSC contains a significant dose of interleukin-6 (median: 668.3 ng/L, sem=91) compared to control culture medium (dose <2ng/L, $p=0.009$), demonstrating that PrSC secrete IL6.

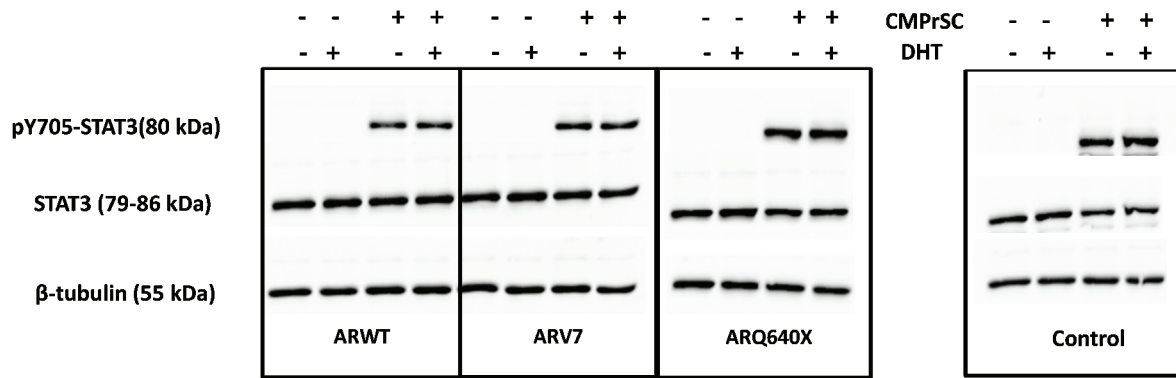


Figure 2a: Effect of CMPrSC exposure on pSTAT3 and STAT3 protein expression in LNCaP cells. LNCaP cells were transfected with plasmids encoding for pE-ARQ640X, pE-ARV7, pE-ARWT or empty plasmid (Control) during 24h in RPMI+10nM DHT or Ethanol 100% and then exposed to CMPrSC or control culture medium (RPMI+5%FCS) during 48h. Total proteins were isolated from cells and analyzed by immunoblot for pY705-STAT3 and STAT3 accumulation. β-tubulin was used for control. Experiments were repeated in triplicate. pY705-STAT3 protein expression is present with CMPrSC exposure. No signal variation was observed with truncated AR variants or DHT.

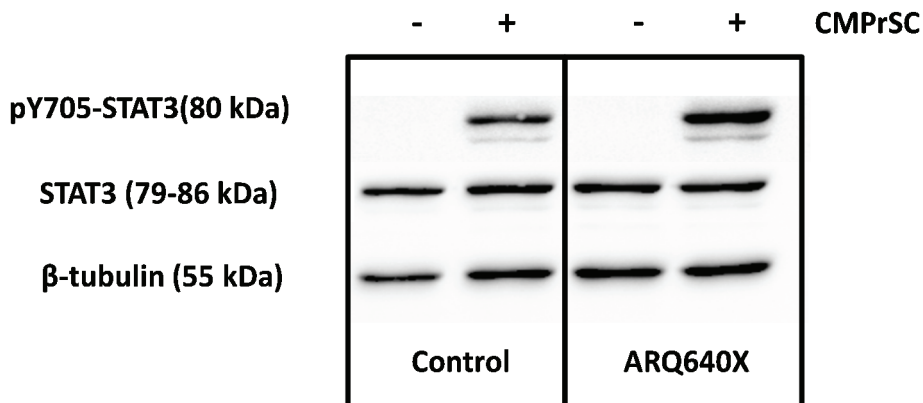


Figure 2b: Effect of CMPrSC exposure on pSTAT3 and STAT3 protein expression in C4-2b cells. C4-2b cells were transfected with plasmids encoding for pE-ARQ640X, empty plasmid (Control) during 24h in RPMI+10nM DHT and exposed to CMPrSC or control culture medium during 48h. Total proteins were isolated from cells and analyzed by immunoblot for pY705-STAT3 and STAT3 accumulation. β-tubulin was used for control. pY705-STAT3 protein expression is present with CMPrSC exposure.

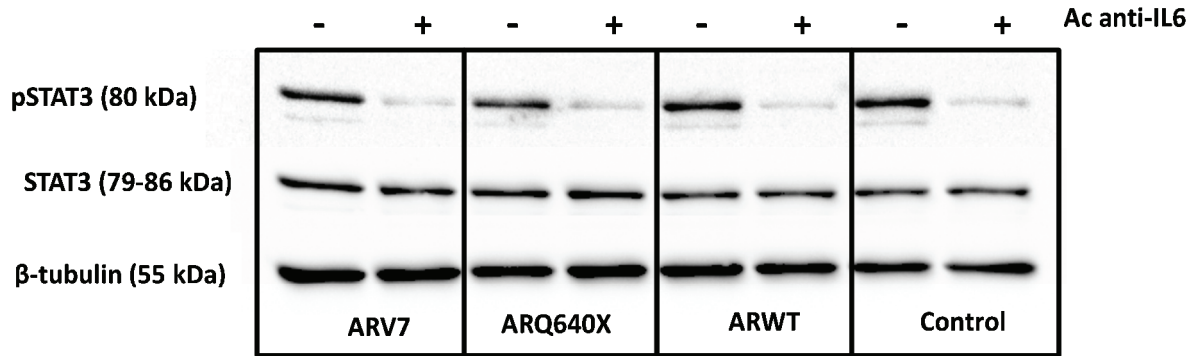


Figure 2c: Effect of Ac-anti-IL6 on CMPrSC exposure on pSTAT3 and STAT3 protein expression. LNCaP cells were transfected with plasmids encoding pE-ARV7, pE-ARQ640X, pE-ARWT or empty plasmid (Control) during 24h in RPMI+10nM DHT and then exposed to CMPrSC+Ac anti-IL6 (5µg/mL) or isotype during 48h. Total proteins were isolated from cells and analyzed by immunoblot for pY705-STAT3 and STAT3 accumulation. β-tubulin was used for control. pY705-STAT3 was strongly inhibited with Ac anti-IL6 was added to CMPrSC, thus confirming that STAT3 activation is related to IL6 in CMPrSC. No modification in STAT3 total form quantity was observed.

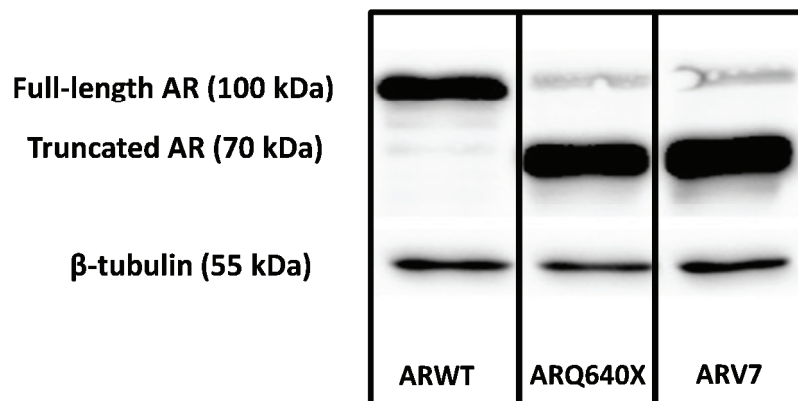


Figure 2d. Effect of CMPrSC exposure on AR protein expression. LNCaP cells were transfected with plasmids encoding pE-ARV7, pE-ARQ640X, pE-ARWT during 24h in RPMI+10nM DHT and then exposed to CMPrSC during 48h. Total proteins were isolated from LNCaP cells and analyzed by immunoblot for AR accumulation. β-tubulin was used for control. Experiments were repeated in triplicate. Transfection led to expression of the truncated ARs variants ARQ640X and ARV7 (70kDa) and the full-length endogenous ARWT (100kDa). Similar expression of the truncated ARs and the ARWT was observed.

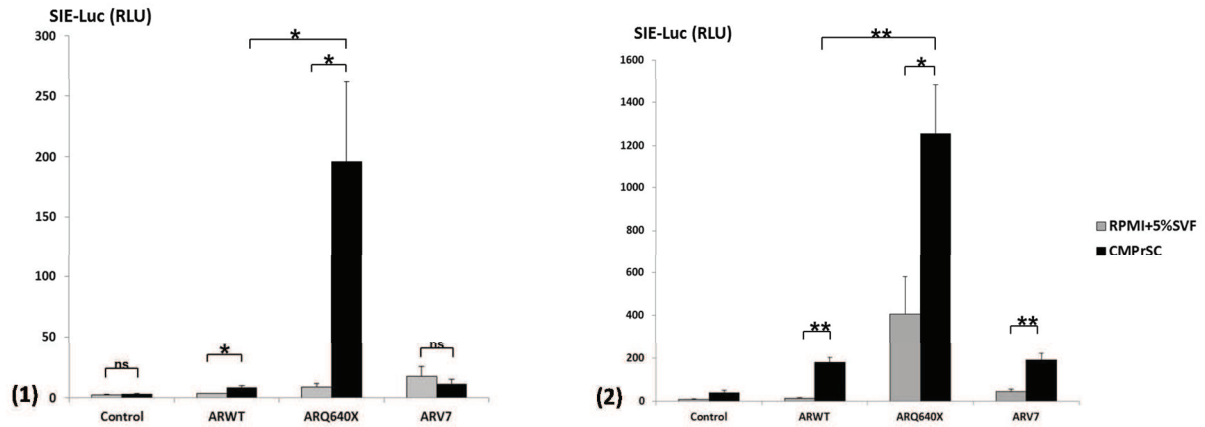


Figure 3a: Effect of CMPrSC exposure on STAT3 transactivation and SIE-inducible genes expression. Relative luciferase activity assays of luciferase reporter with pE-SIE-Luc were performed in LNCaP (1) and C4-2b cells (2) after co-transfection with pE-ARV7 or pE-ARQ640X or pE-ARWT or empty (Control) plasmids in RPMI+ 10 nM DHT during 24h and exposure to CMPrSC during 48h. Firefly luciferase activity was determined 72h after transfection and normalized to the Renilla luciferase activity. * $p < 0.05$ by the Student t-test. SIE-Luciferase activity was significantly enhanced with CMPrSC exposure, and specifically when expressing the truncated AR variant ARQ640X expression in LNCaP and C4-2b cells ($r=21.9$, $p=0.03$ (1) and $r=3$, $p=0.04$ (2), respectively) or the ARV7 in C4-2b cells ($r=4.2$, $p=0.001$ (2)).

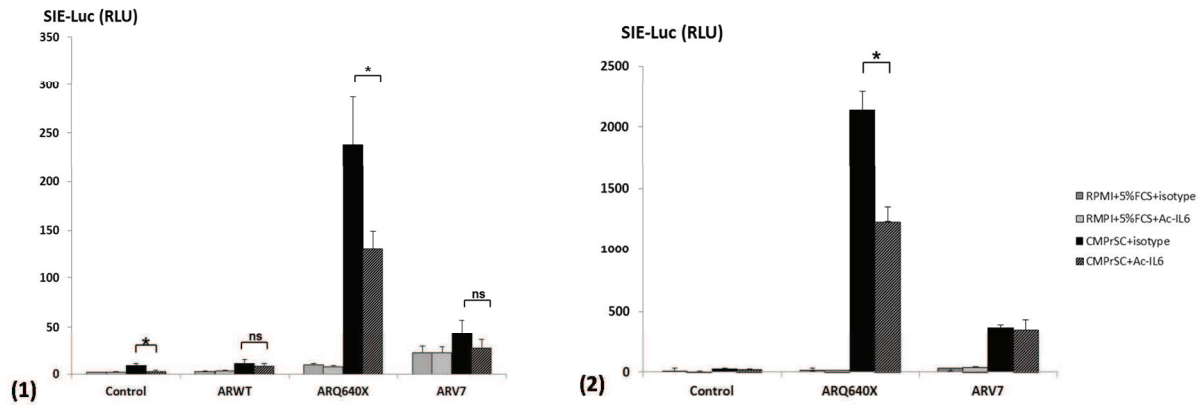


Figure 3b: Effect of Ac-anti-IL6 on CMPrSC exposure on STAT3 transactivation and SIE-inducible genes expression. Relative luciferase activity assays of luciferase reporter with pE-SIE-Luc were performed in LNCaP (1) and C4-2b cells (2) after cotransfection with pE-ARV7 or pE-ARQ640X or pE-ARWT or empty (Control) plasmids during 24h and exposure to CMPrSC+ 5µg/mL of Ac-anti-IL6 or isotype, and control culture medium (RPMI+5%FCS+ Ac-anti-IL6 or isotype) during 48h. Firefly luciferase activity was determined 72h after transfection and normalized to the Renilla luciferase activity. * p<0.05 by the Student t-test.

SIE-Luciferase activity decreased when Ac-anti-IL6 was added to CMPrSC in LNCaP and C4-2b cells expressing the truncated AR variant ARQ640X (r=1.8, p=0.02 (1) and r=1.9, p=0.006 (2), respectively)

Top Molecules	CMPrSC impact « C3p/C3m »	ARQ640X impact « 640m/C3m »	CMPrSC+ARQ640X impact « 640p/640m » « 640p/C3p »	
ITGB2	ns	3.005	11.206	35.118
LOX	1.776	9.855	1.911	10.378
S100A4	ns	ns	4.514	5.596

Figure 4a: Effect of CMPrSC exposure and ARQ640X expression on ITGB2, LOX, S100A4 and STAT3 transcriptional expression using mRNA array. Results are expressed in fold change (FC)

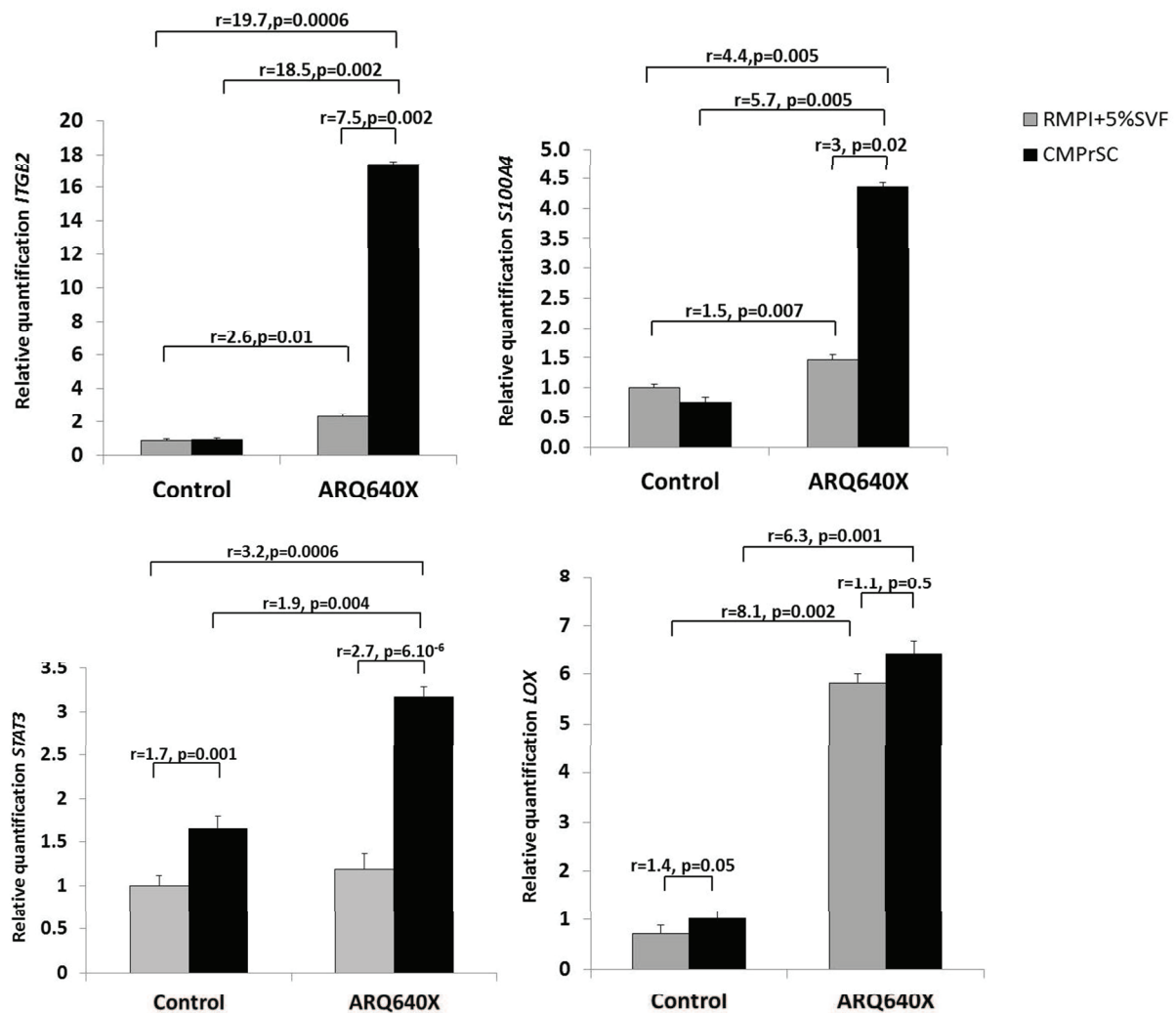


Figure 4b: Effect of CMPrSC exposure and ARQ640X expression on ITGB2, LOX, S100A4 and STAT3 transcriptional expression.

