

Université

de Strasbourg

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED 414)

CNRS UMR 7104 – INSERM U 1258

INSTITUT DE GÉNÉTIQUE ET DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

THÈSE présentée par :

Edwige SCHREYER

soutenue le : **12 Octobre 2018**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Rôle du récepteur des androgènes
dans les communications cellulaires
au sein du cancer de la prostate**

THÈSE dirigée par :

M. Jocelyn CERALINE

MCU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M^{me} Ruth RIMOKH

DR, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

M. Mohamed BENAHMED

DR, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M^{me} Sophie MARTIN

CR, Université de Strasbourg

M. Bernard MALAUAUD

PR, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier vivement le Dr. Ruth Rimokh, le Dr. Mohamed Benahmed, ainsi que le Dr. Sophie Martin pour avoir accepté d'évaluer mes travaux et de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Jocelyn Céraline pour m'avoir accueillie dès mon Master I au sein de son laboratoire et pour m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la recherche. Merci de m'avoir brillamment préparée au concours de l'École Doctorale, et merci de m'avoir soutenue tout au long de ma thèse. Plus que tout, merci d'avoir cru en moi et en mes capacités, et de m'avoir poussée dès que j'avais envie de baisser les bras. Grâce à toi, j'ai appris à dépasser mes limites. Tout simplement, merci de m'avoir fait prendre confiance en moi. Aussi, merci de m'avoir permis de participer à tous ces congrès, et de m'avoir fait découvrir toutes ces villes, ainsi que le bon vin blanc.

Eva, pilier du labo, les mots ne suffisent pas pour décrire à quel point ton soutien m'a été inestimable. Merci d'avoir été toujours là, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci d'avoir pris le temps de me former, et de répondre à toutes mes questions dès que j'en avais (c'est-à-dire tout le temps). Merci pour ta patience, ta douceur, ta pédagogie, et ton réconfort. Ton aide bienveillante m'a permis de réaliser une grande partie de ce projet de thèse.

Félicie, merci de m'avoir sauvée d'une mort certaine du fait d'un cadran de porte un peu trop agressif. Merci de m'avoir appris à réaliser de superbes qPCR, grâce à toi j'ai pu en réaliser pas loin de 300. Merci pour tous ces bons moments et tous ces fous rires. En particulier, je n'oublierai jamais la fois où j'ai voulu t'apprendre à danser du Michael Jackson, ce fut le plus gros échec de ma thèse, mais qu'est-ce qu'on a ri !

Marine, merci de m'avoir prise sous ton aile lors de mon arrivée au labo, et de m'avoir appris toutes ces manip. Merci de m'avoir sauvée plus d'une fois face aux insectes en tout genre. Merci pour ta présence et ton soutien inconditionnel. Merci d'être toi, promis à l'avenir j'essaierai de ne plus t'infliger mes goûts musicaux douteux...

Pauline, merci pour tous ces bons moments de complicité, pour ta joie de vivre, et ton enthousiasme. Les congrès en ta compagnie furent inoubliables (merci aussi d'avoir retenu le train quand j'avais oublié mon tube à poster sur le quai...). Ton côté pragmatique m'aura redonné le sourire plus d'une fois !

Merci à tout le reste de l'équipe, en particulier Bruno, Philippe et Marc-André, pour votre aide, vos conseils, vos encouragements, et votre soutien. Une belle réussite n'est possible que grâce à un encadrement de qualité.

Je remercie tout particulièrement Anne, Amélie, et Arnaud, pour m'avoir donné l'occasion de réaliser toutes ces expériences. Merci pour vos analyses innombrables. Merci pour avoir été systématiquement disponibles dès que j'avais besoin de vous, et merci de m'avoir autant soutenu. J'espère vous avoir fait assez de canelés pour tout ça !

Un énorme merci à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Lionel, Bruno, Patrice, Ali, Virgile, David, et Fred. Vous avez été d'une efficacité redoutable. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité, votre enthousiasme, et votre soutien. Ce fut un réel plaisir de réaliser ce projet avec vous !

Je remercie notamment Mustapha Oulad-Abdelghani pour la quantité phénoménale d'anticorps qu'il m'a très largement aidée à produire. Merci de vous être rendu aussi accessible, et merci pour votre patience et votre gentillesse. Enfin, je remercie le service d'anatomie pathologique pour leur aide précieuse, Luc Negroni pour les analyses des divers anticorps couplés par spectrométrie de masse, ainsi que Betty Heller et tout le service de culture cellulaire pour toutes ces fois où je suis venue vous demander des cellules.

Je remercie par ailleurs La Ligue nationale contre le cancer pour m'avoir permis de réaliser ma 4^{ème} année de thèse.

Emyr, thank you so much for everything you've done for me. It's been a great chance to be able to work with you. Thank you for our endless mail conversations that made me smile so many times, my dear best British nerd friend.

Merci à tous mes ami(e)s pour votre présence et votre bienveillance. Avec vous, la vie est plus légère, et les études plus faciles.

Un très grand merci à toute ma famille, en particulier mes parents et ma Mami. Il n'y a pas de mots assez forts pour vous remercier de m'avoir accompagnée quotidiennement et consciencieusement toutes ces années. Merci pour votre soutien inconditionnel, vos encouragements, votre patience, et votre amour. Quelle fierté d'être votre (petite) fille. Sans vous tout cela n'aurait pas été possible, milles fois merci.

À ma chèvre adorée, merci de supporter et de me soutenir au quotidien. Merci pour ton oreille attentive, ton épaule réconfortante, ta présence, ton humour, tes encouragements, et ta patience. Chaque jour avec toi est une nouvelle aventure, et une nouvelle chance. Du fond du cœur, merci.

Mon cher Papy, mon ange gardien, je suis sûre et certaine que tu aurais été fier de moi, ce manuscrit t'est dédié.

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	1
Table des illustrations.....	3
Liste des abbréviations	5
Introduction bibliographique.....	8
I. Le cancer de la prostate	9
A. La prostate.....	9
B. Épidémiologie du cancer de la prostate	11
C. Diagnostic du cancer de la prostate	12
1. Le score de Gleason.....	12
2. La classification TNM	14
3. La classification de D'Amico	16
D. Traitement du cancer de la prostate.....	16
1. Patients atteints de tumeurs localisées	16
a) La surveillance active	16
b) La chirurgie.....	17
c) La curiethérapie.....	17
d) La radiothérapie	17
2. Patients atteints de tumeurs localement avancées ou métastatiques	18
a) Agonistes ou antagonistes de la LHRH	18
b) Anti-androgènes	18
c) Hormonothérapie de seconde génération	20
E. Le récepteur des androgènes	21
1. Structure du récepteur des androgènes.....	22
a) Le domaine N-terminal	23
b) Le domaine de liaison à l'ADN.....	24
c) La région charnière.....	25
d) Le domaine de liaison au ligand	26
2. Modes d'action du récepteur des androgènes	28
a) Voie génomique	28
b) Voie non génomique.....	30
c) Co-régulateurs du récepteur des androgènes.....	32
(1) Co-activateurs.....	32
(2) Co-répresseurs.....	32
d) Gènes cibles du récepteur des androgènes	34
3. Le récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate résistant à la castration.....	35
a) Surexpression	36
b) By-pass.....	36
c) Altération des co-régulateurs.....	37
d) Mutation ponctuelles.....	37
(1) Mutations faux-sens	38
(a) T878A.....	38
(b) F877L	39
(c) H875Y	39

(d) L702H	39
(e) W742L/C.....	40
(2) Mutations non-sens.....	40
(a) RA Q641X	41
(b) RA Q785X	45
(3) Épissage aberrant	46
(a) RA-V7.....	46
(b) Autres variants du RA	50
e) Perspectives	52
II. Le microenvironnement tumoral.....	53
A. Les composants du microenvironnement tumoral.....	55
1. La matrice extracellulaire	55
2. Le réseau de vascularisation	56
3. Les cellules immunitaires	57
4. Les fibroblastes associés au cancer.....	59
a) Importance des fibroblastes dans le processus tumoral.....	59
b) Rôle des fibroblastes associés au cancer.....	61
(1) Remodelage de la matrice extracellulaire.....	61
(2) Angiogenèse.....	61
(3) Immunosuppression et inflammation.....	62
(4) Cellules souches cancéreuses	63
(5) Switch métabolique	64
(6) Prolifération des cellules tumorales	65
(7) Migration des cellules tumorales et métastases.....	66
c) Dialogue entre les fibroblastes associés au cancer et les cellules tumorales.....	69
d) Origine des fibroblastes associés au cancer.....	70
(1) Fibroblastes résidents	71
(2) Cellules tumorales et endothéliales	71
(3) Cellules souches mésenchymateuses.....	72
(a) Définition.....	72
(b) Différenciation en CAFs	72
e) Marqueurs des fibroblastes associés au cancer.....	75
B. Le microenvironnement tumoral prostatique	76
1. Angiogenèse.....	77
2. Inflammation et infiltrat immunitaire	78
3. Les fibroblastes associés au cancer prostatique.....	79
Projet de thèse	82
Résultats	84
Partie I : Co-cultures <i>in vitro</i>	85
Article scientifique.....	94
Partie II : Modèle murin	96
Discussion	111
Références bibliographiques	123
Publications et communications personnelles	151
Publications scientifiques	152
Communications personnelles	153