LNCaP cells were transfected with plasmids encoding for pE-ARQ640X or empty plasmid (control) during 24h, and exposed to CMPrSC or control culture medium (RPMI+5%FCS) during 48h before total mRNA extraction. Real-time RT-qPCR was performed with primers encoding for ITGB2, LOX, S100A4 or STAT3 and PBGD. As reference, control LNCaP cells exposed to control culture medium were used. Experiments were repeated in triplicate. Values are expressed as means +/- SEM. ITGB2, S100A4 and STAT3 expression increased with CMPrSC exposure and ARQ640X. LOX expression increased with ARQ640X but not with CMPrSC. r=ratio, p was calculated by the Student t-test.

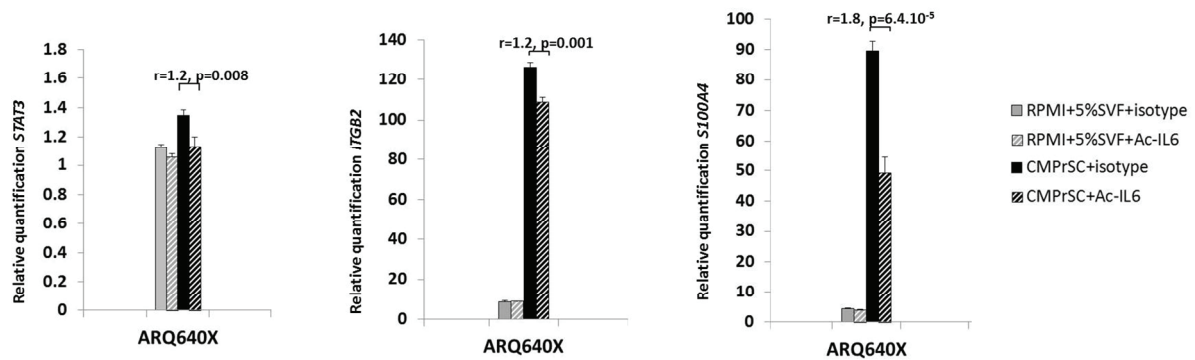


Figure 5: Effect of Ac-anti-IL6 on STAT3, ITGB2 and S100A4 transcriptional expression. LNCaP cells were transfected with plasmids encoding for pE-ARQ640X during 24h, and exposed to CMPrSC + Ac-anti-IL6 or isotype or CTL medium (RPMI+5%FCS) + Ac-anti-IL6 or isotype during 48h before total mARN extraction. Real-time RT-qPCR was performed with primers encoding for STAT3, ITGB2 or S100A4 and PBGD. As reference, LNCaP cells transfected for the empty plasmid pE-C3 and exposed to control culture medium+isotype were used. Experiments were repeated in triplicate. Values are expressed as means +/- SEM. In LNCaP-ARQ640X cells, STAT3, ITGB2 and S100A4 expression decreased with Ac-anti-IL6 in CMPrSC. r =ratio, p was calculated by the Student t-test.

	Molecular and cellular functions		
	Name	p value	Molecules
CMPrSC impact « C3p/C3m »	Cell death and survival	2.71E ⁻³ <p< 4.47E ⁻²	N=18 <i>within among STAT3</i> N=8
	Cell movement	1.59.E ⁻² <p<4.06.E ⁻²	
ARQ640X impact « 640m/C3m »	Transformation of prostate cancer cell lines	7.84E ⁻³	N=3
	Generation of reactive oxygene species. Entry into phase S	1.68E ⁻² <p<4.6E ⁻²	N=4
CMPrSC+ARQ640X impact « 640p/640m » « 640p/C3p »	Cell development and movement	3.88E ⁻³ <p< 9.05E ⁻³	N=32 <i>within among STAT3</i>
	Cell-cell interaction, EMT, migration	1.79E ⁻³ <p<1.66E ⁻²	
	Top Networks		
	N°	Name	Score
CMPrSC impact « C3p/C3m »	1	Cellular development, growth and proliferation. Cell death and survival	9
	3	Cellular Movement <i>within among STAT3</i>	6
ARQ640X impact « 640m/C3m »	1	Cellular development, growth and proliferation. Cancer	13
	2	Cellular development, growth and proliferation. Cell cycle	11
	3	Cell death and survival, tumor morphology. Cancer. <i>within among STAT3</i>	3
CMPrSC+ARQ640X impact « 640p/640m » « 640p/C3p »	1	Cell death and survival. Cell morphology <i>within among STAT3</i>	15
	1	Cellular development, growth and proliferation. Cancer	8
	3	Cell death and survival. Cellular development, growth and proliferation <i>within among STAT3</i>	5

Table 1: Molecular, cellular functions and Top networks due to effect of CMPrSC exposure, ARQ640X or both on LNCaP cells using IPA after mRNA array. ARQ640X expression promotes transformation of prostate cancer cell lines with pathways involved in cell growth and proliferation. CMPrSC exposure combined to ARQ640X promote tumor progression with EMT, migration and invasion. STAT3 expression is related to CMPrSC exposure and ARQ640X expression.

VII.A. Impact de la voie de l'interleukine-6 dans la coopération épithélio-stromale privilégiée impliquant les variants tronqués autonomes du RA

VII.A.a. L'augmentation de pSTAT3 liée à l'exposition au CMPrSC

VII.A.a.i Dosage de pSTAT3-Y705 et STAT3 dans les LNCaP

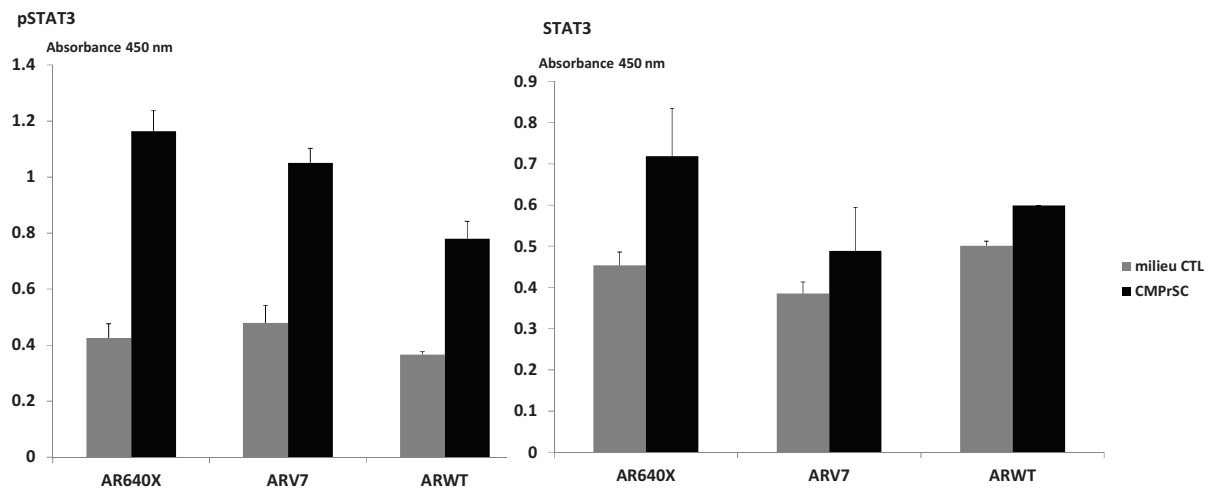


Figure 17: Dosage de pSTAT3 et STAT3 par ELISA dans LNCaP transfectées par des plasmides codant pour le RAQ640X, RAWT ou RAV7 et exposées 48h au CMPrSC ou milieu contrôlé.

Afin de conforter les résultats d'analyse protéique obtenus par immunoblots de pSTAT3, nous avons réalisé un dosage par ELISA dans les LNCaP exprimant les variants constitutifs du RA et exposées au milieu conditionnée par les PrSC ou non.

L'expérience a été réalisée en duplicat pour pSTAT3 et une seule fois pour STAT3 total (cf. Figure 17).

Nous avons ainsi pu confirmer que pSTAT3 était augmenté en présence de CMPrSC dans les LNCaP exprimant les variants tronqués ou le RAWT (activé par la DHT), avec peut-être un effet prédominant en présence des variants RAQ640X ($r=2.7$) et RAV7 ($r=2.2$) qu'en présence du RAWT ($r= 2.1$), sans que cela puisse être comparé à l'aide d'un test statistique, en raison du faible nombre d'expériences. La quantité de STAT3 total était peu modifiée par l'exposition au CMPrSC comparé au milieu contrôle, sans pouvoir mettre en évidence de différence dans les LNCaP exprimant le RAQ640X.

Ainsi, les dosages de pSTAT3 confirment les résultats des immunoblots, à savoir une augmentation de pSTAT3 dans les LNCaP exposées au CMPrSC, sans différentiel lié à l'expression des variants tronqués du RA.

VII.A.a.ii Distribution cellulaire de pSTAT3 dans les LNCaP

Après avoir mis en évidence une augmentation de pSTAT3 liée au CMPrSC, nous avons étudié la distribution cellulaire de pSTAT3 dans les lignées cellulaires épithéliales exprimant les variants constitutivement actifs, afin de savoir si une localisation nucléaire préférentielle de pSTAT3 était possible en présence des variants.

L'analyse par immunoblots dans des fractions protéiques nucléaires (cf. Figure 18) et cytoplasmiques (cf. Figure 19) a permis de mettre en évidence qu'en plus d'une localisation cytoplasmique, il existe une distribution nucléaire de cette augmentation de pSTAT3-Y705 en présence de CMPrSC, en faveur d'un rôle actif de pSTAT3 dans la transcription de gènes cibles. Nous n'avons pas pu mettre en évidence dans ces expériences d'effet régulateur de l'expression des variants tronqués RAQ640X ou RAV7 par rapport au RA endogène.

En immunofluorescence, le marquage de pSTAT3-Y705 n'a pas permis de mettre en évidence une localisation spécifique, étant trop diffus et difficilement analysable, malgré des essais d'optimisation technique par perméabilisation membranaire (données non présentées).

Nous pouvons conclure que l'exposition au CMPrSC des cellules épithéliales de type LNCaP et C4-2b conduit à l'augmentation de pSTAT3-Y705 –sans variation de STAT3- en immunoblots et ELISA, sans effet spécifique lié à l'expression des variants RAQ640X et RAV7 par rapport au RAWT. Cette augmentation de pSTAT3-Y705 est aussi nucléaire et est liée à la sécrétion d'IL-6 par les PrSC.

Cependant, il existe un impact positif de l'activité SIE-luciférase en présence de RAQ640X et de CMPrSC, dans les LNCaP, C4-2b et 22RV1, en faveur d'une transactivation de STAT3 privilégiée par rapport au RAWT (cf. Figure 3a, article en cours de rédaction). Ce n'est pas donc par augmentation quantitative de pSTAT3-Y705 que cette transactivation privilégiée liée au RAQ640X se fait, mais probablement par une augmentation de son activation.

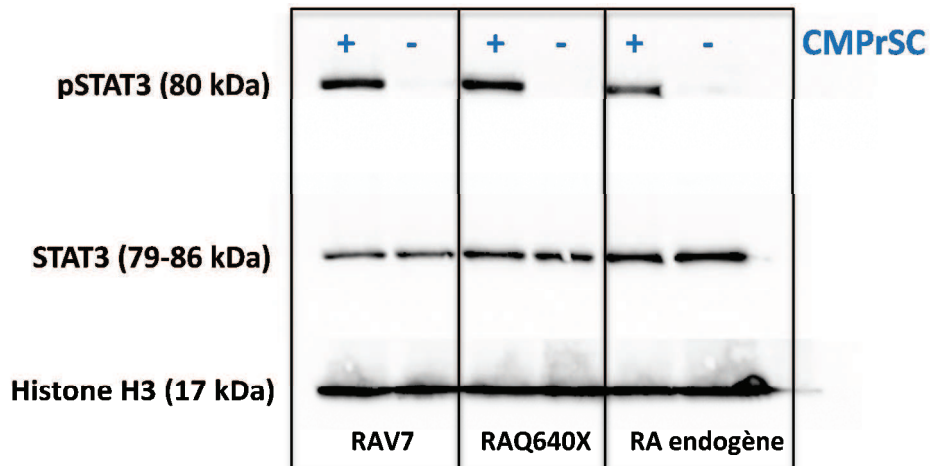


Figure 18: Expression de pSTAT3 dans des extraits protéiques nucléaires.

Les LNCaP étaient transfectées pour les plasmides codants pour le RAQ640X, le RAV7 ou le RAWT et exposées au CMPrSC pendant 48h. L'extraction protéique avec fractionnement a permis d'isoler les fractions nucléaires et de réaliser un marquage de pSTAT3, STAT3 et l'histone H3 (contrôle nucléaire) sur immunoblots.

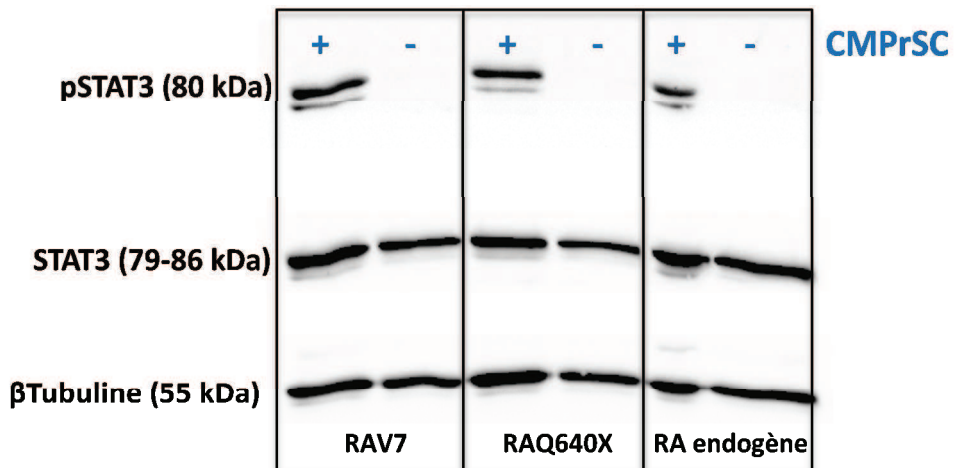


Figure 19: Expression de pSTAT3 dans des extraits protéiques cytoplasmiques.

Même expérience que décrite dans la figure 18. L'extraction protéique avec fractionnement a permis d'isoler les fractions cytoplasmiques et de réaliser un marquage de pSTAT3, STAT3 sur immunoblots.

VII.A.a.iii Etude de la transactivation de STAT3 et de l'interaction STAT3-RA

Afin de confirmer que l'activité SIE-Luciférase observée était bien liée à une transactivation de STAT3, nous avons effectué des tests SIE- luciférase dans les C4-2b transfectées pour les plasmides codant pour les RAQ640X et RAWT, puis exposées à des doses croissantes de Stattic (5 et 10 μ M) ou contrôle (DMSO) pendant 1h, puis au CMPrSC ou milieu CTL. La mesure de l'activité luciférase, un test de prolifération cellulaire et des extractions protéiques ont alors été réalisés en triplicat.

Nous avons évalué une potentielle cytotoxicité de Stattic par des tests de prolifération cellulaire effectués en parallèle des tests luciférase et extractions protéiques. Ainsi, la cytotoxicité de Stattic était évaluée entre 0 et 10% à 5 μ M et entre 0 et 20% à 10 μ M ; ce que nous avons considéré comme acceptable. La concentration de 20 μ M était jugée cytotoxique avec une diminution de plus de 50% de la population cellulaire.

L'activité SIE-luciférase était diminuée significativement en présence de Stattic, de façon dose-dépendante et d'autant plus importante dans les C4-2b exprimant le RAQ640X que dans les cellules exprimant le RAWT ($r=2.06$ versus $r=1.69$ à 5 μ M et $r=6.5$ versus $r=4.26$ à 10 μ M) (cf. Figure 20). L'augmentation protéique de pSTAT3 liée au CMPrSC était également diminuée en présence de Stattic, et de façon dose-dépendante, lorsqu'analysée en immunoblot (cf. Figure 21).

Différentes approches ont été développées pour inhiber sélectivement STAT3, dont l'identification et la synthèse de petites molécules non-peptidiques inhibant STAT3 via une liaison directe à son domaine SH2 (Src homology 2). Stattic a ainsi montré une inhibition sélective de la fonction du domaine SH2 de STAT3, quelque soit l'état de phosphorylation, permettant ainsi d'inhiber l'activation, la dimérisation et la translocation nucléaire de STAT3^{176, 177}. Ainsi, l'augmentation de l'activité SIE-Luciférase et de pSTAT3-Y705 liée à l'exposition des cellules épithéliales tumorales au CMPrSC était fortement inhibée par Stattic, de façon dose-dépendante et « privilégiée » avec l'expression de RAQ640X. Donc l'activation de STAT3 dans les cellules épithéliales tumorales exposées au CMPrSC est bien responsable d'une hyperactivité SIE-luciférase et donc d'une transactivation de STAT3.

Des études ont montré qu'après sa translocation nucléaire, pSTAT3 se lie directement au domaine N-terminal du RA activé qui va agir comme un coactivateur transcriptionnel pour STAT3¹⁷⁸ en libérant STAT3 de son complexe inhibiteur STAT3-PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated STAT3) via une compétition physique protéine-protéine pour promouvoir la transactivation de STAT3¹⁷⁹. Ainsi, notre

hypothèse est celle d'un rôle des variants constitutivement actifs du RA dans l'augmentation de la transactivation de STAT3 (induite par l'exposition au CMPrSC) via une plus grande stabilité physico-chimique de l'interaction protéine-protéine ou via le recrutement de différents co-activateurs transcriptionnels.

Afin d'affirmer une interaction protéique entre les RA et STAT3, nous avons effectué une expérience de co-immunoprécipitation dans les extraits nucléaires de LNCaP exprimant les RAQ640X, RAV7 ou RAWT et exposées au CMPrSC. Nous avons ainsi pu confirmer qu'il existait bien une interaction protéique entre le RAWT, RAQ640W ou RAV7 et STAT3 total en présence de CMPrSC (cf. Figure 22), mais n'avons pu visualiser clairement les complexes RA-pSTAT3 en raison d'un smir lors du marquage par pSTAT3 (données non présentées).

Si nos résultats de transactivation sont clairs avec l'expression du RAQ640X et avec d'autres types de variants résultant de mutations non-sens dans les LNCaP et C4-2b, et même dans les 22RV1 (cf. Figure 23), ils l'étaient moins avec le RAV7. En effet, nous n'avons pas confirmé d'augmentation significative de la transactivation de STAT3 avec l'expression du RAV7 au cours des différents réplicats d'expériences. Nos hypothèses concernant l'effet différentiel sur la transactivation de STAT3 selon le type de variant tronqué constitutivement actif sont :

- Les mécanismes sous-tendant la transactivation de STAT3 pourraient être différents entre le RAQ640X (résultant de mutations non-sens) et les variants d'épissage tels que le RAV7. En effet, le RAV7 ne possède pas de domaine HR contrairement au RAQ640X et ne peut probablement pas interagir avec le complexe STAT3-PIAS3 avec la même affinité et la même « facilité » que le RAQ640X.
- Par ailleurs, nous pouvons également émettre l'hypothèse d'une interaction différente entre le RAV7 et le RAQ640X au niveau de leurs interactions avec les coactivateurs transcriptionnels (du fait de la plasticité du domaine NTD, caractérisé comme une IDP – intrinsically disordered protein) et donc de la transactivation de STAT3. Nous n'avons pas identifié de données spécifiques rapportées sur les diverses conformations possibles que peuvent adopter ces variants constitutivement actifs et sur leur interaction avec les différents partenaires des complexes transcriptionnels.
- L'importance du modèle cellulaire choisi. Il faut en effet souligner que dans les 22RV1, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la transactivation de STAT3 en présence de RAV7 (cf. Figure 23).

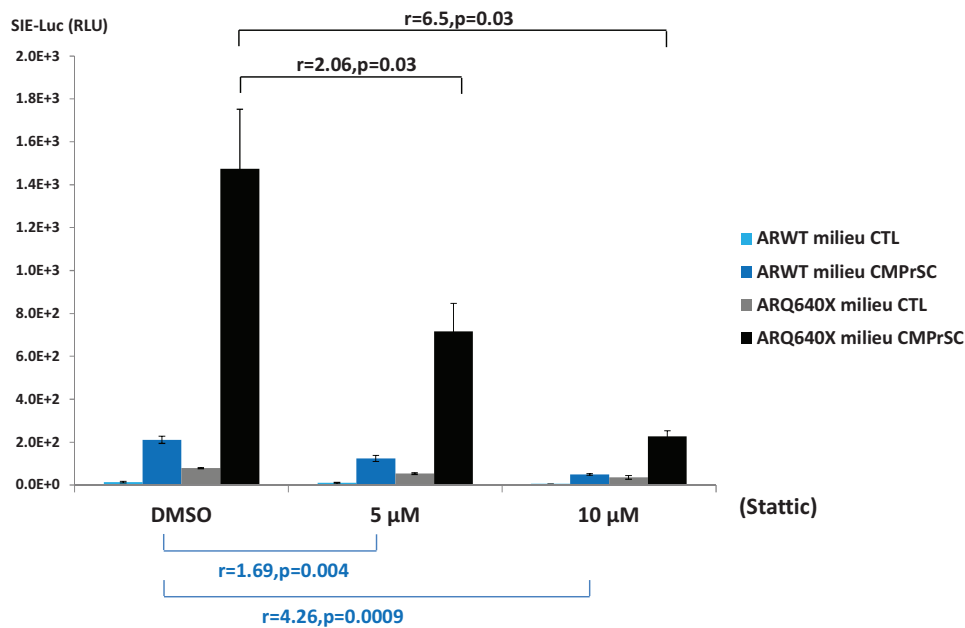


Figure 20: Effet de l'inhibition de l'activité de STAT3 sur l'activité SIE-luciférase dans les C4-2b exprimant le RAQ640X.

Les C4-2b étaient transfectées par les plasmides codant pour le RAQ640X ou RAWT ou SIE-Luciférase et Renilla, et exposées à Stat3 (inhibiteur de l'activation de STAT3) aux concentrations de 5 μ M et 10 μ M pendant 1h puis au CMPrSC pendant 12h.

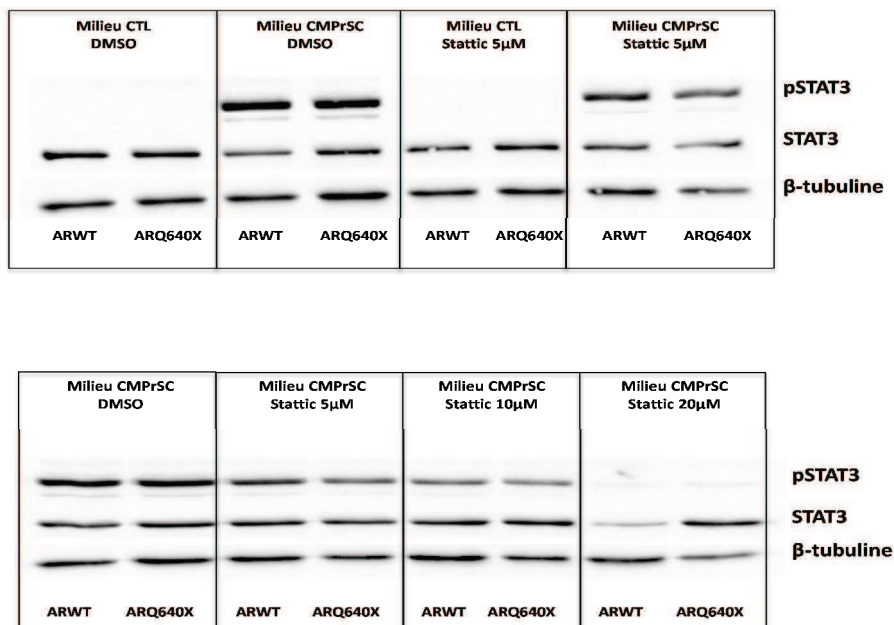


Figure 21: Effet de l'inhibition de l'activité de STAT3 sur l'expression de pSTAT3-Y705 et STAT3 dans les C4-2b exprimant le RAQ640X.

Les C4-2b étaient transfectées par les plasmides codant pour le RAQ640X ou RAWT et exposées à Stat3 (inhibiteur de l'activation de STAT3) aux concentrations de 5 μ M, 10 μ M et 20 μ M pendant 1h puis au CMPrSC pendant 12h.

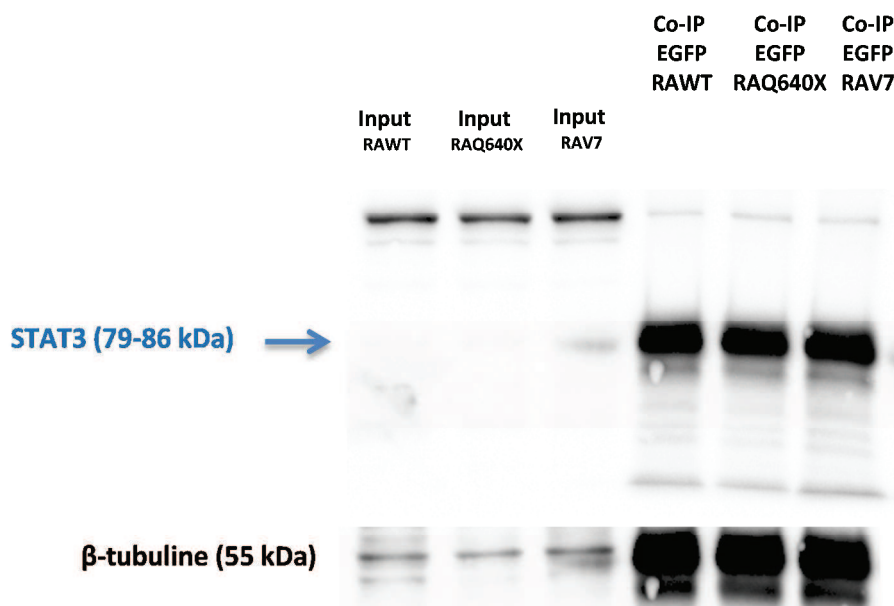
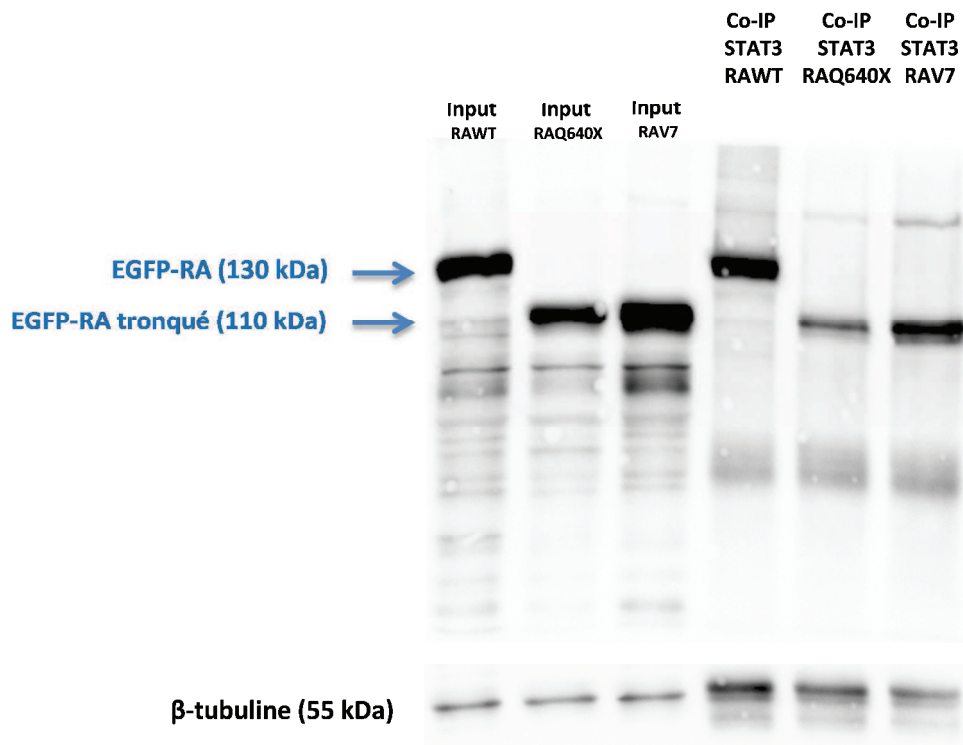


Figure 22: Interaction entre les RAQ640X, RAV7, RAW7 et STAT3 total dans des extraits protéiques nucléaires de LNCaP.

Les LNCaP étaient transfectées par les plasmides codant pour le RAQ640X-EGFP, RAV7-EGFP ou RAWT-EGFP puis exposées au CMPrSC pendant 6h avant extraction protéique nucléaire et marquage par les anticorps anti-EGFP ou anti-STAT3.

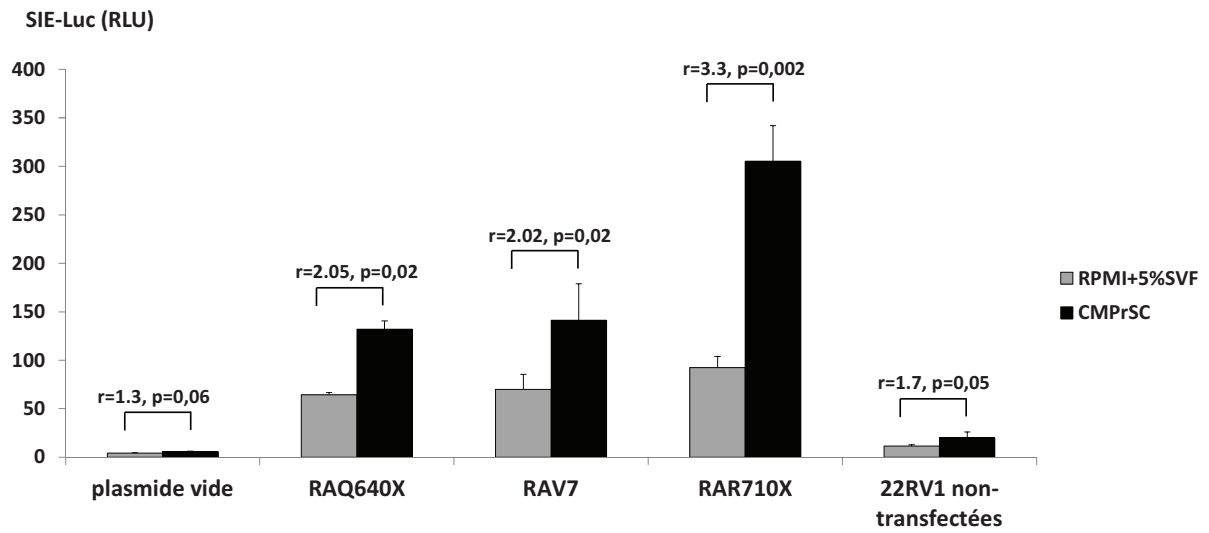


Figure 23: Effet de l'exposition au CMPrSC pendant 48h sur l'activité SIE-luciférase dans les 22RV1 transfectées pour les plasmides codant pour le RAQ640X ou RAV7 ou RAR710X ou le plasmide vide.

VII.A.b. Etude des autres effecteurs de la cascade de la voie de l'interleukine-6 pouvant expliquer l'augmentation de pSTAT3 en présence de CMPrSC et l'augmentation de la transactivation de STAT3 en présence de CMPrSC et de RA tronqués constitutivement actifs

Notre hypothèse est celle d'une coopération épithélio-stromale impliquant les cellules épithéliales exprimant les RA tronqués et participant à la progression tumorale prostatique. Nous avons mis en évidence que parmi les facteurs sécrétés par les PrSC, l'IL-6 est responsable d'une augmentation de pSTAT3 et participe à une augmentation de la transactivation de STAT3 dans les cellules exprimant les variants tronqués du RA et exposées au CMPrSC. Nous avons donc voulu savoir si en présence du RAQ640X, un effecteur de la cascade de la voie de l'IL-6, situé en amont de STAT3, pouvait expliquer l'augmentation de la transactivation de STAT3. Nous avons donc étudié l'expression des récepteurs de l'IL-6 et des protéines JAK.

gp130 et gp80

L'IL-6 se lie à gp80-membranaire (IL-6Rm) puis se dimérise avec gp130 pour former le complexe fonctionnel IL-6/gp80/gp130. Gp80 peut se présenter sous la forme d'une portion soluble, qui est le sIL-6R -portion soluble qui a perdu la partie intracytoplasmique de gp80m- résultant soit du clivage enzymatique de gp80m par ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase 17) soit d'épissage alternatif. Ainsi, l'IL-6 peut aussi se lier à sIL-6R puis se lier à gp130 pour former un autre complexe IL-6/sgp80/gp130 et permettre la transduction du signal. La portion soluble de gp130, sgp130, a un rôle de régulateur négatif de la transmission du signal par ce complexe IL-6/sIL-6R/gp130 en se liant à IL-6/sIL-6R et empêcher sa liaison à mgp130. Sgp130 est donc un régulateur physiologique de la voie de l'IL-6¹⁸⁰.