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Localisation de la prostate au niveau de l'appareil urogénital masculin.....	9
Figure 2 : La prostate est divisée en 3 zones morphologiques distinctes	10
Figure 3 : Représentations schématiques du score de Gleason	13
Figure 4 : Principes d'action des agoniste et antagoniste de la LHRH, ainsi que de l'inhibiteur de l'enzyme CYP17	19
Figure 5 : Mécanismes d'action du Bicalutamide et de l'Enzalutamide au niveau cellulaire	19
Figure 6 : Voie de biosynthèse des androgènes à partir du cholestérol.....	20
Figure 7 : L'émergence d'un CPRC se distingue par une augmentation continue du taux de PSA	21
Figure 8 : Structure caractéristique des récepteurs nucléaires.....	22
Figure 9 : Structure moléculaire du gène et de la protéine du RA.....	22
Figure 10 : Localisation de la séquence KELCKAVSVSM au niveau du RA	23
Figure 11 : Représentations du DBD du RA et de son interaction avec l'ADN de gènes cibles	25
Figure 12 : Vue de face et de profil de la structure tridimensionnelle du LBD lorsque la DHT est liée	26
Figure 13 : Schéma récapitulatif des interactions du RA suite à la liaison d'un ligand.	27
Figure 14 : Voie de signalisation génomique/classique/canonique du RA	30
Figure 15 : Voie de signalisation non génomique/non classique/non canonique du RA	31
Figure 16 : La régulation de la transcription du RA nécessite la présence de complexes co-activateurs et co-répresseurs.....	33
Figure 17 : Élément de réponse aux androgènes (ARE) putatif au niveau du gène <i>TMPRSS2</i>	35
Figure 18 : Représentation des mutations faux-sens L702H, W742L/C, H875Y, F877L, et T878A au niveau du LBD du RA.....	38
Figure 19 : Représentations schématiques du RA sauvage et du RA Q641X.....	41
Figure 20 : Approche fonctionnelle chez la levure permettant de détecter des mutants du RA.....	42
Figure 21 : Représentations schématiques des protéines du RA sauvage et du mutant RA Q785X.....	45
Figure 22 : Représentation schématique de l'épissage aberrant aboutissant au variant RA-V7 en comparaison avec le RA sauvage	47
Figure 23 : Représentation de la structure du RA sauvage et des transcrits et protéines des variants du RA.....	51
Figure 24 : Schéma récapitulatif des mécanismes d'échappement du RA à la castration.....	52
Figure 25 : Nombre de publications par année traitant du microenvironnement tumoral au cours des 20 dernières années, d'après PubMed.....	53
Figure 26 : Les différents composants du microenvironnement tumoral.....	54
Figure 27 : La membrane basale et le tissu conjonctif interstitiel constituent la matrice extracellulaire	55
Figure 28 : Mécanismes de l'angiogenèse tumorale.....	57

Figure 29 : Le remodelage aberrant de la MEC par les fibroblastes favorise le processus tumoral.....	60
Figure 30 : Les CAFs peuvent promouvoir l'angiogenèse tumorale en sécrétant divers facteurs et cytokines.....	62
Figure 31 : Effet Warburg et effet Warburg inverse.....	65
Figure 32 : Résumé schématique de l'impact positif des CAFs à tous les stades de la progression tumorale.....	68
Figure 33 : Boucle de régulation positive entre les cellules tumorales et les CAFs.....	70
Figure 34 : Interactions entre les cellules tumorales et les MSCs aboutissant à leur différenciation en CAFs	74
Figure 35 : Les CAFs semblent être constitués de myofibroblastes et de fibroblastes ayant des marqueurs moléculaires distincts.....	75
Figure 36 : Homéostasie de la glande prostatique et formation du stroma réactif dans le CaP	76
Figure 37 : Représentation schématique des voies de signalisation de l'angiogenèse ciblées par des agents thérapeutiques.....	77
Figure 38 : Dialogue entre les cellules tumorales et les MSCs différenciées en CAFs privilégiant la progression du CaP (PCa) jusqu'au processus métastatique	81
Figure 39 : Modèle de co-culture indirecte entre les cellules LNCaP et les MSCs en inserts.	86
Figure 40 : Expression quantitative du marqueur de différenciation FSP-1 dans des MSCs mises en présence de cellules LNCaP transduites.....	89
Figure 41 : Expression quantitative de la GFP dans les cellules LNCaP transduites. .	90
Figure 42 : Immunofluorescence de MSCs ayant été mises en présence de 7 surnageants de clones d'hybridome pour FAP, ou d'un isotype.	98
Figure 43 : Structure du complexe Anticorps / S-HYNIC / Technétium.	99
Figure 44 : Immunofluorescence de MSCs incubées avec un isotype ou avec de l'anticorps anti-FAP couplé à des molécules S-HYNIC.	100
Figure 45 : Représentation schématique du protocole expérimental <i>in vivo</i>	102
Figure 46 : Exemple d'images représentant un piégeage de l'anticorps par la vessie dans une souris n'ayant aucune tumeur mais dont la vessie est pleine.....	105
Figure 47 : Imagerie SPECT et macroscopique de la souris n°2	105
Figure 48 : Imagerie SPECT et macroscopique de la souris n°13	106
Figure 49 : Imagerie SPECT et macroscopique des souris n°16, 18, et 22	108
Figure 50: Analyse hématoxyline éosine des tumeurs des souris n° 2 et 13.....	109
Figure 51 : Le variant RA Q641X faciliterait l'EMT et l'angiogenèse, tout en induisant la différenciation des MSCs en CAFs favorisant la progression tumorale.....	115
Tableau 1 : Groupes pronostiques de la nouvelle classification du score de Gleason ..	13
Tableau 2 : Les différents stades cliniques de la classification TNM.....	15
Tableau 3 : Classification de D'Amico incluant trois groupes de patients.....	16
Tableau 4 : Les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral peuvent inhiber ou favoriser la progression tumorale	58
Tableau 5 : Récapitulatif des tumeurs trouvées ou non, suite à l'euthanasie, dans les différents sous-groupes de souris.....	104

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

α -SMA : actine du muscle lisse de type α
ACTH : hormone adrénocorticotrope
ADAM12 : protéine contenant un domaine métalloprotéinase et désintégrine 12
ADAMTS1 : désintégrine et métalloprotéinase contenant des motifs thrombospondines 1
AJCC: American Joint Committee on Cancer
ALDH1 : aldéhyde déshydrogénase 1
AP-1 : protéine activatrice-1
ARE : élément de réponse aux androgènes
ARNm : ARN messager
ATP : adénosine triphosphate
BET: domaine extraterminal et bromodomaine
BMP-6 : protéine morphogénique osseuse-6
CAF : fibroblaste associé au cancer
CaP : cancer de la prostate
CBP : protéine de liaison à CREB
CoA : co-activateur
COX-2 : cyclo-oxygénase-2
CREB : protéine se fixant à l'élément de réponse de l'adénosine monophosphate cyclique
CSC : cellule souche cancéreuse
CTC : cellule tumorale circulante
C-ter : C-terminal
DBD : domaine de liaison à l'ADN
DHT: 5 α -dihydrotestostérone
Dox : doxycycline
ECACC : European Collection of Authenticated Cell Cultures
EGF : facteur de croissance épidermique
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
EPCAM : molécule d'adhésion aux cellules épithéliales
ERK : kinase régulée par des signaux extracellulaires
FAP : protéine d'activation des fibroblastes
FGC : cellules à croissance rapide
FGF : facteur de croissance des fibroblastes
FISH : hybridation in situ en fluorescence
FSH : hormone folliculo-stimulante

FSP-1 : protéine spécifique des fibroblastes-1
GFP : protéine verte fluorescente
GRIP1 : protéine interagissant avec le récepteur des glucocorticoïdes 1
GRP78 : protéine régulée par le glucose 78
HAT : histone acétyltransférase
HDAC : histones désacétylases
HGF : facteur de croissance hépatocytaire
HIF-1 : facteur induit par l'hypoxie
hK2 : kallikréine 2 humaine
HSP : protéine de choc thermique
HYNIC : succinimidyl-hydrazinonicotinamide
IGF-1 : facteur de croissance insulino-mimétique-1
IL-6 : interleukine-6
IR3 : répétition inversée 3
IRM : imagerie par résonance magnétique
ISUP: International Society of Urological Pathology
KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LBD : domaine de liaison au ligand
LH : hormone lutéinisante
LHRH: gonadolibérine
LNCaP : lymph node carcinoma of the prostate
LSD1 : lysine déméthylase 1
MAOA : monoamine oxydase A
MAPK : protéine kinase activée par des mitogènes
MCT4 : transporteur monocarboxylate 4
MEC : matrice extracellulaire
miARN : micro-ARN
MMP : métalloprotéinase matricielle
MSC : cellule souche mésenchymateuse
mTOR : cible mécanistique de la rapamycine mammalienne
MZF1 : doigt de zinc myéloïde 1
NCoR : co-répresseur de récepteur nucléaire
NF-κB : facteur nucléaire-kappa B
NFAT : facteur nucléaire de cellules T activées
NLS : signal de localisation nucléaire
NTD : domaine N-terminal
PAP : phosphatase acide prostatique
PCGEM1 : transcrit prostatique spécifique

PCR : réaction de polymérase en chaîne
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI3K : phosphatidylinositol kinase-3
PIN : néoplasie intra-prostatique
polyQ : polyglutamine
PRNCR1 : ARN non codant associé au cancer de la prostate
PSA : antigène prostatique spécifique
PTEN : homologue de la tensine et de la phosphatase
RA: récepteur des androgènes
RE : récepteur des estrogènes
RG : récepteur des glucocorticoïdes
RM : récepteur des minéralocorticoïdes
RP : récepteur de la progestérone
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
RT : transcription inverse
SDF-1 : facteur dérivé du stroma-1
shARN : petit ARN en épingle à cheveux
SMAD : Small/Mothers against decapentaplegic
SMRT: silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SOCS1: suppresseur de signalisation cytokinique 1
SPECT : tomographie par émission monophotonique
SPOP : speckle-type POZ protein
SRC : co-activateur de récepteur stéroïde
STAT3 : transducteur de signal et activateur de la transcription 3
SVF : sérum de veau foetal
TAU-1/5 : Unité d'activation de la transcription-1/5
TGF- β : facteur de croissance transformant- β
TIF2 : facteur intermédiaire de transcription 2
TIMP : inhibiteur tissulaire de métalloprotéinases matricielles
TMPRSS2 : serine protéase transmembranaire de type 2
UBE2C : enzyme conjuguant l'ubiquitine E2
UCA-1 : facteur associé au carcinome urothélial-1
UICC : International Union against Cancer
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WT : sauvage
ZEB1 : zinc finger E-box binding homeobox 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le cancer de la prostate

A. La prostate

La prostate est une glande exocrine ayant la forme d'une noix, d'environ 20 cm³. Cet organe pelvien entoure l'urètre et se situe en avant du rectum, entre la vessie et son sphincter urinaire externe, et derrière le pubis (Fig. 1).