Nous avons donc étudié l'expression de gp130 (cf. Figure 24 et Figure 25) et gp80 par immunoblots. Dans les LNCaP exprimant le RAQ640X ou RAV7 ou RAWT (activé par la DHT) ou le plasmide vide (p-E-C3) et exposées 48h au CMPrSC ou milieu contrôle, gp130 était identifié dans les extraits protéiques totaux (cf. Figure 24) et membranaires (cf. Figure 25), malgré de nombreux marquages aspécifiques, et sans qu'il soit possible de mettre en évidence un différentiel entre les conditions CMPrSC/contrôle et/ou variants tronqués/RAWT. Les immunoblots à la recherche de l'expression de gp80 n'étaient pas interprétables en raison de nombreux marquages non-spécifiques et d'un bruit de fond important (données non présentées). Néanmoins, après analyse par RT-qPCR de *GP130* dans des échantillons de LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC (cf. Figure 26), nous avons pu démontrer

une augmentation de *GP130* en présence de CMPrSC et uniquement dans les LNCaP exprimant le RAQ640X ($r=3.4$, $p=5.4.10^{-6}$ comparé au RAQ640X avec milieu contrôle et $r=2.9$, $p=3.5.10^{-5}$ comparé au RA endogène avec CMPrSC). Cette régulation positive de l'expression de *GP130* liée au CMPrSC et à l'expression de RAQ640X est en faveur de notre hypothèse de coopération épithélio-stromale privilégiée entre les PrSC et les variants tronqués, impliquant la voie de l'IL-6.

L'étude protéique de ces effecteurs du complexe-récepteur de l'IL-6 est à réaliser dans un autre modèle cellulaire avec transfection stable des variants tronqués, afin d'avoir un niveau d'expression des variants tronqués qui permette la mise en évidence de variation d'expression selon les conditions testées.

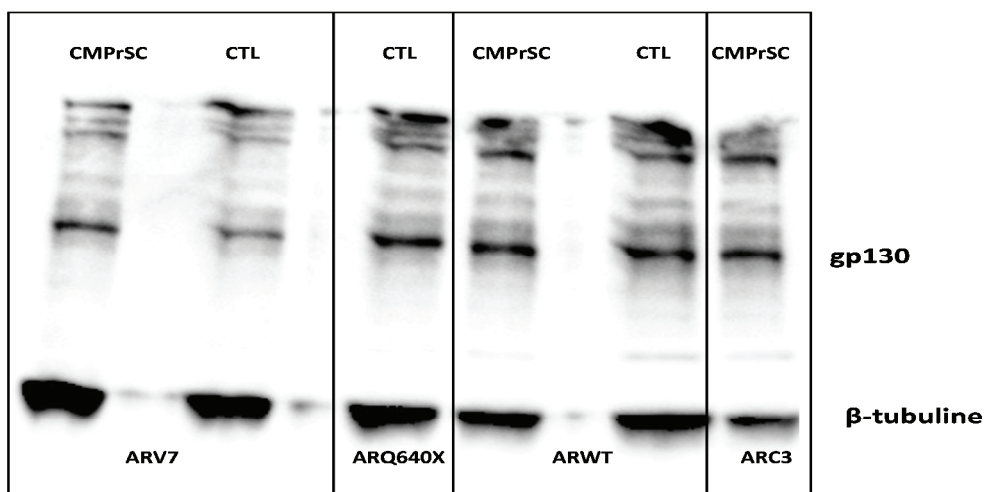


Figure 24: Expression de gp130 dans des extraits protéiques totaux.

Les LNCaP étaient transfectées par les plasmides codant pour le RAQ640X ou RAV7 ou RAWT ou plasmide vide (p-E-C3) et exposées au CMPrSC ou milieu contrôle pendant 48h avec extraction protéique et immunoblots avec marquage de gp130.

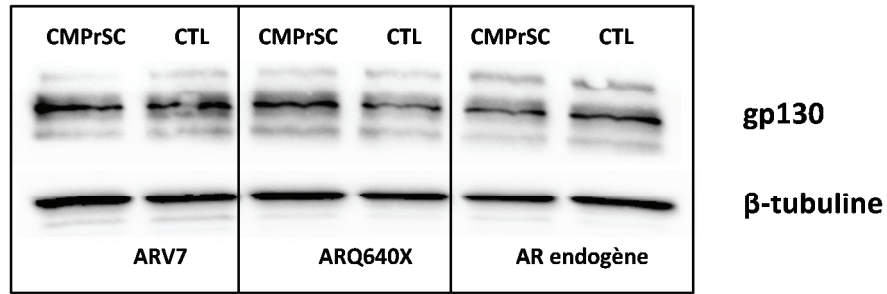


Figure 25: Expression de gp130 dans des extraits protéiques membranaires.

Les LNCaP étaient transfectées par les plasmides codant pour le RAQ640X ou RAV7 ou RAWT ou plasmide vide (p-E-C3) et exposées au CMPrSC ou milieu contrôle pendant 48h avec extraction et fractionnement protéique et immunoblots avec marquage de gp130.

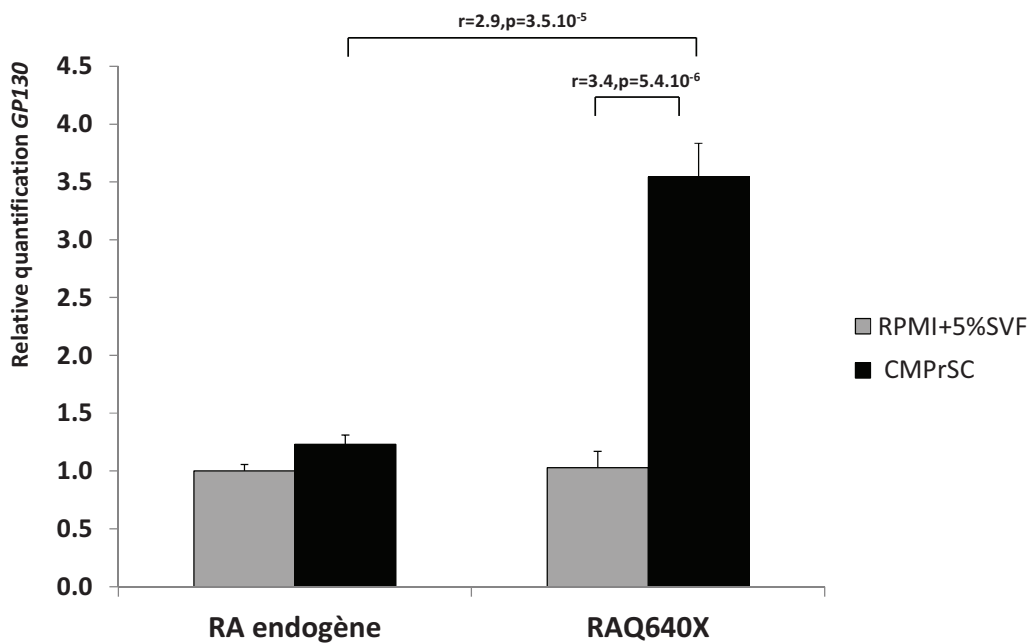


Figure 26: Expression transcriptionnelle de *GP130* par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.

On observe une augmentation de *GP130* liée à l'exposition au CMPrSC et à l'expression du RAQ640X.

JAK

La dimérisation du complexe-récepteur de l'IL-6 permet le recrutement des protéines JAKs, résultant en une activation mutuelle. Les JAKs activées phosphorylent les résidus tyrosines du domaine cytoplasmique de gp130 et gp130 qui active en retour les JAKs permet ainsi l'activation de la transduction du signal de l'IL-6 par deux voies : la voie des MAPK et la voie JAK/STAT. Les protéines JAKs (JAK1 ou JAK2 le plus souvent) activées par gp130 vont activer STAT3 via une phosphorylation activatrice, notamment en Tyr705, puis permettre la formation de dimères STATs qui vont transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles.

Nous avons donc étudié l'expression des JAKs dans notre modèle cellulaire de LNCaP, avec des difficultés de mise en évidence de JAK1, JAK3 en immunoblots, ne permettant pas une interprétation des résultats (données non présentées). L'expression de JAK2 et pJAK2 a pu être analysée en immunoblots dans des extraits protéiques membranaires, avec une expression stable de JAK2 et une expression très faible de pJAK2, sans possibilité d'interprétation de variation de signal étant donné le marquage peu concluant et l'importance du bruit de fond (cf. Figure 27).

L'étude protéique des JAKs est à réaliser dans un autre modèle cellulaire, avec transfection stable des variants tronqués, afin de pouvoir analyser leur expression et variation d'expression.

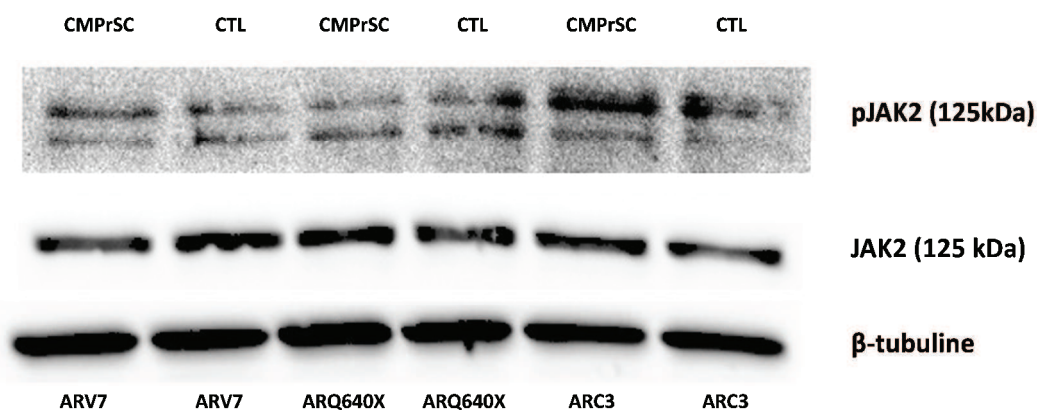


Figure 27: Expression de JAK2 dans des extraits protéiques membranaires.

Les LNCaP étaient transfectées par les plasmides codant pour le RAQ640X ou RAV7 ou plasmide vide (p-E-C3) et exposées au CMPrSC ou milieu contrôle pendant 48h avec extraction et fractionnement protéique et immunoblots avec marquage de pJAK2 ou JAK2.

Tyrosine kinase Fer

Fer est une tyrosine kinase de 94 kDa, non-récepteur, qui contient un domaine central SH2 et une extrémité C-terminale tyrosine kinase, impliquée dans la survie cellulaire des cellules tumorales prostatiques via son interaction avec pSTAT3-Y705, gp130. Fer médie la transduction du signal d'IL-6 via STAT3¹⁸¹. De plus, Fer a été décrite comme intervenant dans l'activation du RA liée au signal de l'IL-6 par phosphorylation du RA en tyrosine 223 et liaison via son domaine SH2, permettant une co-localisation nucléaire de pSTAT3-Y705, RA et Fer¹⁸².

Nous avons étudié l'expression de Fer par immunoblots à partir d'extraits protéiques totaux de LNCaP dans notre modèle cellulaire. L'expression de Fer était bien identifiée dans toutes les conditions, sans variation selon la DHT ou l'exposition au CMPrSC ou l'expression de RAQ640X (cf. Figure 28). Il faudrait étudier l'activité SIE-Luciférase en inhibant l'activité kinase de Fer afin d'étudier son rôle dans notre modèle.

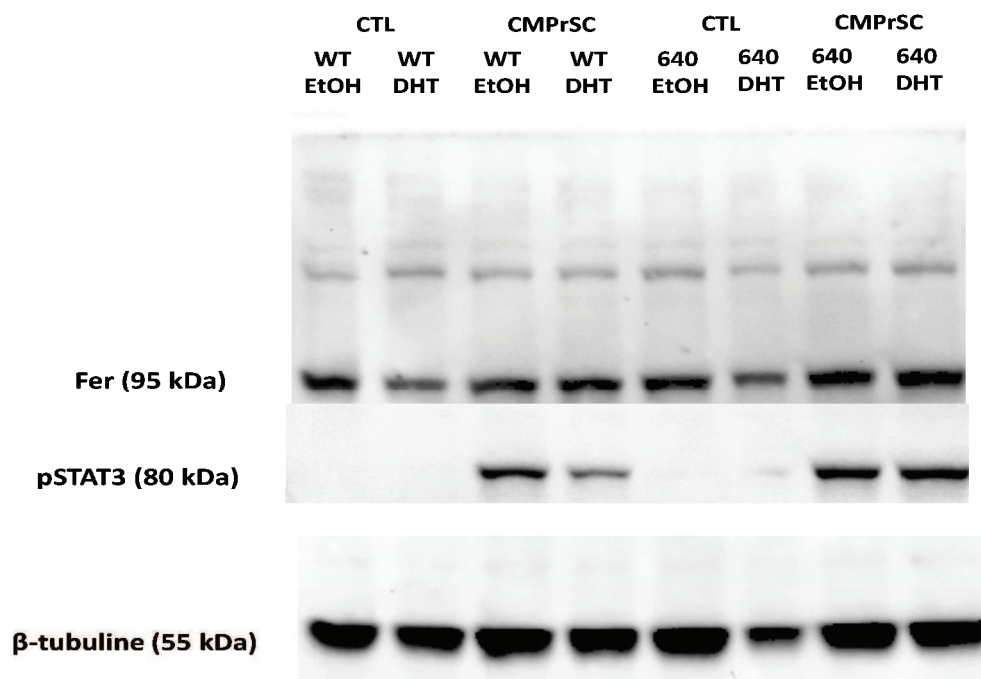


Figure 28: Expression de Fer tyrosine kinase dans des extraits protéiques totaux.

Les LNCaP étaient transfectées par les plasmides codant pour le RAQ640X ou RAWT et exposées au CMPrSC +/- DHT ou milieu contrôle +/- DHT pendant 48h avec extraction et immunoblots avec marquage de Fer ou pSTAT3.

Bien que STAT3 et STAT5 contribuent tous les deux à la prolifération des cellules tumorales et à la survie cellulaire, un des arguments pour considérer STAT3 comme cible prometteuse pour les thérapies anti-cancéreuses est son rôle crucial dans les cellules stromales, dans les cellules immunitaires recrutées au sein du stroma tumoral pour promouvoir la progression tumorale^{183, 184}. De façon intéressante, l'activation de STAT3 fonctionne aussi comme un potentiel « immune checkpoint » pour des réponses immunitaires dans de multiples cancers^{185, 186}.

Malgré l'importance établie de STAT3 dans les cellules tumorales et les cellules stromales, il persiste encore de nombreuses incompréhensions dans les mécanismes reliant les régulateurs d'amont et la signalisation intracellulaire médiée par JAK-STAT3¹⁸⁷. En plus de ses rôles bien connus dans la promotion de la prolifération tumorale, de la survie, de l'invasion tumorale, de l'angiogenèse et de l'immunosuppression, la voie JAK-STAT3 a récemment démontré avoir un rôle central dans :

- le cancer médié par l'inflammation, l'obésité et/ou le métabolisme^{185, 184},
- les cellules souches cancéreuses et la formation des niches pré-métastatiques,
- la régulation de l'expression des gènes via les mécanismes épigénétiques comme la méthylation de l'ADN et la modulation de la chromatine,
- la régulation des fonctions mitochondriales.

En dépit des arguments précliniques pour inhiber STAT3, les thérapies n'ont pas porté de résultats cliniques probants à ce jour, en raison notamment de la difficulté à inhiber STAT3. En effet, STAT3 n'a pas d'activité enzymatique propre et possède un réseau complexe d'activateurs ainsi que de fonctions biologiques. Ainsi, comprendre la biologie sous-tendue par STAT3 est capital pour développer des approches thérapeutiques efficaces. Au-delà de la description traditionnelle des cytokines et facteurs de croissance, dernièrement, ont été décrits comme voies d'activation de JAK-STAT :

- Les TLRs (toll-like receptors) comme TLR9 et TLR4¹⁸⁸ : ils activent JAK-STAT avec en retour STAT3 qui régule positivement l'expression de certaines TLRs dans les cellules tumorales, favorisant ainsi la progression^{189, 190},
- Les miRNAs^{191, 192} : dans la régulation de la voie JAK-STAT,
- Les RCPG (récepteurs couplés à la protéine G) interviennent dans la régulation de cette voie, via les kinases JAK et Src^{193, 166}.

L'IL-6 est l'activateur le plus connu et le mieux identifié de STAT3. L'IL-6 exerce ses effets biologiques via l'activation de son complexe récepteur qui résulte en l'activation des JAKs, situées à côté des sites riches en proline de l'extrémité cytoplasmique de gp130. L'activation des JAKs aboutit en retour à la phosphorylation de gp130 pour permettre le recrutement et l'activation de STAT3. pSTAT3 activé va alors transloquer dans le noyau pour notamment activer la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, la formation de niches tumorales pré-métastatiques, l'invasion tumorale, notamment via la régulation des gènes *LOX* et *CXCR4*¹⁸⁷.