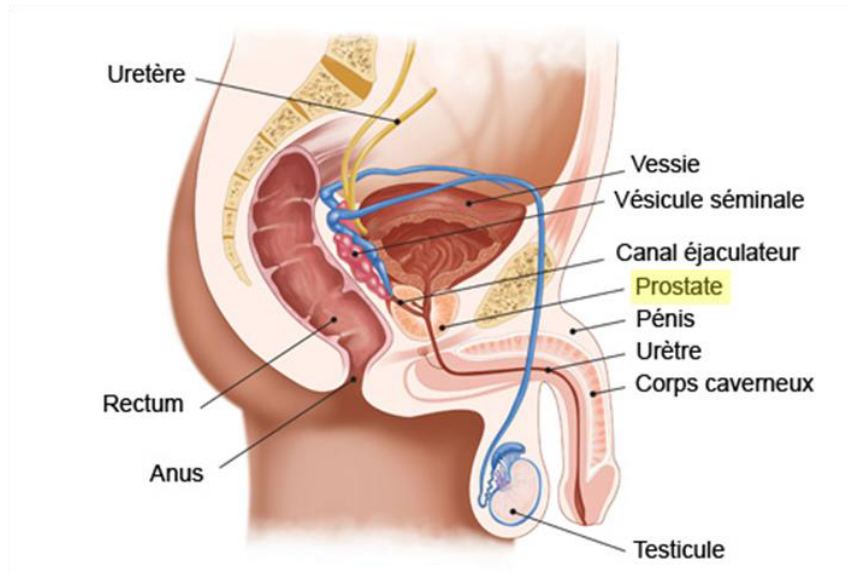


Figure 1 : Localisation de la prostate au niveau de l'appareil urogénital masculin (<https://eurekasante.vidal.fr/>).

Le rôle de la prostate est de sécréter le liquide prostatique entrant dans la composition du sperme en se mélangeant avec les spermatozoïdes en provenance des testicules et avec le liquide séminal en provenance des vésicules séminales. Le liquide prostatique favorise la fécondité du fait d'enzymes facilitant la traversée des spermatozoïdes dans le col utérin. Le liquide prostatique contient notamment d'autres enzymes protéolytiques comme l'antigène prostatique spécifique (PSA) dont le rôle est de fluidifier le sperme. Enfin, il contient de l'acide citrique assurant la survie des spermatozoïdes à travers la production d'adénosine triphosphate (ATP). Le liquide prostatique ne représente que 20 % du liquide séminal, le reste étant produit par les vésicules séminales. Ces dernières permettent le ravitaillement des spermatozoïdes en produisant le liquide séminal riche en fructose et vitamine C (1). Ayant la forme d'une pyramide inversée, sa base se situe en dessous du col de la vessie et son apex au-dessus du sphincter urinaire externe. À la fin des années 1960,

les travaux de John McNeal ont permis de délimiter la prostate en 3 zones morphologiques distinctes selon des critères histologiques (Fig. 2) (2) :

- 1) La zone périphérique, représentant la majeure partie de la glande prostatique, jusqu'à 75 %. Elle est localisée postérieurement et recouvre la partie distale de l'urètre. C'est dans cette zone que la majorité des cancers se développent.
- 2) La zone centrale, constituant 25 % de la glande prostatique. Elle entoure la partie proximale de l'urètre et est traversée par les canaux éjaculateurs. Peu de cancers se développent dans cette zone qui est plus propice au développement d'infections prostatiques.
- 3) La zone de transition, ne représentant que 5 % du tissu prostatique. Elle est constituée de deux petits lobes entourant l'urètre. Les glandes de cette zone sont celles subissant le plus fréquemment une hyperplasie bénigne.

Ces 3 zones constituent le tissu glandulaire représentant les deux tiers de la prostate, le dernier tiers étant constitué par du tissu fibro-musculaire tapissant la face antérieure de la prostate (2,3).

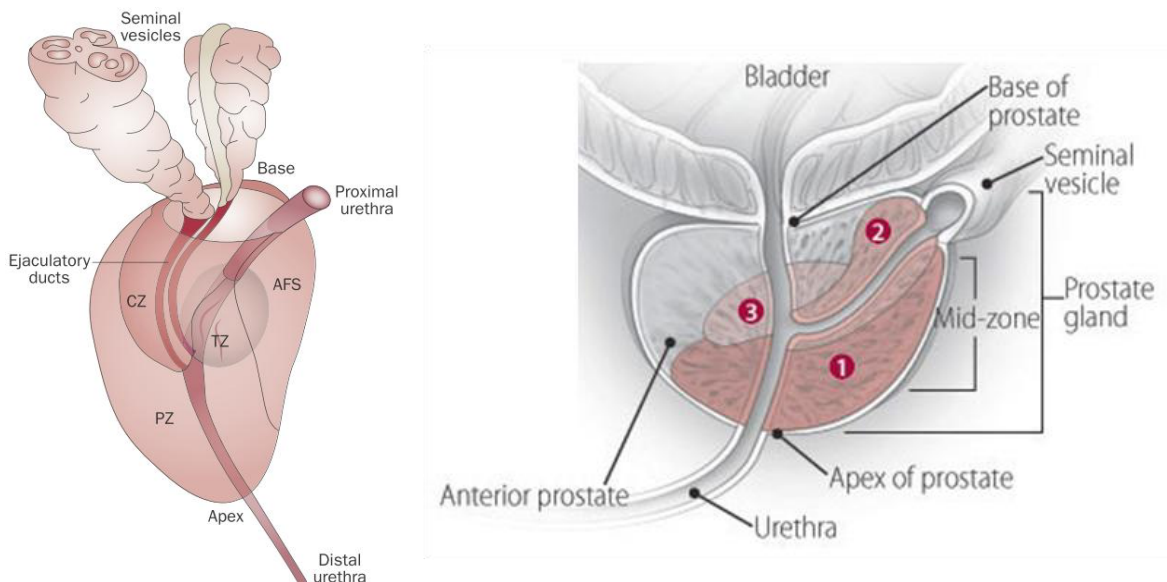


Figure 2 : La prostate est divisée en 3 zones morphologiques distinctes : La zone périphérique (1, PZ), la zone centrale (2, CZ), et la zone de transition (3, TZ). La face antérieure de la prostate étant recouverte de tissu fibro-musculaire (AFS) (3).

B. Épidémiologie du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate (CaP) constitue un problème de santé publique majeur dans les pays occidentaux. En effet, il représente le premier cancer en incidence avec près de 1 nouveau cas de cancer diagnostiqué sur 5 chez l'homme aux États-Unis. En 2018, 164'690 nouveaux cas sont estimés, ce qui représente 19 % de tous les cancers masculins. C'est le deuxième cancer le plus meurtrier après le cancer des poumons avec 29'430 décès estimés pour 2018 (4). Bien que la mortalité du CaP diminue, son incidence est en constante augmentation, et ce en particulier dans les pays ayant un fort développement socio-économique (5). À la fin des années 1980, l'incidence a drastiquement augmenté suite à la généralisation du dosage du PSA, ayant pour conséquence une hausse considérable de la détection de CaP asymptomatiques. Cette augmentation a néanmoins eu tendance à se stabiliser ces dernières années. Une campagne de prévention a été menée afin de réduire le dépistage systématique par dosage du PSA et ainsi lutter contre d'éventuels surdiagnostics et surtraitements (5,6). Malheureusement, il a été établi récemment que les résultats de cette campagne auraient finalement mené à l'augmentation du nombre de patients atteints à un stade avancé au moment du diagnostic. De nouvelles recommandations ont ainsi été données en vue d'une décision médicale partagée pour les patients âgés de 55 à 69 ans (7).

Le CaP est une maladie qui touche essentiellement des hommes âgés. La majorité des hommes diagnostiqués ont 65 ans ou plus. De plus, l'incidence et la mortalité augmentent de façon exponentielle au-delà de 55 ans. Des autopsies réalisées sur des hommes ayant de 70 à 79 ans ont révélé des cas de CaP chez 39 % des sujets. Ce taux monte à plus de 43 % pour des hommes âgés de 80 ans (8).