Nous avons tenté d'étudier les propriétés fonctionnelles tumorales acquises par cette coopération épithélio-stromale privilégiée impliquant les variants constitutivement actifs du RA et les PrSC, par l'étude de l'expression de gènes cibles d'intérêt dans la progression tumorale prostatique, et par une analyse du transcriptome des LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.

VII.B. Mise en évidence d'un profil transcriptomique spécifique

Nous avons donc analysé les données du transcriptome des LNCaP exprimant le RAQ640X ou le plasmide contrôle et exposées au CMPrSC ou milieu contrôle pendant 48h, par mRNA array et logiciel IPA.

Après avoir déterminé les 4 groupes d'intérêt, comme détaillé auparavant, nous avons réalisé 2 types d'analyse des réseaux de signalisation dans IPA :

- Une première analyse, en prenant les références nommées « *prostate cancer* » dans IPA, et avec un $1.2 \leq FC \leq -1.2$. Cette analyse est détaillée dans l'article ci-dessus (analyse A)
- Une seconde analyse, en prenant les références nommées « *all human* » dans IPA, et avec un $2 \leq FC \leq -2$, afin d'élargir l'analyse et de ne pas la limiter aux descriptions référencées dans IPA comme reliées au cancer de la prostate (analyse B).

Les cibles retenues par ces deux analyses sont complémentaires, et la plupart était retrouvée dans chaque analyse. Pour compléter les résultats présentés auparavant dans l'article en cours de rédaction, nous présentons ci-après d'autres fonctions et gènes cibles potentiels d'intérêt liés à un effet du CMPrSC seul, du RAQ640X seul ou du CMPrSC/RAQ640X conjoints, avec les résultats confirmés par RT-qPCR pour la plupart d'entre eux.

VII.B.a.i Effet isolé du CMPrSC sur les LNCaP exprimant ou non le RAQ640X

Nous avons identifié certains gènes comme potentiellement d'intérêt parmi ceux identifiés dans le 1^{er} réseau lors des analyses faites soit dans « *prostate cancer* » (analyse A), soit dans « *all human* » (analyse B). Ainsi, les fonctions cellulaires dédiées au « métabolisme des lipides, transport moléculaire, et biochimie des petites molécules » et au « développement cellulaire, croissance cellulaire, prolifération, survie et mort cellulaire » figuraient parmi les principales fonctions (cf. Tableau 2).

Les gènes identifiés comme d'intérêt étaient nombreux, et nous avons retenu –en plus de ceux présentés auparavant dans l'article en cours de rédaction- des gènes impliqués dans l'invasion tumorale et la dissémination métastatique comme *TFNSF10* (tumor necrosis factor ligand superfamily member 10) et *GDF15* (growth differentiation factor 15), et des gènes impliqués dans les

mécanismes de réparation de l'ADN comme *GADD45A* (growth arrest and DNA-damage inducible α) et *DDIT3* (DNA-damage inducible transcript 3).

GDF15 -également connu sous le nom de MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine 1), est un des membres de la famille des protéines GDF, et un membre de la superfamille de TGF β . GDF15 participe au développement prénatal et à la régulation de la réponse cellulaire à l'inflammation et la réparation tissulaire lors des blessures aiguës chez l'adulte. GDF15 a également été décrit comme impliqué dans la progression tumorale, l'invasion et le syndrome cachectique de nombreux cancers⁶³. Il a été décrit comme hyper-régulé pendant la progression tumorale prostatique et son expression était corrélée avec la survenue de métastases osseuses¹⁹⁴. Dans le développement normal du squelette, l'administration de GDF15 recombinant induit la formation de cartilage et la formation précoce d'os endochondral¹⁹⁵. Récemment, GDF15 a été décrit comme exprimé par les cellules tumorales épithéliales prostatiques et était responsable par effet paracrine de l'induction d'une différenciation ostéoblastique sur les cellules stromales, via SMAD1/5^{196, 197}, en faveur du rôle de GDF15 dans la dissémination métastatique avec différenciation osseuse.

En analysant par RT-qPCR l'hyper-expression de *GDF15* identifiée dans le transcriptome, nous avons pu confirmer une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *GDF15* liée au CMPrSC, dans les LNCaP avec le RA endogène, comparé au milieu contrôle ($r=2.2$, $p=2.8.10^{-6}$) et surtout dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC, comparé au milieu contrôle ($r=2$, $p=0,0008$), sans effet du RAQ640X propre (cf. Figure 29).

TNFSF10 ou encore TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) est le ligand du récepteur de mort cellulaire qui a la faculté d'initier préférentiellement l'apoptose dans les cellules tumorales de façon sélective car induit un minimum de toxicité pour les cellules saines malgré une expression basale importante dans plusieurs tissus. C'est un des membres de la superfamille des TNF.

En analysant par RT-qPCR l'hyper-expression de *TNFSF10* identifiée dans le transcriptome, nous avons pu confirmer une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *TNFSF10* liée au CMPrSC, dans les LNCaP avec le RA endogène, comparé au milieu contrôle ($r=1.5$, $p=0.006$) et surtout dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC, comparé au milieu contrôle ($r=1.9$, $p=0,001$), avec également un léger effet propre du RAQ640X dans les LNCaP exposées au CMPrSC ($r=1.3$, $p=0,03$) (cf. Figure 30).

Networks	Score	Top functions	Top molecules	FC
1	46	Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry	TNFSF10	2.9
			CXCL12	2.2
			FOS	3.9
			COL12A1	2.1
			S100A8	5
			S100A9	3.4
1	9	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Cell Death and Survival	GADD45A	1.3
			GDF15	1.7
			DDIT3	1.8

analyse A
analyse B

Tableau 2: Effet du CMPrSC après analyse du transcriptome par mRNA array et IPA. Exemple de gènes identifiés dans les 2 premiers réseaux dans les analyses A et B.

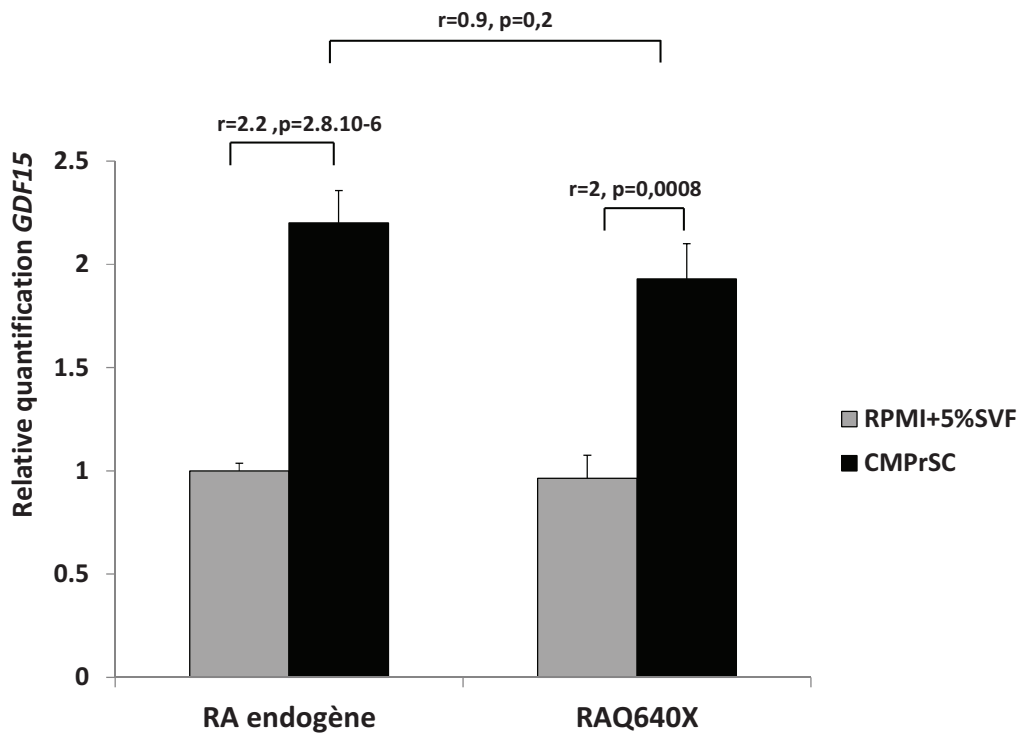


Figure 29: Expression transcriptionnelle de *GDF15* par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.

DDIT3 est un membre des C/EBPs (CCAAT/enhancer-bindings) et est également appelé C/EBP protéine homologue ou CHOP ou GADD153. Le stress au niveau du réticulum endoplasmique joue un rôle important dans l'apoptose induite par les drogues anti-cancéreuses et *DDIT3* est un gène dont l'expression est induite par le stress du réticulum endoplasmique : c'est un médiateur clé de l'apoptose induite par le stress du RE dans plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes et les lymphocytes. DDIT3 se lie à l'ADN via une séquence unique et exerce son rôle de transactivateur, notamment comme facteur de transcription pour augmenter l'expression de TNFSF10-R via une interaction avec le complexe AP-1 (au niveau de pJUN) et déclencher l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique ¹⁹⁸. Il régule également l'expression transcriptionnelle de protéines apoptotiques ¹⁹⁹. AP-1 est composé d'homodimère ou d'hétérodimère appartenant à Jun (JUN, JUNB et JUND) et Fos (FOS, FOSB, FOSL1 et FOSL2). DDIT3 interagit avec les membres du facteur de transcription AP-1 et augmente l'activité transcriptionnelle des gènes cibles d'AP-1 ¹⁹⁹. Ainsi, DDIT3 et AP-1 coopèrent pour augmenter la transcription de TNFSF10-R.

En analysant par RT-qPCR l'hyper-expression de *DDIT3* identifiée dans le transcriptome, nous avons pu confirmer une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *DDIT3* liée au CMPrSC, dans les LNCaP avec le RA endogène, comparé au milieu contrôle ($r=2$, $p=6.6.10^{-8}$) et également dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC, comparé au milieu contrôle ($r=1.7$, $p=0,01$), sans effet spécifique du RAQ640X dans les LNCaP exposées au CMPrSC (cf. Figure 31).

En conclusion, l'effet du CMPrSC sur le transcriptome des LNCaP a pour conséquence une augmentation des voies cellulaires impliquées dans le métabolisme cellulaire, la prolifération et la survie cellulaire, mais aussi l'inflammation et la dissémination métastatique osseuse.

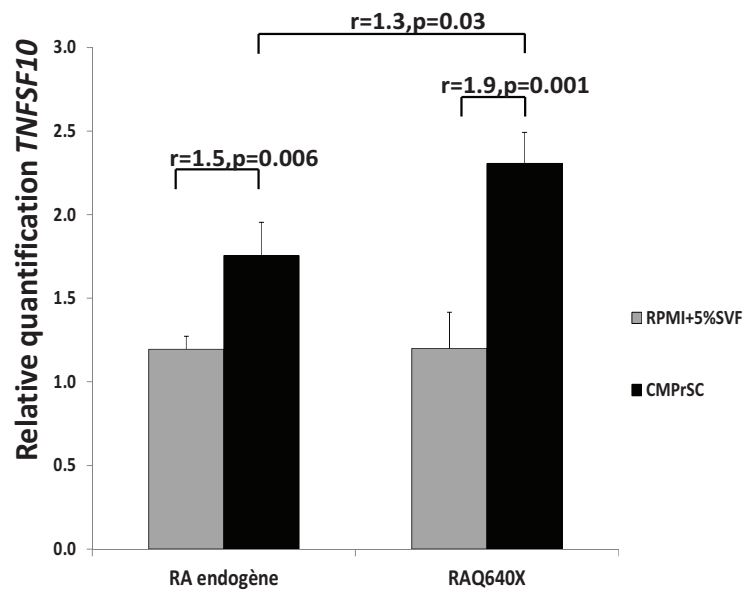


Figure 30: Expression transcriptionnelle de *TNFSF10* par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC.

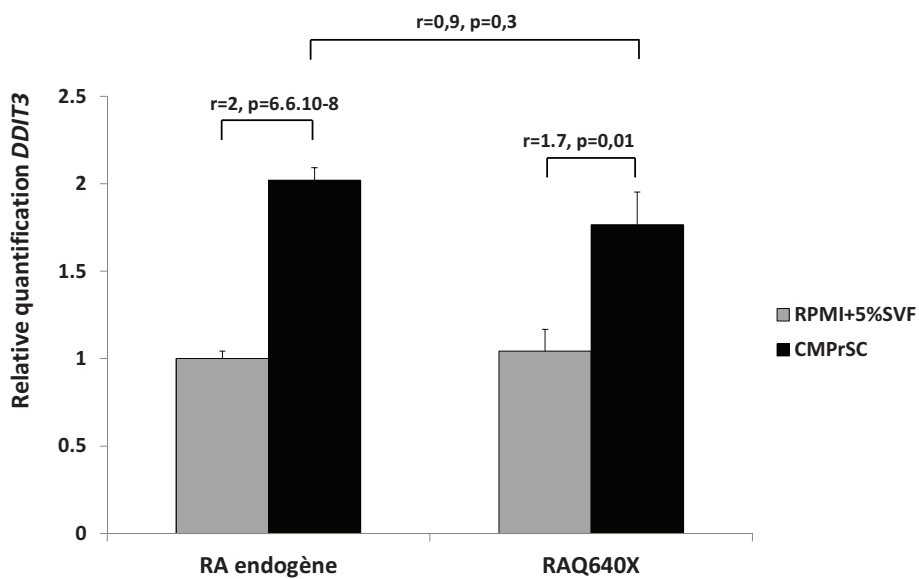


Figure 31: Expression transcriptionnelle de *DDIT3* par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC

VII.B.a.ii Effet isolé de l'expression du RAQ640X sur les LNCaP exposées ou non au CMPrSC

Nous avons identifié les fonctions cellulaires dédiées à la prolifération cellulaire, à l'inflammation, aux interactions cellulaires avec les tissus de soutien, et au développement cellulaire et tissulaire embryonnaire, ainsi qu'au développement tumoral (cf. Tableau 3).

Les gènes identifiés comme d'intérêt étaient nombreux, et nous avons décrit précédemment dans l'article en cours de rédaction, *LOX* comme gène majeur d'intérêt, avec un effet du CMPrSC quasi inexistant, et un effet du RAQ640X important, à la fois lorsque les LNCaP étaient exposées au milieu CTL ($r=8.1$, $p=0,002$) ou au CMPrSC ($r=6.3$, $p=0,001$) (cf. Figure 4b dans l'article en cours de rédaction).

LOX a été identifiée comme favorisant un milieu extracellulaire de type « fibreux » ou « robuste », permettant un environnement favorable à la croissance tumorale, l'invasion et la dissémination métastatique²⁰⁰. *LOX* participe également à la survie des cellules myéloïdes au niveau des sites métastatiques, sous l'action transactivatrice de STAT3, afin de rendre plus « hospitalières » les pré-niches métastatiques pour la dissémination des cellules épithéliales tumorales¹⁸⁷. Identifier ainsi dans cette analyse transcriptomique l'effet du RAQ640X sur l'augmentation transcriptionnelle de *LOX* contribue fortement à notre hypothèse d'impact précoce du variant constitutivement actif sur la progression tumorale et la dissémination métastatique prostatique.

Pour compléter cette analyse de gènes d'intérêt, nous avons retenu *TIPARP* (*TCCD-Inducible Poly(ADP) Ribose Polymerase*) qui catalyse la PARylation des histones et pourrait être impliquée dans la réponse cellulaire aux agressions chimiques métaboliques, *NCOA3* (Nuclear Receptor COactivator 3) qui est impliqué dans l'activation transcriptionnelle des gènes hormono-dépendants sous le contrôle des récepteurs nucléaires, *CXCR4* (chemokine-C-X-C Receptor 4), récepteur de CXCL12 et *PMEPA1* (Prostate Transmembrane Protein Androgen Induced 1) qui bloque l'interaction des voies du RA et du TGF β via les protéines SMAD.

TIPARP est un gène cible du RA, dont le promoteur contient des éléments de réponse aux androgènes, mais il existe peu de description de ses fonctions cellulaires. En analysant par RT-qPCR l'hyper-expression de *TIPARP* identifiée dans le transcriptome, nous avons pu confirmer une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *TIPARP* liée au RAQ640X, dans les LNCaP exposées au milieu contrôle ($r=8.8$, $p=0,008$) et également dans les LNCaP exposées au CMPrSC ($r=5.3$, $p=1.8.10^{-5}$), sans effet spécifique du CMPrSC.