Par ailleurs, l'incidence du CaP varie significativement en fonction de l'origine ethnique. Celle-ci est plus élevée chez les hommes d'origine afro-américaine qui ont notamment un taux de mortalité 2,4 fois plus élevé que les hommes européens pour le CaP. Ces différences interethniques semblent être dues à une combinaison de facteurs à la fois environnementaux, génétiques, et biologiques, induisant un CaP plus agressif et pouvant progresser plus rapidement (9).

C. Diagnostic du cancer de la prostate

Du fait des risques de surdiagnostic et de surtraitement, les techniques de diagnostic restent encore actuellement controversées. Ainsi, le dépistage de masse par dosage systématique du PSA est déconseillé afin d'éviter la détection de CaP asymptomatiques. À l'inverse, il est recommandé de réaliser un dosage individuel chez les hommes âgés de 50 à 75 ans, décidé après une explication claire des bénéfices et des risques de cette approche. Cette dernière consiste en l'association d'un toucher rectal et d'un dosage du PSA total sérique.

Un CaP est suspecté en cas de toucher rectal anormal et/ou d'une augmentation du taux de PSA à une valeur strictement supérieure à 4 ng/mL. Des formes agressives de CaP peuvent exister en l'absence d'une élévation du taux de PSA, soulignant l'importance cruciale d'associer ces deux outils cliniques. Le diagnostic de CaP est confirmé suite à l'examen anatomo-pathologique de biopsies prostatiques. Les résultats des analyses histologiques permettent ainsi de déterminer la présence ou l'absence de cancer, le type histologique, ainsi que le score de Gleason. Une IRM multiparamétrique est par la suite réalisée afin d'établir une classification TNM, définie ci-après, du cancer, et de différencier les tumeurs localisées, localement avancées, ou métastatiques (10).

1. Le score de Gleason

Le score de Gleason est un système de classement créé en 1966 qui comporte 5 grades architecturaux histologiques allant de 1 à 5. La majorité des tumeurs prostatiques ayant deux patterns histologiques, la somme des deux définit neuf scores allant de 2 à 10. Le pronostic du patient est inversement corrélé au résultat du score (11).

Les grades 1 et 2 sont de moins en moins assignés, du fait d'une non reproductibilité et d'une faible corrélation avec le grade observé suite à la prostatectomie radicale. Le grade 3 consiste en des glandes individuelles bien définies, de tailles variées, incluant des glandes ramifiées. Le grade 4 inclut des glandes peu définies, fusionnées, ainsi que des glandes cribriformes. Enfin, le grade 5 est constitué de larges étendues de tumeur, de cellules individuelles et de cellules en réseau (11,12) (Fig. 3).

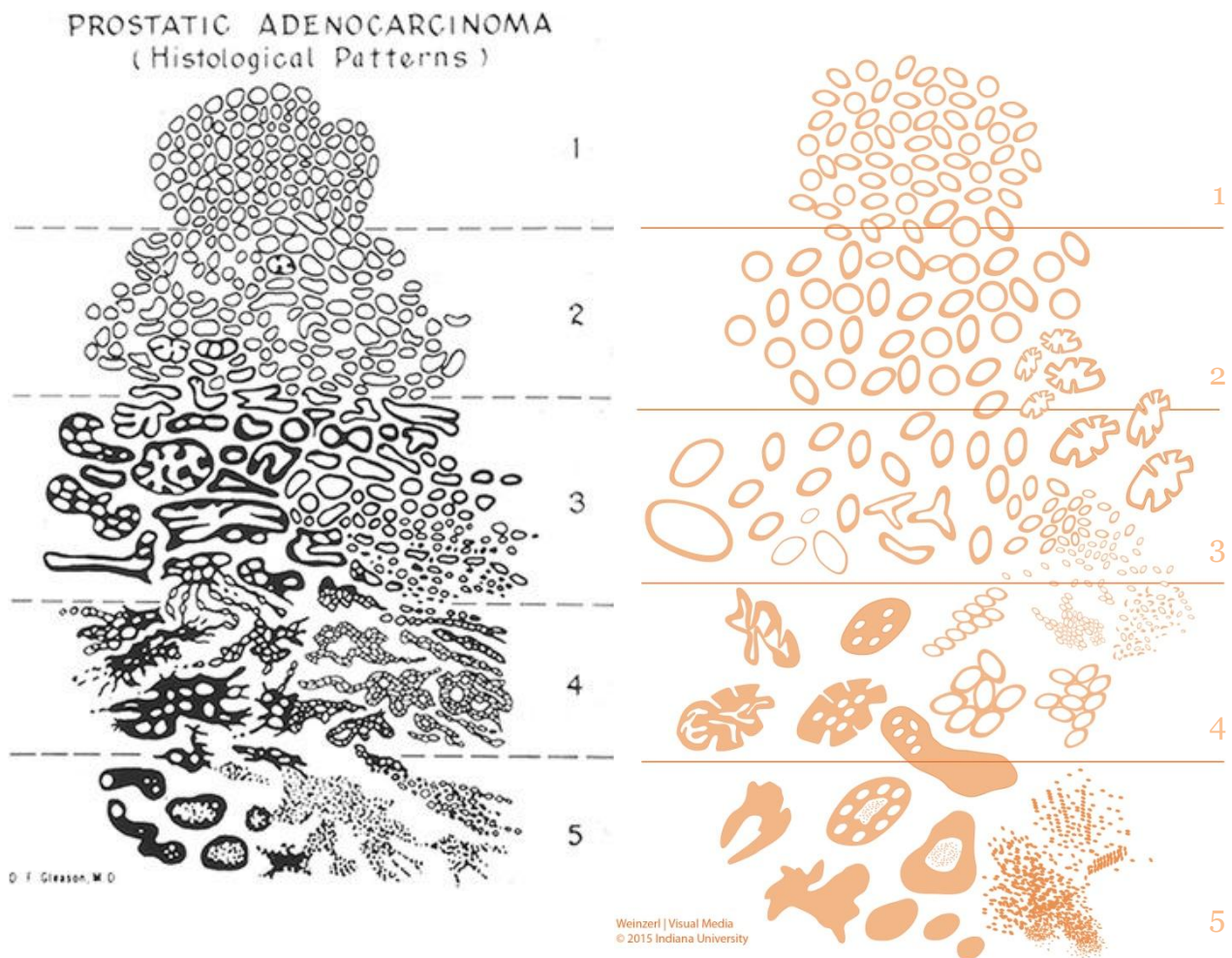


Figure 3 : Représentations schématiques du score de Gleason établi par le Dr. Gleason en 1966 (à gauche, en noir), et suite à sa redéfinition en groupes par l'ISUP en 2014 (à droite, en orange) (11,13).

Groupe 1	Anciennement score de Gleason 6 (3+3)
Groupe 2	Score de Gleason 7 (grade 3 majoritaire)
Groupe 3	Score de Gleason 7 (grade 4 majoritaire)
Groupe 4	Score de Gleason 8 (4+4, 3+5 ou 5+3)
Groupe 5	Score de Gleason 9 ou 10 (4+5, 5+4 ou 5+5)

Tableau 1 : Groupes pronostiques de la nouvelle classification du score de Gleason (14).

Le score de Gleason a été redéfini en 2014 par l'International Society of Urological Pathology (ISUP) aboutissant à cinq groupes pronostiques allant de 1 à 5 (Fig. 3, Tableau 1). Cette nouvelle classification en groupes permet une stratification plus appropriée et simplifiée des tumeurs. Le grade le plus bas étant à présent 1 et non plus 6 (addition des stades de Gleason 1 et 2), le risque de surtraitement des cancers indolents est diminué. Ce nouveau système de classification ainsi que la nouvelle terminologie ont été validés par l'Organisation Mondiale de la Santé en 2016 (12,13,15).

2. La classification TNM

En complément du dosage du PSA et du score de Gleason, la classification TNM est utilisée en tant que pratique standard pour la décision thérapeutique. Cette classification tend à déterminer le volume de la tumeur primaire (T : tumor extent), son extension ganglionnaire (N : lymph node invasion), ainsi que la présence éventuelle de métastases à distance (M : presence or absence of metastasis). Cette classification a été introduite pour la première fois en 1992 pour le CaP par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC)/International Union against Cancer (UICC) lors de sa 4^{ème} édition (16). De même que pour le stade de Gleason, cette classification subit régulièrement des réactualisations. La dernière édition a été publiée en 2016 pour entrer en vigueur en 2018 (17). Les critères définis pour cette édition sont détaillés dans le tableau 2.

<p>T Tumeur primaire</p>	<p>TX : La tumeur primaire ne peut être évaluée</p> <p>To : Pas d'évidence de tumeur primaire</p> <p>T1 : Tumeur non palpable et non visible cliniquement</p> <p> T1a : Tumeur avec incidence histologique retrouvée dans 5 % ou moins du tissu réséqué</p> <p> T1b : Tumeur avec incidence histologique retrouvée dans plus de 5 % du tissu réséqué</p> <p> T1c : Tumeur identifiée par biopsie à l'aiguille et intéressant l'un ou les deux lobes, mais non palpable</p> <p>T2 : Tumeur palpable et confinée à la capsule prostatique</p> <p> T2a : Tumeur atteignant la moitié d'un lobe ou moins</p> <p> T2b : Tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais pas les deux lobes</p> <p> T2c : Tumeur atteignant les deux lobes</p> <p>T3 : Tumeur extra-prostatique qui n'est pas fixée ou qui n'envahit pas les structures adjacentes</p> <p> T3a : Extension extra-prostatique (unilatérale ou bilatérale) ou invasion microscopique du col de la vessie</p> <p> T3b : Tumeur envahissant les vésicules séminales</p> <p>T4 : Tumeur fixée ou envahissant les structures adjacentes autres que les vésicules séminales, comme le sphincter externe, le rectum, la vessie, les muscles élévateurs, et/ou la paroi pelvienne</p>
<p>N Ganglions régionaux</p>	<p>NX : Ganglions régionaux non évalués</p> <p>No : Aucun ganglion régional atteint</p> <p>N1 : Métastases retrouvées dans des ganglions régionaux</p>
<p>M Métastases à distance</p>	<p>Mo : Absence de métastases à distance</p> <p>M1 : Métastases à distance</p> <p> M1a : Métastases dans des ganglions non régionaux</p> <p> M1b : Métastases osseuses</p> <p> M1c : Métastases dans d'autre(s) site(s) avec ou sans atteinte osseuse</p>

Tableau 2 : Les différents stades cliniques de la classification TNM (17).

3. La classification de D'Amico

Du fait des surdiagnostics et surtraitements liés au dosage systématique du PSA à la fin des années 1980, la détection des CaP ayant de faibles taux de progression et de récurrence, est devenue complexe. La classification de D'Amico, établie en 1998, pallie à cette difficulté. Dans cette dernière, les patients ayant un score de Gleason de 6 ou moins (ancienne classification), un taux de PSA supérieur à 10 ng/mL, et une classification TMN comprise entre les stades T1c et T2a, sont inclus dans un groupe de patients à « faible risque » (Tableau 3) (18,19).

Faible risque	PSA \leq 10 ng/ml – score de Gleason \leq 6 – TNM entre T1c et T2a
Risque intermédiaire	PSA entre 10 et 20 ng/ml – score de Gleason = 7 – TNM = T2b
Risque élevé	PSA $>$ 20 ng/ml – score de Gleason $>$ 7 – TNM = T2c

Tableau 3 : Classification de D'Amico incluant trois groupes de patients (18).

D. Traitement du cancer de la prostate

Étant d'évolution lente, le CaP est de bon pronostic s'il est pris en charge de façon précoce. Inversement, à des stades avancés, les tumeurs les plus agressives sont de mauvais pronostic et peuvent entraîner des symptômes du fait de leur dissémination métastatique, même chez des patients âgés de plus de 75 ans (20). Plusieurs traitements du CaP coexistent donc en fonction du stade de la maladie au moment du diagnostic.

1. Patients atteints de tumeurs localisées

Plusieurs options thérapeutiques sont envisageables pour les patients atteints de CaP à un stade précoce :

a) La surveillance active

Comme son nom l'indique, cette approche consiste à réaliser régulièrement des examens (dosage du PSA, IRM, nouvelle biopsie...) sans pour autant intervenir. Cette surveillance est proposée à tous les patients dont la tumeur est bien différenciée, présente sur moins de 3 biopsies, sur une longueur de moins de 3 mm, dont le stade de Gleason est de 6 (ancienne classification), et ayant un dosage du PSA $<$ 10 ng/mL. Cette approche est particulièrement proposée aux patients les plus

jeunes. Bien que les données montrent que la plupart des patients finiront par avoir un traitement, ce dernier pourra être néanmoins décalé de plusieurs années, préservant ainsi une qualité de vie significative (21).

b) La chirurgie

La prostatectomie radicale reste un des traitements de référence des cas de CaP localisés. Elle consiste en l'ablation totale de la prostate et des vésicules séminales, permettant ainsi une maîtrise quasi complète des risques tumoraux à long terme. Bien que les techniques chirurgicales aient beaucoup évolué ces dernières années, l'incontinence urinaire et les dysfonctions érectiles restent les complications postopératoires les plus fréquentes. Afin de diminuer au maximum ces complications, la prise en charge doit être réalisée le plus rapidement possible après l'opération. En cas d'échec, des thérapies médicamenteuses sont disponibles afin d'améliorer au maximum la qualité de vie des patients (22–24).

c) La curiethérapie

Aussi appelée brachythérapie ou radiumthérapie, cette technique consiste en l'implantation permanente d'un isotope radioactif au sein même de la tumeur. En ce qui concerne la prostate, ce sont des grains d'iode 125 qui sont implantés. Du fait de leur faible énergie, ils permettent une irradiation extrêmement localisée, permettant ainsi une réduction de l'irradiation des tissus sains environnants. Les patients susceptibles de recevoir cette thérapie sont ceux présentant un CaP de « Faible risque » selon la classification de D'Amico (Tableau 3). D'autres patients peuvent être candidats à condition que leur dosage du PSA ne dépasse pas 15 ng/mL et que leur volume prostatique soit inférieur à 50-60 cm³ (25–27).

d) La radiothérapie

Cette approche concerne des tumeurs plus agressives, ciblées par des radiations ionisantes. Actuellement, la méthode standard utilisée est la radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle en modulation d'intensité. Cette dernière permet de diminuer la toxicité à long terme en comparaison avec la radiothérapie conventionnelle. Elle permet aussi d'augmenter la dose délivrée à la tumeur sans pour autant augmenter la toxicité, tout en irradiant de plus grands volumes pelviens. Les radiations sont notamment délivrées par escalade de dose et de façon fractionnée, améliorant ainsi le pronostic des patients (28–30).

2. Patients atteints de tumeurs localement avancées ou métastatiques

L'hormonothérapie ou traitement hormonal du CaP reste à ce jour le traitement de référence pour les cas localement avancés ou métastatiques. Basée sur la privation androgénique, cette stratégie a pour but de diminuer les taux d'androgènes circulants, en réponse au caractère androgéno-dépendant des CaP démontré dès 1941 (31). Pour ce faire, plusieurs axes sont ciblés :

a) Agonistes ou antagonistes de la LHRH

La production d'androgènes au niveau testiculaire est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus sécrète l'hormone LHRH (gonadolibérine) qui va se fixer sur son récepteur au niveau de l'hypophyse, et y induire la sécrétion des hormones LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculo-stimulante), stimulant la production d'androgènes par les cellules de Leydig au niveau des testicules. L'hypothalamus sécrète aussi l'hormone ACTH (hormone adrénocorticotrope) qui favorise la production d'androgènes au niveau des glandes surrénales. Ainsi, l'inhibition de la sécrétion de ces hormones hypophysaires permet la suppression de la sécrétion d'androgènes testiculaires et surrénaliens (Fig. 4). Cette inhibition peut se faire via :

- Désensibilisation des récepteurs hypophysaires de la LHRH à travers un agoniste de la LHRH à action prolongée.
- Blocage direct des récepteurs hypophysaires de la LHRH à travers un antagoniste de la LHRH.

L'antagoniste de la LHRH permet une castration plus rapide que les agonistes de la LHRH. Par ailleurs, l'administration d'un agoniste de la LHRH induit une brusque et importante augmentation du taux d'androgènes (*flare-up*, ou flambée androgénique). Ce phénomène peut être régulé par l'administration d'un anti-androgène simultanément à la prise de l'analogue de la LHRH (32,33).

b) Anti-androgènes

Les anti-androgènes sont des antagonistes du récepteur des androgènes (RA) inhibant son activité. Pour médier leur action, les androgènes tels que la 5 α -dihydrotestostérone (DHT) se lient à leur récepteur, le RA, dans le cytoplasme de la cellule. Ce dernier est ensuite transloqué dans le noyau où il se fixe à l'ADN induisant la transcription de gènes cibles à l'aide de co-activateurs (CoA). Les anti-androgènes

comme le Bicalutamide, utilisé depuis 1995, se lie au domaine de liaison au ligand (LBD) du RA, empêchant ainsi la liaison des androgènes et l'activation du RA. L'Enzalutamide est un anti-androgène plus récent (2012) et plus efficace que le Bicalutamide. Il présente une affinité accrue pour le RA, inhibe la translocation du RA dans le noyau ainsi que sa liaison à l'ADN (Fig. 5) (34–37).

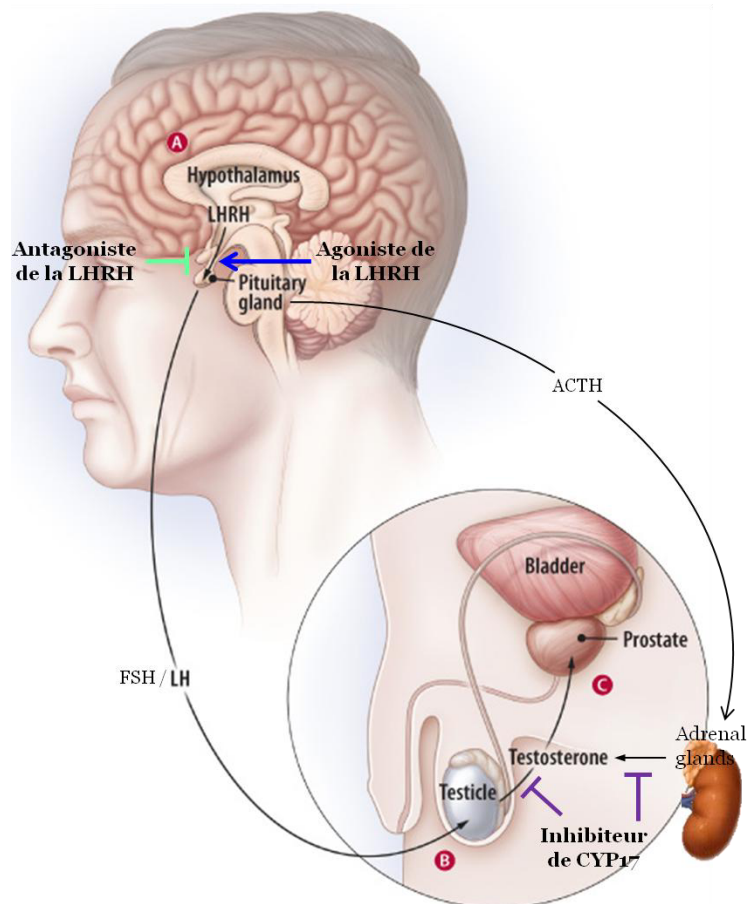


Figure 4 : Principes d'action des agoniste et antagoniste de la LHRH, ainsi que de l'inhibiteur de l'enzyme CYP17 (modifié d'après <https://www.harvardprostateknowledge.org>).