Networks	Score	Top functions	Top molecules	FC
1	24	Cell to Cell Signaling and Interaction, Cellular Growth and Proliferation, Connective Tissue Disorders, Inflammatory Disease, Skeletal and Muscular Disorders	ORM1 LOX SERPINA3	34.9 9.9 3.5
2	22	Cellular Development, Embryonic Development, Cell Death and Survival	NANO G	2.5
1	13	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Cancer	HIF1A	1.4

■ analyse A
■ analyse B

Tableau 3: Effet du RAQ640X après analyse du transcriptome par mRNA array et IPA. Exemple de gènes identifiés dans les 2 premiers réseaux dans les analyse A et B.

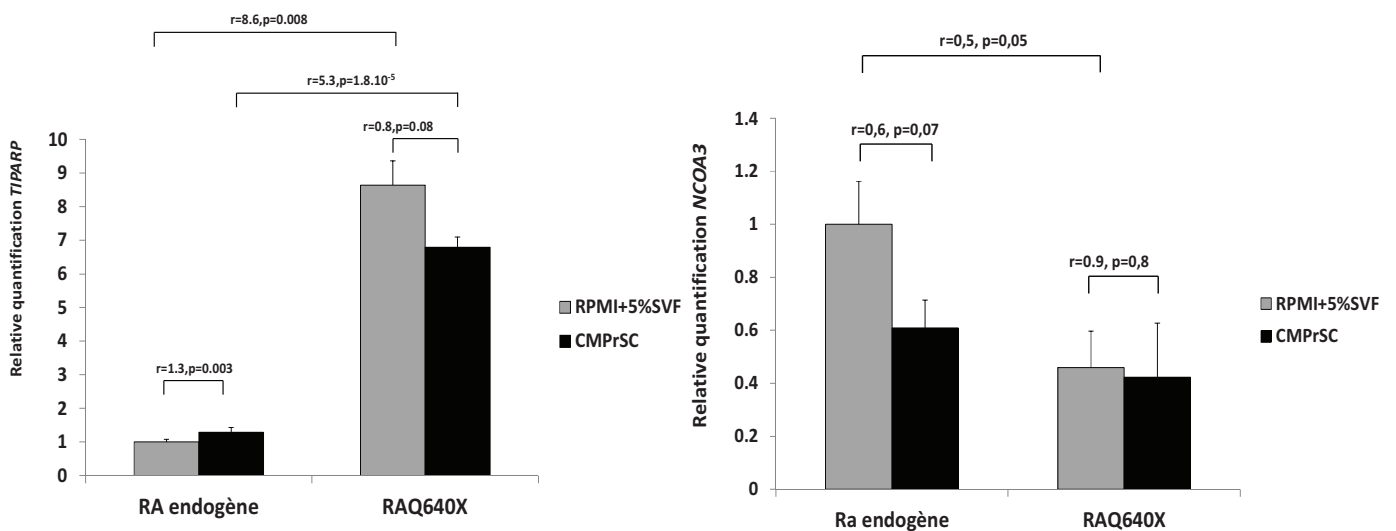


Figure 32: Expression transcriptionnelle de *TIPARP* et *NCOA3* par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC

NCOA3 a été rapporté récemment comme impliqué dans l'émergence du cancer de la prostate hormono-résistant ²⁰¹, ainsi que dans l'acquisition d'un phénotype agressif de cancer de la prostate, avec un rôle dans l'induction du phénotype neuroendocrine ²⁰¹. En analysant par RT-qPCR l'hyper-expression de *NCOA3* identifiée dans le transcriptome, nous avons pu confirmer une diminution de l'expression transcriptionnelle de *NCOA3* liée au RAQ640X, uniquement dans les LNCaP exposées au milieu contrôle ($r=0.5$, $p=0,05$) (cf. Figure 32). Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une régulation négative du RAQ640X sur ce coactivateur transcriptionnel du RA sauvage, afin de privilégier la transcription propre au RAQ640X, qui impliquerait peut-être de façon préférentielle d'autres co-activateurs transcriptionnels, et ainsi diminuerait la balance de l'expression de *NCOA3*.

En analysant par RT-qPCR l'hyper-expression de *CXCR4* identifiée dans le transcriptome, nous avons pu confirmer une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *CXCR4* liée au RAQ640X, uniquement dans les LNCaP exposées au milieu contrôle ($r=1.4$, $p=0,0008$) (cf. Figure 33). Il est à noter une probable diminution dans les LNCaP exprimant le RAQ640X quand exposées au CMPrSC versus milieu CTL ($r=0.8$, $p=0,03$). *CXCR4* est connu pour être associé à la dissémination métastatique osseuse du cancer de la prostate ²⁰² et *CXCR4* serait impliqué dans la migration tumorale des LNCaP via une hétérodimérisation avec *CXCR7*-dont l'expression est AR régulée- qui intervient dans la réponse cellulaire au signal de *CXCL12* pour promouvoir la migration cellulaire tumorale ²⁰³. Ainsi, le RAQ640X pourrait réguler positivement l'expression de *CXCR4* et contribuer à cette migration *CXCL12-CXCR7* dépendante.

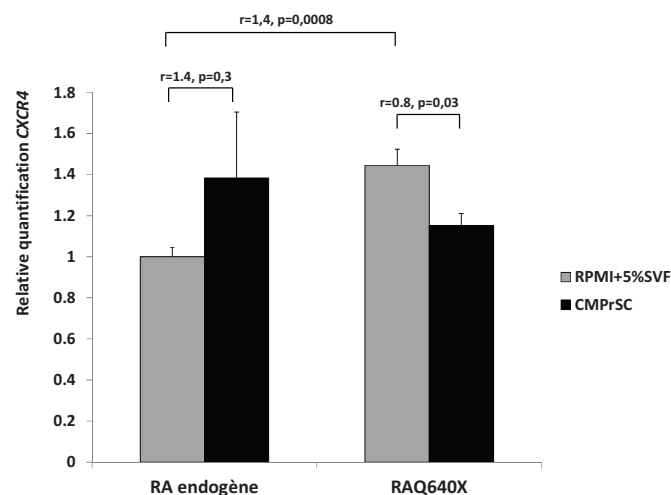


Figure 33: Expression transcriptionnelle de *CXCR4* par RT-qPCR dans les LNCaP exprimant le RAQ640X et exposées au CMPrSC

VII.B.a.iii Effet conjoint de l'exposition au CMPrSC et de l'expression du RAQ640X dans les LNCaP

Un profil transcriptomique spécifique lié à l'expression du RAQ640X et à l'exposition au CMPrSC, impliquant les fonctions cellulaires dédiées à la mobilité, à l'invasion, à l'inflammation et au trafic cellulaire immunitaire, à la croissance cellulaire et prolifération tumorale, a été identifié lors de cette analyse transcriptomique (cf. Tableau 4).

Nous avons précédemment rapporté l'effet conjoint CMPrSC/RAQ640X sur *S100A4* et *ITGB2* avec un effet positif du CMPrSC dans les LNCaP exprimant le RAQ640X ($r=5.7$ $p=0.005$ et $r=18.5$ $p=0.002$, respectivement) (cf. Figure 4b dans l'article en cours de rédaction), et qui était partiellement diminuée en présence d'anticorps neutralisant anti-IL-6 ($r=1,8$ $p=6,4.10^{-5}$ pour *S100A4* et $r=1,2$ $p=0,001$ pour *ITGB2*) (cf. Figure 5 dans l'article en cours de rédaction).

De même, cet effet conjoint de du CMPrSC/RAQ640X sur l'expression transcriptionnelle de *GP130* a été mis en évidence ($r=3,4$ $p=5,4.10^{-6}$ comparé au RAQ640X avec milieu contrôle et $r=2,9$ $p=3,5.10^{-5}$ comparé au RA endogène avec CMPrSC) (cf. Figure 26).

Nous avons donc pu mettre en évidence qu'au niveau transcriptionnel, une coopération épithélio-stromale privilégiée impliquant le RAQ640X et les PrSC, était responsable d'une augmentation spécifique de l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale, la transition épithélio-mésenchymateuse, l'invasion et la dissémination métastatique, avec un rôle de l'IL-6 sécrétée par les PrSC. L'expression de ces gènes est à étudier également après inhibition de l'activation de STAT3.

Ces résultats sont à confirmer sur des échantillons tumoraux par RT-qPCR et par TMA.

Networks	Score	Top functions	Top molecules	FC
1	34	Cell to Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking	ITGB2 S100A4 TNFSF10 CXCL12 DDIT3	11.2 4.5 3.1 2.6 2
2	32	Cellular Movement, Cancer, Gastrointestinal Disease	S100A8 SERPINA3	5 9.2
1	45	Cell to Cell Signaling, Cardiovascular System Development and Function, Cellular Movement	ITGB2 LOX S100A4	35.1 10.4 5.6
2	20	Cellular Movement, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking	NANOG	4.6
1	15	Cell Death and Survival, Skeletal and Muscular System Development and Function, Tissue Morphology	GADD45A STAT3 VEGFA	1.3 1.5 1.5
1	8	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Cancer	IGFBP3 PIAS1 PMEPA1	-1.6 1.5 1.4

analyse A
analyse B

Tableau 4: Effet conjoint du CMPrSC et du RAQ640X après analyse du transcriptome par mRNA array et IPA. Exemple de gènes identifiés dans les 2 premiers réseaux dans les analyses A et B.

VII.B.b. Les propriétés fonctionnelles potentiellement acquises par l'expression conjointe de variants tronqués et de l'exposition au CMPrSC

Afin de mettre en évidence l'acquisition de propriétés fonctionnelles issues de cette coopération épithélio-stromale, nous avons effectué des tests « fonctionnels » cellulaires, à la recherche de modifications morphologiques des contours membranaires des LNCaP et d'une variation de la prolifération cellulaire des LNCaP. A noter que les tests de migration-invasion n'étaient pas concluants dès les premières tentatives de mise au point avec notre modèle cellulaire, et ne seront donc pas rapportés dans ce travail.

VII.B.b.i Recherche de modifications morphologiques des cellules épithéliales secondaires à l'expression du RAQ640X et de la co-culture directe avec les cellules stromales

En raison de l'identification des fonctions de transition épithélio-mésenchymateuse dans l'analyse du transcriptome et de l'augmentation de l'expression de *S100A4* notamment par effet conjoint du CMPrSC et du RAQ640X, nous avons émis l'hypothèse d'une potentielle modification morphologique des contours membranaires des LNCaP. En effet, les carcinomes prostatiques agressifs, à faible score de Gleason, ont un aspect phénotypique dit « neuroendocrine » observé en HE et caractérisé en IHC. Nous avons donc tenté d'identifier si la co-culture directe entre les LNCaP exprimant le RAQ640X et les PrSC pouvaient induire des modifications morphologiques des LNCaP.

Au bout de 3 jours de co-culture directe entre les LNCaP exprimant le RAQ640X ou le RAWT et les PrSC, l'aspect « pseudo-axonal » observé au niveau des LNCaP n'était pas spécifique au variant tronqué.

Il conviendrait de renouveler cette expérience sur des LNCaP exprimant de façon stable le RAQ640X et de tester également cette hypothèse via une observation anatomopathologique comparée des tissus tumoraux prostatiques exprimant ou non les variants tronqués du RA.

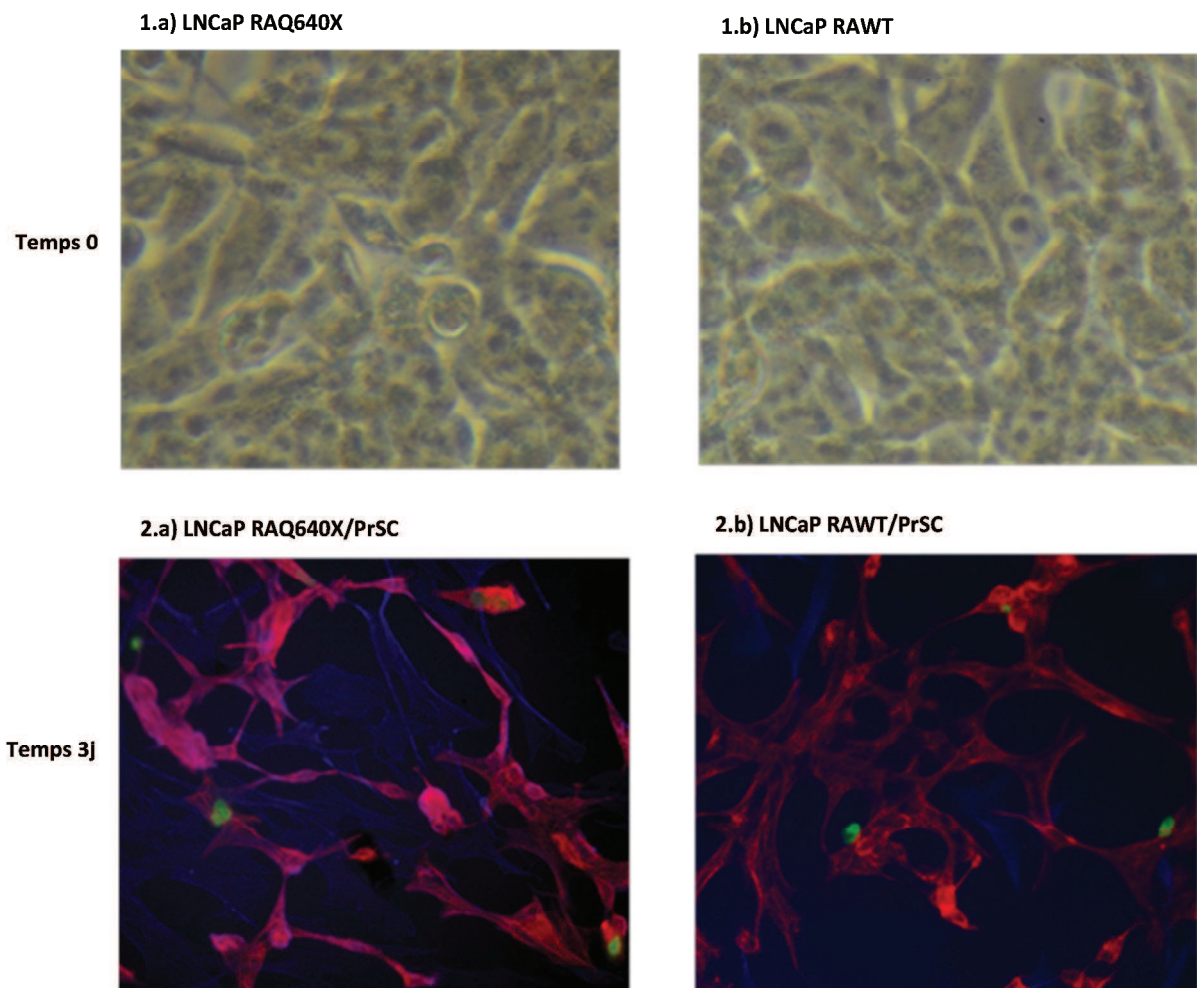


Figure 34: Observation des contours cellulaires des LNCaP en co-culture directe avec les PrSC.

A T0, avant la mise en co-culture, les contours cellulaires des LNCaP transfectées pour les plasmides p-EGFP-RAQ640X ou p-EGFP-RAWT ne sont pas différents selon le type de RA exprimé (visualisation au microscope à contraste de phase). A 3 jours de co-culture directe (visualisation au microscope à fluorescence après immunomarquage), nous visualisons les membranes plasmiques des PrSC (en bleu après marquage à l' α -actine muscle lisse et vimentine) qui forment un tapis, et les contours des membranes plasmiques des LNCaP (en rouge après marquage à la CK5/6) qui semblent étendre des prolongements cytoplasmiques avec un aspect « pseudo-axonal », sans qu'une différence entre les LNCaP exprimant le RAQ640X ou le RAWT, ni entre les cellules transfectées (en vert) et non transfectées, ne soit visible.

VII.B.b.ii Recherche d'une modification de la prolifération cellulaire des cellules épithéliales tumorales secondaire à l'expression du RAQ640X et à l'exposition au CMPrSC

Afin d'illustrer une des fonctions cellulaires décrites dans l'analyse transcriptomique de l'impact conjoint du RAQ640X et du CMPrSC (cf. Tableau 4), nous avons évalué la prolifération cellulaire des cellules épithéliales tumorales exprimant le RAQ640X, le RAV7 ou le RAWT et exposées au CMPrSC, à l'aide d'un test de viabilité cellulaire supplée d'un comptage. Il n'y avait pas d'effet inducteur de prolifération du CMPrSC sur la prolifération des LNCaP-RAWT, potentiellement positif dans les C4-2B-RAQ640X exposées au CMPrSC versus milieu CTL (non identifié dans les LNCaP). A noter que de façon paradoxale, les LNCaP-RAWT et C4-2b-RAWT avaient une prolifération plus importante que les cellules exprimant le RAQ640X (cf. Figure 35). Ces résultats ne permettent pas de conclure quant à un effet non-proliférant ou non du CMPrSC et du RAQ640X, étant donné les limites de notre modèle pour cette évaluation fonctionnelle.