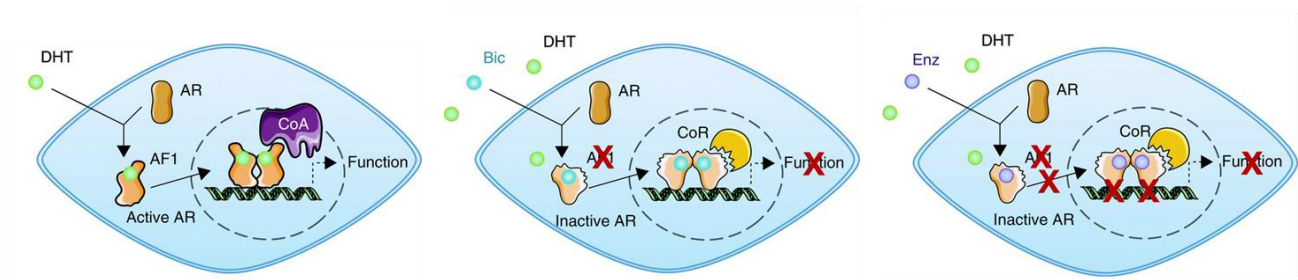


Figure 5 : Mécanismes d'action du Bicalutamide (Bic) et de l'Enzalutamide (Enz) au niveau cellulaire (38).

c) Hormonothérapie de seconde génération

Bien que la quasi-totalité des patients répondent de façon favorable à la thérapie hormonale, la durée de réponse varie entre plusieurs mois et plusieurs années et s'accompagne majoritairement d'une progression vers une résistance. Ce stade est appelé CaP résistant à la castration (CRPC) et représente une issue létale de la maladie (39). Ainsi, de nouvelles approches thérapeutiques ont vu le jour. La voie de signalisation du RA étant toujours active, ce dernier reste une cible clé à ce stade. Le maintien de la suppression androgénique reste donc nécessaire. Dans cette optique, l'acétate d'abiratérone a montré des résultats prometteurs en inhibant une enzyme clé de la biosynthèse des androgènes, CYP17. CYP17 est un membre de la superfamille des cytochromes P450 ayant une activité 17,20-lyase ainsi que 17 α -hydroxylase. Son activité est régulée par le cytochrome b5 et elle se situe majoritairement au niveau des testicules où elle participe à la voie de biosynthèse des androgènes. Cette enzyme se trouve notamment dans les glandes surrénales où elle favorise la synthèse d'androgènes à travers la production de cortisol (Fig. 4) (Fig. 6) (40-43).

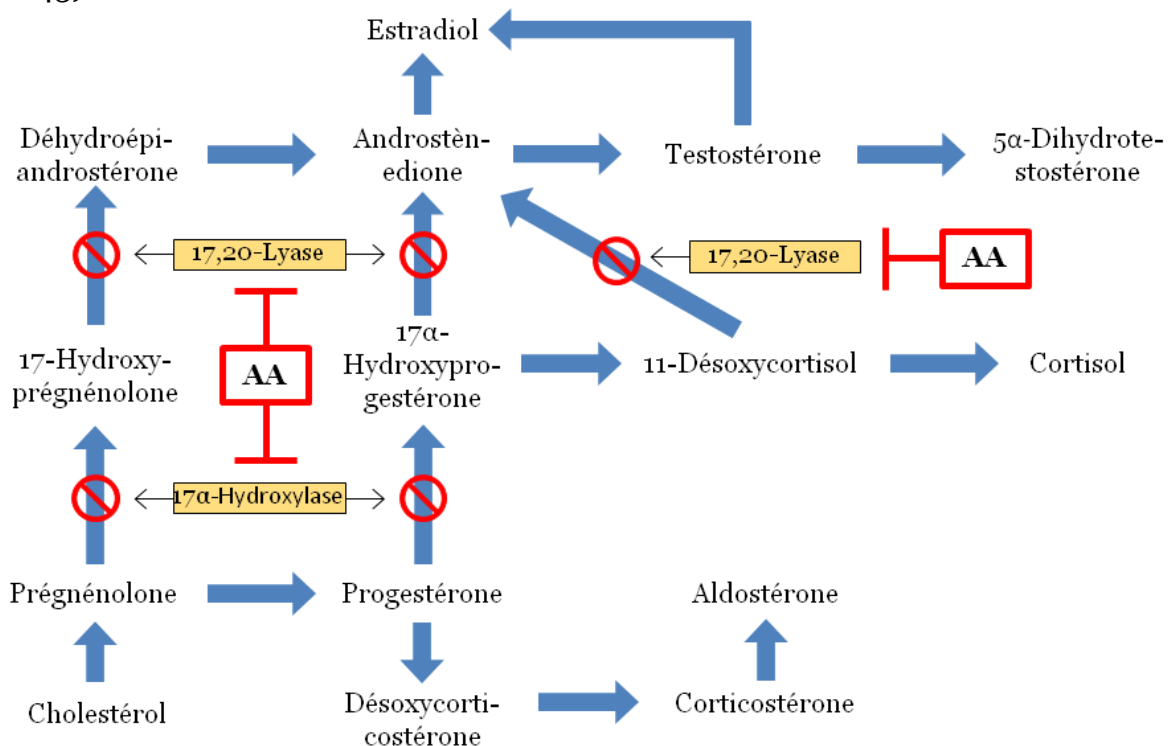


Figure 6 : Voie de biosynthèse des androgènes à partir du cholestérol. L'acétate d'abiratérone (AA) inhibe les enzymes CYP17, 17,20-Lyase et 17 α -Hydroxylase, de façon irréversible, aboutissant à la diminution de la synthèse d'androgènes au niveau de la prostate ainsi que des glandes surrénales (43).

Bien que la thérapie hormonale de 2nde génération ait permis une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale, celle-ci reste modeste puisque le bénéfice de survie n'est que de 2 à 5 mois (44). Malgré le fait que l'arsenal thérapeutique soit large et se développe constamment, le CPRC reste incurable et mène encore actuellement à un stade de la maladie systématiquement létal. L'axe de signalisation du RA en cause dans la persistance des androgènes semble être l'axe majeur responsable de la résistance à la castration. Il est donc indispensable d'étudier de façon plus approfondie cet axe et ses mécanismes sous-jacents.

E. Le récepteur des androgènes

Le CPRC est caractérisé par une croissance tumorale persistante malgré des taux résiduels d'androgènes résultants de la castration médicale par hormonothérapie. Il se manifeste par une ré-augmentation du taux de PSA suite aux différentes thérapies hormonales (Fig. 7). Le PSA étant un gène cible du RA, ce phénomène démontre que les mécanismes de résistance dépendent majoritairement de l'axe de signalisation du RA (45).

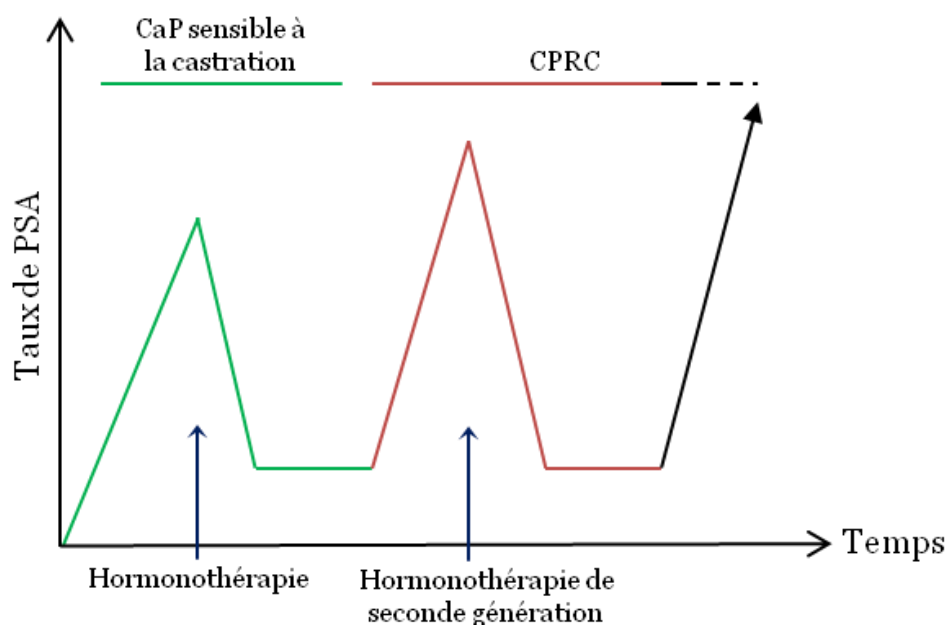


Figure 7 : L'émergence d'un CPRC se distingue par une augmentation continue du taux de PSA au cours du temps malgré les traitements de castration médicale (45).

1. Structure du récepteur des androgènes

Le RA est un récepteur des hormones stéroïdes appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. C'est un facteur de transcription ligand-dépendant contrôlant l'expression de gènes spécifiques. En tant que membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, il possède une structure commune à d'autres récepteurs nucléaires dont le récepteur des estrogènes (RE), le récepteur des glucocorticoïdes (RG), le récepteur de la progestérone (RP) ou encore le récepteur des minéralocorticoïdes (RM). Les domaines de fonctions communs entre ces différents récepteurs sont représentés par le domaine N-terminal (NTD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région charnière, ainsi que la région C-terminale (C-ter) où se trouve le domaine de liaison au ligand (LBD) (Fig. 8,9) (46,47).



Figure 8 : Structure caractéristique des récepteurs nucléaires contenant un domaine N-terminal variable (A/B), un domaine de liaison à l'ADN conservé (C), une région charnière variable (D), un domaine de liaison au ligand conservé (E), et une région C-terminale variable (F) (46).

Le gène du RA est localisé sur le bras long du chromosome X au niveau du locus Xq11-q12 (réf [NM_000044.2](#)). Il contient 8 exons de longueur variable et code pour une protéine de 920 acides aminés. L'exon 1 code pour le NTD, les exons 2 et 3 pour le DBD, les exons 4 à 8 encodant la région charnière ainsi que le LBD (Fig. 9) (48).

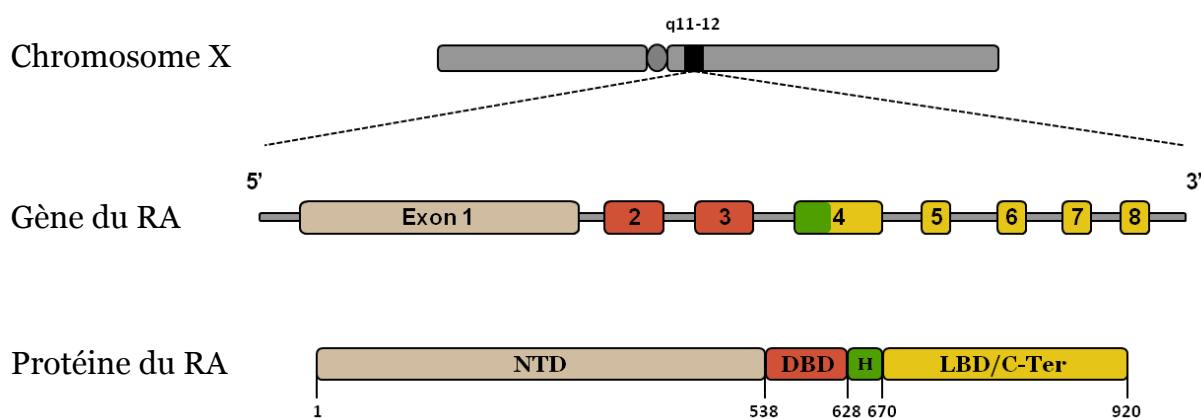


Figure 9 : Structure moléculaire du gène et de la protéine du RA.

a) *Le domaine N-terminal*

Ce domaine représente plus de la moitié du RA et compte 538 acides aminés. Il est entièrement codé par l'exon 1. À l'inverse du LBD et du DBD, cette région ne contient pas d'homologie de séquence avec d'autres récepteurs nucléaires. En effet, la structure de ce domaine est fortement désordonnée. Sa longueur est très variable entre les différents types de récepteurs, le RA tout comme le PR et le MR étant les récepteurs ayant les NTD les plus longs. Le NTD est caractérisé par la présence de plusieurs répétitions d'acides aminés incluant des répétitions de séquences de polyglutamine (CAG) et polyglycine (GGC). La longueur et la séquence de ces répétitions sont très variables au sein de la population. Néanmoins, on retrouve deux larges extensions polymorphiques de glutamine et de glycine, de 20 à 23 résidus et de 16 à 23 résidus respectivement. Deux répétitions plus courtes de glutamine sont aussi retrouvées, de 5 à 6 résidus (49,50).

Une expansion de ces répétitions de séquence de polyglutamine (polyQ) est associée à une insensibilité aux androgènes et à l'apparition du syndrome de Kennedy, encore appelé amyotrophie bulbo-spinale liée à l'X. Cette maladie génétique neuromusculaire se caractérise par une atrophie et une faiblesse musculaire, accompagnées d'une dégénérescence des motoneurons primaires au niveau de la moelle épinière et du tronc cérébral (51,52). À l'inverse, un raccourcissement de la séquence polyQ, inférieur à 20 résidus, est associé à un risque accru de CaP et à une progression plus importante de ce dernier (53,54).

L'expansion de séquences polyQ induit un mauvais repliement protéique ayant pour conséquence une agrégation et la formation de fibres amyloïdes. La séquence KELCKAVSVSM située entre les acides aminés 235 et 245 du NTD a récemment été démontrée comme étant responsable de la modulation de l'oligomérisation des séquences polyQ aboutissant à la formation de ces fibres amyloïdes (Fig. 10) (55,56).

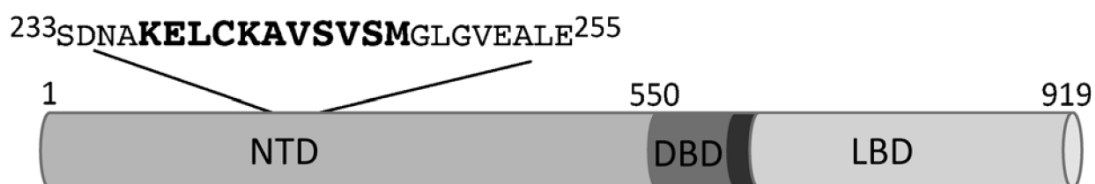


Figure 10 : Localisation de la séquence KELCKAVSVSM au niveau du RA (55).

Les séquences contenues dans le NTD sont nécessaires à la régulation de l'expression des gènes par le RA et sont regroupées dans la fonction de transactivation 1 (AF-1). Cette dernière est composée de deux régions : TAU-1 (acides aminés 101 à 307) et TAU-5 (acides aminés 360 à 528) (unité d'activation de la transcription) qui sont respectivement ligand-dépendante et ligand-indépendante. Par ailleurs, la présence d'un motif FxxLF (acides aminés 23 à 27) est nécessaire à la liaison de protéines co-régulatrices au NTD et facilite l'interaction entre les domaines NTD et C-ter. La première protéine co-régulatrice se liant au NTD à avoir été identifiée est le facteur de transcription TFIIF (57). Ce dernier est important pour le recrutement de l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription et pour la régulation de l'activité d'élongation de cette polymérase. Plusieurs autres protéines co-régulatrices ont par la suite été mises en évidence, comme les protéines SRC-1 et 2 (co-activateur de récepteur stéroïde) de la famille des co-activateurs p160, ou encore l'histone acétyltransférase CBP. Le NTD est donc primordial pour assurer la communication avec la machinerie transcriptionnelle de la cellule (49,50,58).

b) Le domaine de liaison à l'ADN

Le DBD de tous les récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes est constitué de 2 doigts de zinc permettant la reconnaissance spécifique de séquences d'ADN consensus. Les ions zinc sont coordonnés par 4 résidus cystéine. Ces doigts de zinc facilitent la liaison du RA à l'ADN au niveau des promoteurs et régions enhancers des gènes cibles. Ils facilitent ainsi les fonctions d'activation du NTD et du LBD afin de stimuler ou réprimer la transcription de ces gènes (Fig. 11,A). Ceci se fait par l'intermédiaire de liaison spécifique aux éléments de réponse aux androgènes (AREs) permettant l'activation spécifique du RA. Ces éléments de réponse sont constitués de 2 demi-sites hexamériques palindromiques (5'-AGAACA-3'), séparés par 3 nucléotides (IR₃).

Le DBD contient également 2 hélices α . Au niveau N-terminal, la première hélice α , dite de reconnaissance, contient 5 acides aminés particuliers constituant la P(roximal) box. Cette P box permet à l'hélice d'interagir directement et de façon spécifique avec les nucléotides des AREs dans le grand sillon de l'ADN des gènes cibles. La deuxième hélice α contient elle aussi 5 acides aminés particuliers qui déterminent la D(istal) box. Son rôle est d'assurer l'homodimérisation du RA à

travers une conformation « tête à tête » (Fig. 11,B). Le DBD est relié au LBD par la région charnière (49,58,59).