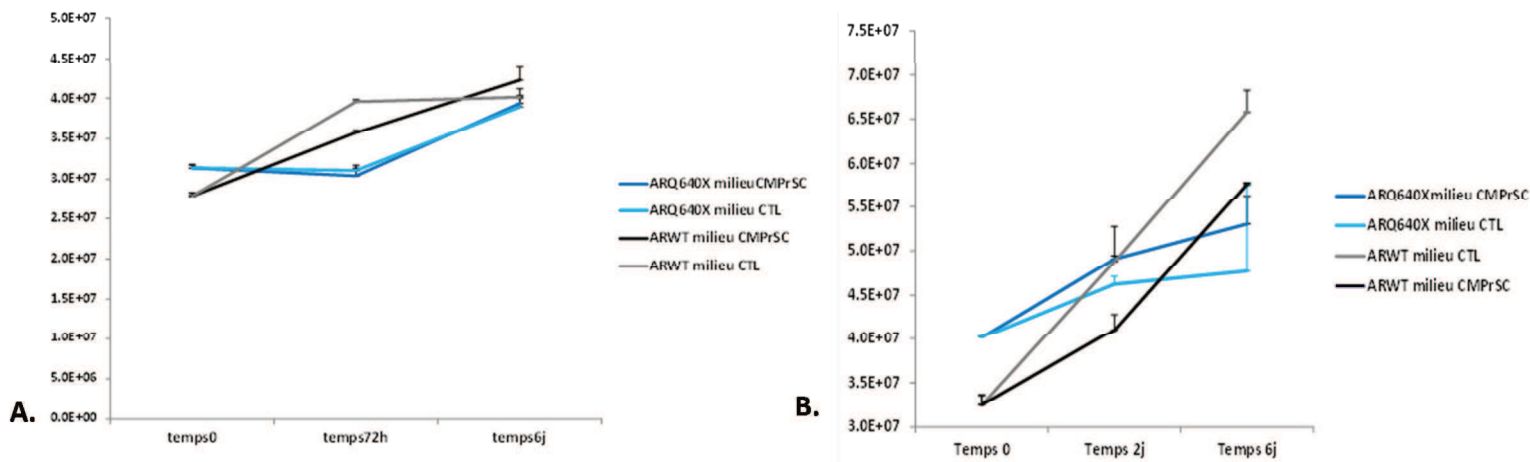


Figure 35: Prolifération cellulaire des LNCaP (A.) et des C4-2b (B.)

Les LNCaP (A) ou les C4-2b (B.) exprimant le RAQ640X ou le RAWT et exposées au CMPrSC ou milieu CTL pendant 72h (A.) ou 2 jours (B.) et jusqu'à 6 jours, ont été analysées pour évaluer leur prolifération cellulaire. Il n'y avait pas d'effet pro-prolifératif observé lié au CMPrSC ni à l'expression du RAQ640X.

A noter que l'évaluation de la prolifération cellulaire des LNCaP-ARV7 exposées au CMPrSC pose la question d'un potentiel effet pro-proliférant du CMPrSC (cf. Figure 36).

Il conviendrait de réaliser à nouveau ces expériences dans un modèle de transfection stable et potentiellement de co-culture directe avec les PrSC ou CAFs.

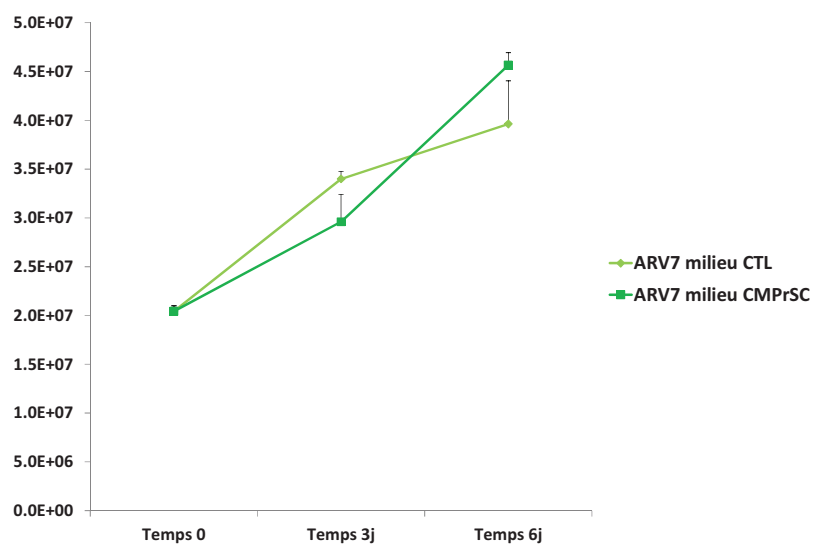


Figure 36: Prolifération cellulaire des LNCaP exprimant le RAV7 et exposées au CMPrSC

Les LNCaP exprimant le RAV7 et exposées au CMPrSC ou milieu CTL pendant 3 jours et jusqu'à 6 jours, ont été analysées pour évaluer leur prolifération cellulaire. Un effet potentiellement pro-prolifératif du CMPrSC sur les LNCaP-ARV7 reste à confirmer.

Conclusions et Perspectives

VIII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le stade de résistance à la castration est un moment inévitable dans l'histoire naturelle du cancer de la prostate, et la compréhension des mécanismes impliqués dans cette évolution tumorale est capitale pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Les variants autonomes du RA et le stroma tumoral sont des facteurs clés dans la progression du cancer de la prostate résistant à la castration, mais leurs relations n'ont jamais été étudiées. Nous avons posé la question dans ce travail de l'existence potentielle d'une coopération épithélio-stromale « privilégiée », conséquence de l'expression de variants autonomes du RA et de l'impact du microenvironnement, et avons tenté de la caractériser sur le plan transcriptionnel et d'identifier une voie de signalisation majeure. Nous avons ainsi présenté comment les fonctions transactivatrices identifiées par notre laboratoire par l'expression de variants tronqués pouvaient être modulées par la sécrétion de facteurs solubles issus des PrSC, et notamment par l'IL-6.

En raison de leur implication dans l'oncogenèse prostatique, nous avons dosé les cytokines dans les facteurs sécrétés par les PrSC, notamment l'IL-6, IL-8, IL-10 et le TNF α , et avons identifié de façon non surprenante l'IL-6 et l'IL-8 comme largement sécrétées par les PrSC (IL-8=216.8 pg/ml ; SEM=38.8) alors que ces cytokines étaient indétectables dans le milieu contrôle. L'IL-10 et le TNF α étaient indétectables dans le CMPrSC. Tout comme l'IL-6, l'IL-8 est connue pour contribuer à la progression tumorale prostatique et à l'émergence de clones tumoraux résistants à la castration via son interaction avec la voie de signalisation du RA, et la promotion de fonctions cellulaires comme la motilité cellulaire, le chimiotactisme des cellules immunitaires et la dissémination métastatique. L'effet des facteurs sécrétés par les PrSC (et principalement l'IL-6) associé à l'expression des variants autonomes du RA étaient responsables d'une augmentation de la transcription de gènes SIE-inductibles via l'activation de STAT3. Cette augmentation de la transactivation de STAT3, dépendante des variants autonomes du RA, n'était pas liée à une augmentation quantitative de pSTAT3 (effet du CMPrSC seul) et nous avons pu confirmer la localisation nucléaire (non exclusive) de STAT3 en immunoblots en présence de CMPrSC et une co-précipitation avec les RA (WT ou tronqués). Nous pouvons supposer qu'une affinité potentiellement hyper-sélective ou plus stable de l'interaction entre le domaine N-terminal des RA tronqués et STAT3, et/ou le recrutement de différents co-activateurs transcriptionnels sont des hypothèses expliquant cette augmentation de la transactivation de STAT3, dépendante des variants autonomes du RA, et sont à analyser par la suite.

Bien que nos résultats soient clairs avec le RAQ640X, ils sont variables avec le RAV7, et nous n'avons pas confirmé de transactivation de STAT3 statistiquement significative dans les LNCaP, alors que

probablement positive dans les 22RV1. Nous pouvons émettre l'hypothèse de mécanismes de transactivation de STAT3 différents selon le type de RA autonomes. En effet, un autre variant tronqué autonome résultant d'une mutation non-sens (RA710X) avait également induit une augmentation de la transactivation de STAT3 liée aux facteurs sécrétés par les PrSC. Nous supposons donc qu'avec le variants d'épissage RAV7 qui n'a pas le domaine HR (région en épingle), contrairement au RAQ640X, le RAV7 peut ne pas transloquer dans le noyau avec la même facilité que le RAQ640X. Une autre hypothèse est celle de l'impact du NTD du RAV7: en tant qu'IDP (intrinsically disordered protein), le NTD pourrait interagir différemment avec les co-activateurs spécifiquement recrutés par le RAV7 pour transactiver STAT3 ; mais l'état actuel des connaissances sur le recrutement spécifique des co-activateurs transcriptionnels par les variants tronqués est à enrichir.

Concernant l'analyse d'une voie de signalisation préférentielle, nous avons étudié la cascade la voie de l'IL-6, puisque nous avons confirmé que le CMPrSC contenait des quantités importantes d'IL-6, responsables de l'augmentation de pSTAT3 et contribuant à l'augmentation de la transactivation de STAT3 et à l'augmentation transcriptionnelle de STAT3. L'étude des acteurs de la cascade d'activation de l'IL-6, notamment gp130, gp80, JAK et Fer n'ont pas été concluantes en termes de mise en évidence d'un effet différentiel lié aux variants autonomes du RA. Nous pouvons incriminer la limite de notre modèle pour expliquer l'absence de conclusion de ces résultats, et ces expériences sont à réaliser à nouveau dans des lignées stables, et idéalement dans des modèles animaux tumoraux. Même si notre modèle a des limites impliquant une variation d'expression de nos variants tronqués d'étude, et un faible taux d'expression rendant difficile la mise en évidence des résultats, notamment lors de tests fonctionnels, il tente d'illustrer la biologie du CRPC, à savoir la coexistence de variants tronqués autonomes et de RA ligand-dépendant dans un même clone tumoral. C'est pourquoi nous avons choisi de conserver ce modèle pour l'analyse transcriptomique de l'impact du CMPrSC et du RAQ640X. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence un profil transcriptomique spécifique lié à l'expression conjointe du RAQ640X et du CMPrSC, impliquant les fonctions cellulaires d'invasion tumorale, de prolifération cellulaire, de transition épithélio-mésenchymateuse, de migration, d'interactions cellulaires. Nous avons fait une analyse approfondie des gènes identifiés dans les classes de ces fonctions cellulaires et avons ainsi confirmé que des gènes importants, impliqués dans la dissémination métastatique et la progression tumorale. La poursuite des expériences visant à évaluer les propriétés fonctionnelles acquises suite à l'exposition au stroma tumoral des cellules tumorales épithéliales doit être réalisée dans des modèles animaux.

L'identification de variants autonomes du RA doit être envisagée pour sélectionner les patients qui pourraient bénéficier de thérapeutiques inhibitrices d'IL6 ou de STAT3 dans le cancer de la prostate résistant à la castration.

Références

IX. REFERENCES

- 1 Damber, J. E., *Acta Oncol* **44** (6), 605 (2005).
- 2 Ceraline, J. et al., *Int J Cancer* **108** (1), 152 (2004).
- 3 Lapouge, G. et al., *Int J Cancer* **121** (6), 1238 (2007).
- 4 Marcias, G. et al., *Hum Mutat* **31** (1), 74 (2010).
- 5 Ware, K. E., Garcia-Blanco, M. A., Armstrong, A. J., and Dehm, S. M., *Endocrine-related cancer* **21** (4), T87 (2014).
- 6 Dehm, S. M. et al., *Cancer Res* **68** (13), 5469 (2008).
- 7 Bergerat, J. P. and Ceraline, J., *Hum Mutat* **30** (2), 145 (2009).
- 8 Cottard, F. et al., *PLoS One* **8** (5), e63466 (2013).
- 9 Mueller, M. M. and Fusenig, N. E., *Nat Rev Cancer* **4** (11), 839 (2004).
- 10 Cardillo, M. R. and Ippoliti, F., *Anticancer Res* **26** (5A), 3409 (2006).
- 11 Reebye, V., Frilling, A., Habib, N. A., and Mintz, P. J., *Cell Signal* **23** (6), 1017 (2011).
- 12 Center, M. M. et al., *Eur Urol* **61** (6), 1079 (2012).
- 13 Coleman, R. E., *Clin Cancer Res* **12** (20 Pt 2), 6243s (2006).
- 14 Soos, G. et al., *Eur Urol* **48** (5), 739 (2005).
- 15 Pritchard, C. C. and Nelson, P. S., *Differentiation* **76** (6), 624 (2008).
- 16 Bonkhoff, H. and Remberger, K., *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **422** (1), 35 (1993).
- 17 Cohen, R. J. et al., *Br J Urol* **81** (3), 413 (1998).
- 18 Huggins, C. and Hodges, C. V., *CA Cancer J Clin* **22** (4), 232 (1972).
- 19 Klotz, L. and Schellhammer, P., *Clin Prostate Cancer* **3** (4), 215 (2005).
- 20 Gravis, G. et al., *Lancet Oncol* **14** (2), 149 (2013).
- 21 Petrylak, D. P. et al., *N Engl J Med* **351** (15), 1513 (2004); Tannock, I. F. et al., *N Engl J Med* **351** (15), 1502 (2004).
- 22 de Bono, J. S. et al., *Lancet* **376** (9747), 1147 (2010).
- 23 de Bono, J. S. et al., *N Engl J Med* **364** (21), 1995 (2011); Beer, T. M. et al., *N Engl J Med* **371** (5), 424 (2014).
- 24 Parker, C. and Sartor, O., *N Engl J Med* **369** (17), 1659 (2013).
- 25 Kantoff, P. W. et al., *N Engl J Med* **363** (5), 411 (2010).
- 26 Oh, W. K., *Urology* **60** (3 Suppl 1), 87 (2002).
- 27 Antonarakis, E. S. et al., *N Engl J Med* **371** (11), 1028 (2014).
- 28 Balbas, M. D. et al., *Elife* **2**, e00499 (2013).
- 29 Korpai, M. et al., *Cancer Discov* **3** (9), 1030 (2013).
- 30 Tomlins, S. A. et al., *Cancer Res* **66** (7), 3396 (2006).
- 31 Abate-Shen, C., *Nat Rev Cancer* **2** (10), 777 (2002).
- 32 Berger, R. et al., *Cancer Res* **64** (24), 8867 (2004).
- 33 Ellwood-Yen, K. et al., *Cancer Cell* **4** (3), 223 (2003).
- 34 Li, J. et al., *Science* **275** (5308), 1943 (1997).
- 35 Renehan, A. G. et al., *Lancet* **363** (9418), 1346 (2004).
- 36 Nelson, W. G., De Marzo, A. M., and Isaacs, W. B., *N Engl J Med* **349** (4), 366 (2003).
- 37 Stanbrough, M. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (19), 10823 (2001).
- 38 Feldman, B. J. and Feldman, D., *Nat Rev Cancer* **1** (1), 34 (2001).
- 39 Taplin, M. E. and Balk, S. P., *J Cell Biochem* **91** (3), 483 (2004).
- 40 Ceraline, J. et al., *Eur J Endocrinol* **148** (1), 99 (2003).
- 41 Linja, M. J. et al., *Cancer Res* **61** (9), 3550 (2001).
- 42 Holzbeierlein, J. et al., *Am J Pathol* **164** (1), 217 (2004).
- 43 Hobisch, A. et al., *Cancer Res* **58** (20), 4640 (1998).
- 44 Culdig, Z. et al., *Cancer Res* **54** (20), 5474 (1994).
- 45 Lamont, K. R. and Tindall, D. J., *Adv Cancer Res* **107**, 137 (2010).
- 46 Massie, C. E. and Mills, I. G., *Methods Mol Biol* **809**, 157 (2012).

47 Massie, C. E. et al., *EMBO J* **30** (13), 2719 (2011).
48 Sharma, N. L. et al., *Cancer Cell* **23** (1), 35 (2013).
49 Hendriksen, P. J. et al., *Cancer Res* **66** (10), 5012 (2006).
50 Jenster, G., van der Korput, H. A., Trapman, J., and Brinkmann, A. O., *J Biol Chem* **270** (13),
7341 (1995).
51 Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., and Laudet, V., *Nat Rev Drug Discov* **3** (11), 950 (2004).
52 Shang, Y., Myers, M., and Brown, M., *Mol Cell* **9** (3), 601 (2002).
53 Wang, Q. et al., *Mol Cell* **27** (3), 380 (2007).
54 Culig, Z., *Growth Factors* **22** (3), 179 (2004).
55 Dotzlaw, H. et al., *Mol Cell Endocrinol* **213** (1), 79 (2003).
56 Edwards, J. and Bartlett, J. M., *BJU Int* **95** (9), 1320 (2005).
57 Papaioannou, M. et al., *Andrologia* **37** (6), 211 (2005).
58 Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K., *J Biol Chem* **276** (40), 36865 (2001).
59 Baron, S. et al., *J Biol Chem* **279** (15), 14579 (2004).
60 Kousteni, S. et al., *Cell* **104** (5), 719 (2001).
61 Culig, Z. et al., *J Steroid Biochem Mol Biol* **92** (4), 265 (2004).
62 Culig, Z., *Urology* **62** (5 Suppl 1), 21 (2003).
63 Mimeault, M. and Batra, S. K., *Carcinogenesis* **27** (1), 1 (2006).
64 Ford, O. H., 3rd et al., *J Urol* **170** (5), 1817 (2003).
65 Chmelar, R. et al., *Int J Cancer* **120** (4), 719 (2007).
66 Arnold, J. T. and Isaacs, J. T., *Endocr Relat Cancer* **9** (1), 61 (2002).
67 Verras, M. and Sun, Z., *Cancer Lett* **237** (1), 22 (2006).
68 Lee, S. O. et al., *Prostate* **60** (3), 178 (2004).
69 Culig, Z., Steiner, H., Bartsch, G., and Hobisch, A., *J Cell Biochem* **95** (3), 497 (2005).
70 Steiner, H. et al., *Am J Pathol* **162** (2), 655 (2003).
71 Marcelli, M. et al., *Cancer Res* **60** (4), 944 (2000).
72 Sanchez, D. et al., *BJU Int* **98** (6), 1320 (2006).
73 Hyytinen, E. R. et al., *Lab Invest* **82** (11), 1591 (2002).
74 Taplin, M. E. et al., *J Clin Oncol* **21** (14), 2673 (2003).
75 Karan, D., Lin, M. F., Johansson, S. L., and Batra, S. K., *Int J Cancer* **103** (3), 285 (2003).
76 Hara, T. et al., *Prostate* **65** (3), 268 (2005).
77 Monge, A. et al., *Cell Mol Life Sci* **63** (4), 487 (2006).
78 Jagla, M. et al., *Endocrinology* **148** (9), 4334 (2007).
79 Gregory, C. W. et al., *Cancer Res* **58** (24), 5718 (1998).
80 Tepper, C. G. et al., *Cancer Res* **62** (22), 6606 (2002).
81 Jenster, G. et al., *Mol Endocrinol* **5** (10), 1396 (1991).
82 Simental, J. A. et al., *J Biol Chem* **266** (1), 510 (1991).
83 Uehara, S. et al., *Am J Med Genet* **86** (2), 107 (1999).
84 Lapouge, G. et al., *Adv Exp Med Biol* **617**, 529 (2008).
85 Streicher, W. et al., *World J Urol* **30** (3), 333 (2012).
86 Zengerling, F. et al., *Int J Mol Sci* **13** (9), 11530 (2012).
87 Quigley, C. A. et al., *Mol Endocrinol* **6** (7), 1103 (1992).
88 Zhu, X., Daffada, A. A., Chan, C. M., and Dowsett, M., *Int J Cancer* **72** (4), 574 (1997).
89 Guo, Z. et al., *Cancer Res* **69** (6), 2305 (2009).
90 Hu, R. et al., *Cancer Res* **69** (1), 16 (2009).
91 Hu, R. et al., *Cancer Res* **72** (14), 3457 (2012).
92 Murayama, A., Fukai, F., and Murachi, T., *J Biochem* **95** (6), 1697 (1984).
93 Kim, Y. S. et al., *Biochem Biophys Res Commun* **374** (2), 373 (2008).
94 Chen, H. et al., *J Biol Chem* **285** (4), 2368 (2010).
95 Frezza, M., Yang, H., and Dou, Q. P., *J Cell Physiol* **226** (11), 2731 (2011).
96 Rios-Doria, J. et al., *J Biol Chem* **278** (2), 1372 (2003).
97 Mediwala, S. N. et al., *Prostate* **73** (3), 267 (2013).

98 Zhao, H. et al., *J Urol* **188** (6), 2158 (2012).
99 Hornberg, E. et al., *PLoS One* **6** (4), e19059 (2011).
100 Li, Y. et al., *Cancer Res* **73** (2), 483 (2013).
101 Hanahan, D. and Weinberg, R. A., *Cell* **144** (5), 646 (2011).
102 Mishra, P. J. et al., *Cancer Res* **68** (11), 4331 (2008).
103 Orimo, A. et al., *Cell* **121** (3), 335 (2005).
104 Dirat, B. et al., *Endocr Dev* **19**, 45 (2010).
105 Pietras, K. and Ostman, A., *Exp Cell Res* **316** (8), 1324 (2010).
106 Egeblad, M., Rasch, M. G., and Weaver, V. M., *Curr Opin Cell Biol* **22** (5), 697 (2010).
107 Qian, B. Z. and Pollard, J. W., *Cell* **141** (1), 39 (2010).
108 Joyce, J. A. and Pollard, J. W., *Nat Rev Cancer* **9** (4), 239 (2009).
109 Karnoub, A. E. et al., *Nature* **449** (7162), 557 (2007).
110 Gocheva, V. et al., *Genes Dev* **24** (3), 241 (2010).
111 Vindrieux, D., Escobar, P., and Lazennec, G., *Endocr Relat Cancer* **16** (3), 663 (2009).
112 Begley, L. et al., *Aging Cell* **4** (6), 291 (2005).
113 Begley, L. A., Kasina, S., MacDonald, J., and Macoska, J. A., *Cytokine* **43** (2), 194 (2008).
114 Lee, L. F. et al., *Oncogene* **23** (12), 2197 (2004).
115 Tuxhorn, J. A. et al., *Clin Cancer Res* **8** (9), 2912 (2002).
116 McAlhany, S. J. et al., *Prostate* **61** (2), 182 (2004).
117 Ayala, G. et al., *Clin Cancer Res* **9** (13), 4792 (2003).
118 Yanagisawa, N. et al., *Hum Pathol* **39** (2), 282 (2008).
119 Ayala, G. E. et al., *Am J Pathol* **178** (1), 79 (2011).
120 Planche, A. et al., *PLoS One* **6** (5), e18640 (2011).
121 Dakhova, O. et al., *Clin Cancer Res* **15** (12), 3979 (2009).
122 Dakhova, O., Rowley, D., and Ittmann, M., *Clin Cancer Res* **20** (1), 100 (2013).
123 Thalmann, G. N. et al., *Eur Urol* **58** (1), 162 (2010).
124 Sun, X. et al., *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **46** (6), 538 (2010).
125 Sung, S. Y. et al., *Cancer Res* **68** (23), 9996 (2008).
126 Wang, R. et al., *PLoS One* **7** (8), e42653 (2012).
127 Chung, L. W., Baseman, A., Assikis, V., and Zhou, H. E., *J Urol* **173** (1), 10 (2005).
128 Shigemura, K. et al., *Prostate* **69** (9), 949 (2009).
129 San Francisco, I. F., DeWolf, W. C., Peehl, D. M., and Olumi, A. F., *Int J Cancer* **112** (2), 213 (2004).
130 Barclay, W. W., Woodruff, R. D., Hall, M. C., and Cramer, S. D., *Endocrinology* **146** (1), 13 (2005).
131 Zhao, H., Ramos, C. F., Brooks, J. D., and Peehl, D. M., *J Cell Physiol* **210** (1), 111 (2007).
132 Ao, M. et al., *Cancer Res* **67** (9), 4244 (2007).
133 Gandellini, P. et al., *Antioxid Redox Signal* **20** (7), 1045 (2013).
134 Culig, Z. and Puhf, M., *Mol Cell Endocrinol* **360** (1-2), 52 (2011).
135 Hong, D. S., Angelo, L. S., and Kurzrock, R., *Cancer* **110** (9), 1911 (2007).
136 Hobisch, A. et al., *J Pathol* **191** (3), 239 (2000).
137 Nakashima, J. et al., *Clin Cancer Res* **6** (7), 2702 (2000).
138 Baillargeon, J. et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15** (7), 1331 (2006).
139 George, D. J. et al., *Clin Cancer Res* **11** (5), 1815 (2005).
140 Michalaki, V., Syrigos, K., Charles, P., and Waxman, J., *Br J Cancer* **90** (12), 2312 (2004).
141 Royuela, M. et al., *J Pathol* **202** (1), 41 (2004).
142 Giri, D., Ozen, M., and Ittmann, M., *Am J Pathol* **159** (6), 2159 (2001).
143 Palmer, J., Hertzog, P. J., and Hammacher, A., *Int J Biochem Cell Biol* **36** (11), 2258 (2004).
144 Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., and Taga, T., *Blood* **86** (4), 1243 (1995).
145 Fain, J. N. et al., *Endocrinology* **145** (5), 2273 (2004).
146 Peters, M., Muller, A. M., and Rose-John, S., *Blood* **92** (10), 3495 (1998).
147 Rose-John, S., *Adv Exp Med Biol* **495**, 145 (2001).

148 Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G., and Jones, S. A., *J Leukoc Biol* **80** (2), 227 (2006).
149 Tawara, K., Oxford, J. T., and Jorcyk, C. L., *Cancer Manag Res* **3**, 177 (2011).
150 Knupfer, H. and Preiss, R., *Immunol Cell Biol* **86** (1), 87 (2008).
151 Lust, J. A. et al., *Cytokine* **4** (2), 96 (1992).
152 Gaillard, J. P. et al., *Eur J Immunol* **23** (4), 820 (1993).
153 Jostock, T. et al., *Eur J Biochem* **268** (1), 160 (2001).
154 Lee, S. O. et al., *Clin Cancer Res* **9** (1), 370 (2003).
155 Lou, W. et al., *Prostate* **42** (3), 239 (2000).
156 Okamoto, M., Lee, C., and Oyasu, R., *Cancer Res* **57** (1), 141 (1997).
157 Borsellino, N., Belldegrun, A., and Bonavida, B., *Cancer Res* **55** (20), 4633 (1995).
158 Chung, T. D. et al., *Prostate* **38** (3), 199 (1999).
159 Wang, G., Wang, J., and Sadar, M. D., *Cancer Res* **68** (23), 9918 (2008).
160 Suzuki, H., Ueda, T., Ichikawa, T., and Ito, H., *Endocr Relat Cancer* **10** (2), 209 (2003).
161 Lin, D. L., Whitney, M. C., Yao, Z., and Keller, E. T., *Clin Cancer Res* **7** (6), 1773 (2001).
162 Terakawa, T. et al., *Br J Cancer* **101** (10), 1731 (2009).
163 Chen, T., Wang, L. H., and Farrar, W. L., *Cancer Res* **60** (8), 2132 (2000).
164 Zelivianski, S. et al., *Biochim Biophys Acta* **1539** (1-2), 28 (2001).
165 Ni, Z., Lou, W., Leman, E. S., and Gao, A. C., *Cancer Res* **60** (5), 1225 (2000).
166 Xi, S., Gooding, W. E., and Grandis, J. R., *Oncogene* **24** (6), 970 (2005).
167 Steiner, H. et al., *Prostate* **66** (16), 1744 (2006).
168 Smith, P. C. and Keller, E. T., *Prostate* **48** (1), 47 (2001).
169 Wallner, L. et al., *Cancer Res* **66** (6), 3087 (2006).
170 Azevedo, A., Cunha, V., Teixeira, A. L., and Medeiros, R., *World J Clin Oncol* **2** (12), 384 (2011).
171 Sansone, P. and Bromberg, J., *J Clin Oncol* **30** (9), 1005 (2010); Teixeira, A. L. et al.,
Pharmacogenomics J **9** (5), 341 (2009).
172 Dorff, T. B. et al., *Clin Cancer Res* **16** (11), 3028 (2010); Hudes, G. et al., *Invest New Drugs* **31**
(3), 669 (2013).
173 DeHaan, A. M., Wolters, N. M., Keller, E. T., and Ignatoski, K. M., *Prostate* **69** (5), 528 (2009).
174 Gaddipati, J. P. et al., *Cancer Res* **54** (11), 2861 (1994).
175 Sun, C. et al., *Oncogene* **25** (28), 3905 (2006).
176 Pan, Y., Zhou, F., Zhang, R., and Claret, F. X., *PLoS One* **8** (1), e54565 (2013).
177 Schust, J. et al., *Chem Biol* **13** (11), 1235 (2006).
178 Matsuda, T. et al., *Biochem Biophys Res Commun* **283** (1), 179 (2001).
179 Yamamoto, T. et al., *Biochem Biophys Res Commun* **306** (2), 610 (2003).
180 Mihara, M. et al., *Clin Sci (Lond)* **122** (4), 143 (2012).
181 Zoubeidi, A. et al., *Mol Cancer Res* **7** (1), 142 (2009).
182 Rocha, J. et al., *Mol Cell Endocrinol* **381** (1-2), 140 (2013).
183 Herrmann, A. et al., *Cancer Res* **70** (19), 7455 (2010).
184 Priceman, S. J. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (32), 13079 (2013).
185 Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R., *Nat Rev Cancer* **9** (11), 798 (2009).
186 Kortylewski, M. and Yu, H., *Curr Opin Immunol* **20** (2), 228 (2008).
187 Yu, H. et al., *Nat Rev Cancer* **14** (11), 736 (2014).
188 Hossain, D. M. et al., *Blood* **123** (1), 15 (2011).
189 Tye, H. et al., *Cancer Cell* **22** (4), 466 (2012).
190 Herrmann, A. et al., *Cancer Res* **74** (18), 5218 (2014).
191 Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., and Struhl, K., *Cell* **139** (4), 693 (2009).
192 Guo, L. et al., *Oncogene* **32** (45), 5272 (2013).
193 Lee, H. et al., *Nat Med* **16** (12), 1421 (2010).
194 Selander, K. S. et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16** (3), 532 (2007).
195 Paralkar, V. M. et al., *J Biol Chem* **273** (22), 13760 (1998).
196 Wakchoure, S. et al., *Prostate* **69** (6), 652 (2009).
197 Lee, Y. C. et al., *Mol Cell Proteomics* **14** (3), 471 (2015).

- 198 Li, T. et al., *J Biol Chem* **290** (17), 11108 (2015).
199 Cazanave, S. C. et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299** (1), G236 (2010).
200 Cox, T. R. et al., *Cancer Res* **73** (6), 1721 (2013).
201 Tien, J. C. et al., *Int J Biol Sci* **10** (10), 1116 (2014).
202 Lee, J. Y. et al., *World J Mens Health* **32** (3), 167 (2014).
203 Hsiao, J. J. et al., *BMC Cancer* **15**, 204 (2015).

Coopération privilégiée entre le microenvironnement stromal et les variants autonomes du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate

Résumé

Malgré le rôle des variants constitutivement actifs du récepteur des androgènes (RA) et du stroma tumoral dans le cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC), leurs relations restent inconnues. Nous rapportons l'impact de l'interleukine-6 (IL-6) sécrétée par les cellules stromales prostatiques (PrSC) sur les cellules épithéliales tumorales prostatiques exprimant les variants autonomes du RA. Le milieu de culture conditionné par les PrSC (CMPrSC) contenait des taux élevés d'IL-6 et induisait une augmentation de l'activité transcriptionnelle de STAT3 dans les LNCaP et C4-2b exprimant le variant RAQ640X, via une activation de pY705-STAT3. Cette activité de STAT3 était inhibée par la neutralisation de l'IL-6. L'analyse par mRNA array et RT-qPCR a mis en évidence un profil transcriptomique spécifique lié à l'expression du RAQ640X et à l'exposition au CMPrSC, impliquant les fonctions de motilité, d'invasion et de migration cellulaires, et l'expression de gènes favorisant la dissémination métastatique. Ainsi, nos résultats illustrent une coopération épithélio-stromale «privilégiée» en présence de variants autonomes du RA, impliquée dans la progression tumorale.

Mots clés : variants constitutivement actifs du RA, IL-6, STAT3, microenvironnement stromal, cancer de la prostate

Abstract

Constitutively active androgen receptor (AR) variants and stromal microenvironment are involved in castration resistant prostate cancer (CRPC), but their relationship remains unknown. We describe the effects of interleukin-6 (IL6) secreted from prostate stromal fibroblast cells (PrSC) towards prostate epithelial cancer cells expressing constitutively active AR variants. Conditioned culture medium from PrSC (CMPrSC) contained high levels of IL-6 and led to an increased STAT3 transcriptional activity in LNCaP and C4-2b cells expressing the ARQ640X variant, through pY705-STAT3 activation. This STAT3 activity was significantly diminished with neutralizing antibody anti-IL6. Gene expression analysis using mRNA array and RT-qPCR highlighted a specific transcriptional profile related to ARQ640X expression and PrSC exposure, resulting in cellular motility, invasion and cellular migration, and IL-6 genes expression promoting metastatic dissemination. Overall, our data emphasize a "preferred" epithelio-stromal cooperation when expressing constitutive active RA variants, which contributes to tumor progression.

Key words: constitutively active AR variants, IL-6, STAT3, stromal microenvironment, prostate cancer progression