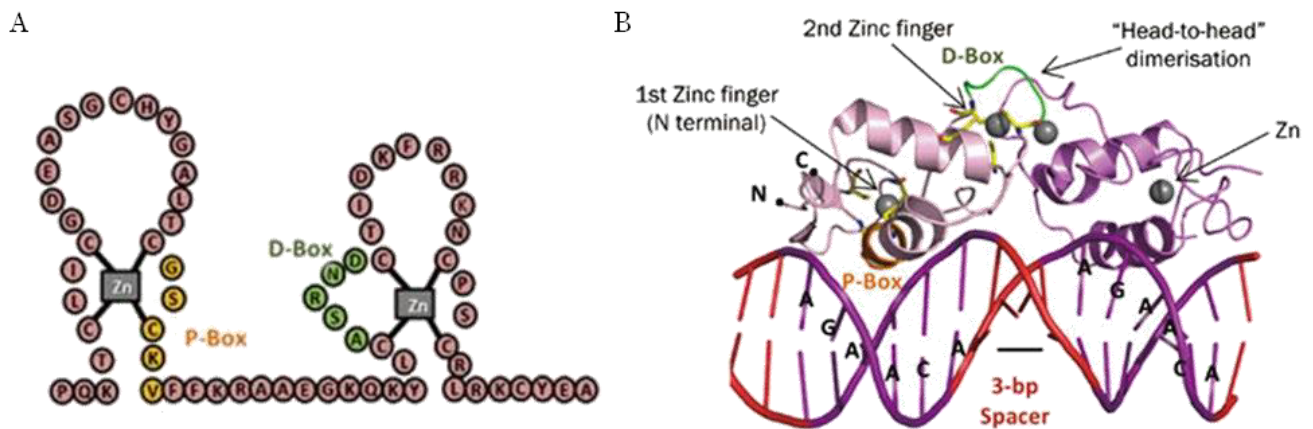


Figure 11 : Représentations du DBD du RA (A) et de son interaction avec l'ADN de gènes cibles (PDB: 1R4I) (B) (58).

c) La région charnière

La région charnière contient une cinquantaine d'acides aminés et comprend l'extension C-terminale du DBD, le signal de localisation nucléaire (NLS) ainsi que des sites de modifications post-traductionnelles. L'extension C-terminale du DBD a un rôle important dans la reconnaissance et la liaison aux AREs sélectifs. La NLS bipartite se compose de 2 clusters d'acides aminés basiques séparés par 10 résidus. Ce motif est hautement conservé avec d'autres récepteurs comme le RG, le RM ou le RP. Cette séquence est impliquée dans l'import nucléaire du RA. En effet, le transport passif à travers les pores nucléaires ne concerne que les protéines ayant un poids moléculaire compris entre 20 et 40 kDa. Le RA ayant un poids moléculaire de 110 kDa, ce dernier nécessite un transport actif. Suite à la liaison d'androgènes activant le RA, la NLS est démasquée et induit la liaison avec l'importine α , à travers la séquence $^{629}\text{RKLKKL}^{634}$, entraînant l'import nucléaire du RA.

En plus de la localisation nucléaire, la région charnière est impliquée dans la liaison à l'ADN, le recrutement de co-activateurs, et l'interaction entre les domaines N-terminal et C-terminal. Enfin, cette région est la cible de modifications post-traductionnelles comme des acétylations, des méthylations, ou encore des ubiquitinations (60–62).

d) *Le domaine de liaison au ligand*

Le LBD est formé de 11 hélices α et 2 feuillets β arrangés en 3 couches formant un sandwich antiparallèle, la poche de liaison au ligand (LBP) étant enfouie à l'intérieur de celui-ci. Les hélices H1 et H3 forment la première couche du sandwich α -hélicoïdal. Contrairement à d'autres récepteurs nucléaires comportant généralement 12 hélices α , l'hélice H2 est absente du RA, remplacée par un long connecteur flexible. La couche intermédiaire est formée des hélices H4, H5, H8, et H9, ainsi que du premier feuillet β . La troisième couche est constituée des hélices H10 et H11. La LBP hydrophobe est organisée à partir des régions N-terminales des hélices H3, H5, et H11. En présence d'un ligand, l'hélice H12 subit un réarrangement au niveau du domaine C-ter et, en formant le deuxième feuillet β , agit comme un verrou au niveau de la LBP pour stabiliser le ligand. Ce changement conformationnel forme une fente hydrophobe à la surface du LBD et permet l'élaboration de la fonction de transactivation 2 (AF-2) dont l'hélice H12 forme le cœur (Fig. 12) (63,64).

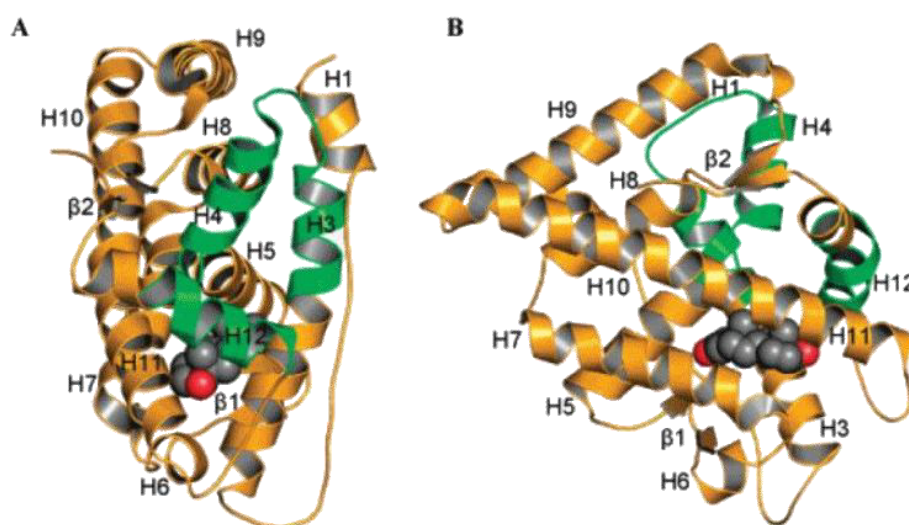


Figure 12 : Vue de face (A) et de profil (B) de la structure tridimensionnelle du LBD lorsque la DHT est liée (PDB : 1I37). La DHT est représentée par ses 19 atomes de carbone (noir) et ses 2 atomes d'oxygène (rouge). La fonction de transactivation AF-2 correspond aux hélices H3, H4, et H12, et est colorée en vert (64).

Cette fonction de transactivation AF-2 est cruciale pour l'interaction entre les domaines N-ter et C-ter et sert de point d'ancrage pour le recrutement des protéines co-régulatrices. Généralement, la fonction de transactivation AF-2 à la surface du LBD sert de point d'ancrage pour des co-régulateurs contenant des motifs LxxLL.

Cependant, la fonction AF-2 du RA présente une affinité plus forte pour les co-régulateurs contenant des motifs FxxLF. Étant donné que la séquence ²³FQNLF²⁷ est présente au niveau du NTD, la fonction AF-2 favorise donc l'interaction entre les domaines N-ter et C-ter plutôt que l'activation transcriptionnelle directe. Suite à cette interaction entre les deux domaines, le RA finit par se lier à l'ADN et l'interaction s'interrompt, rendant possible l'accès aux co-régulateurs (Fig. 13) (65,66).

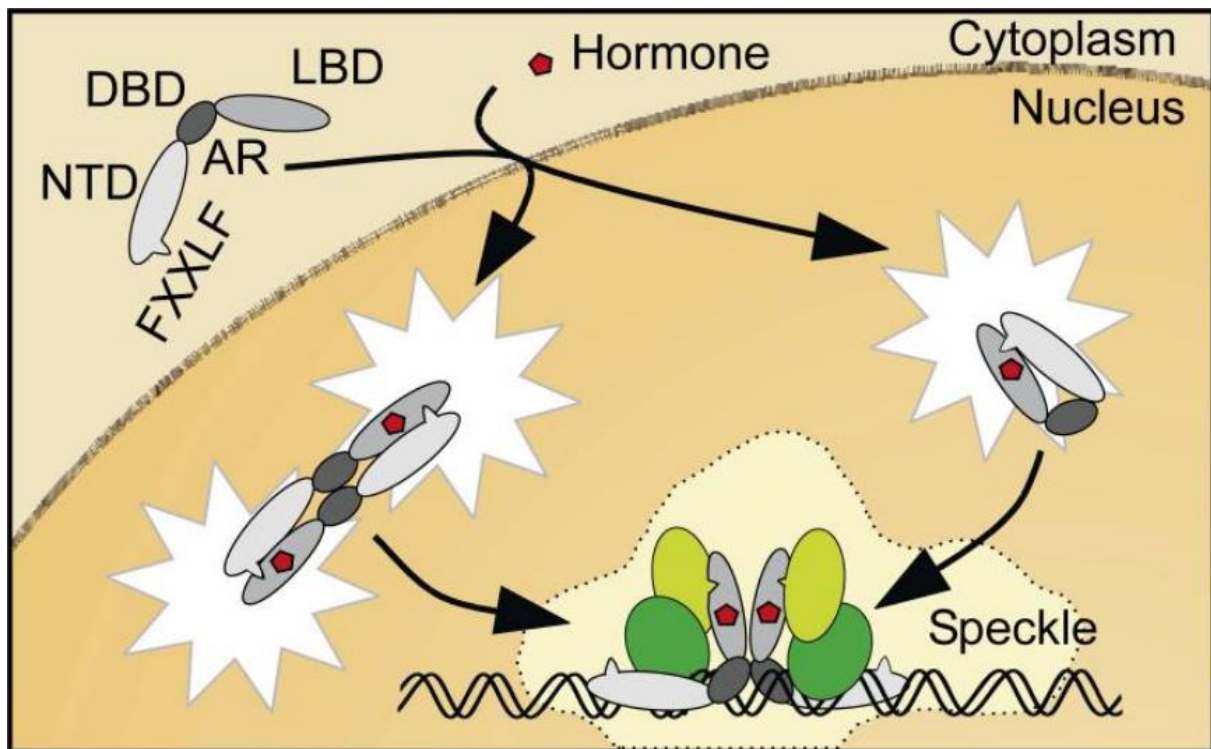


Figure 13 : Schéma récapitulatif des interactions du RA suite à la liaison d'un ligand. Après liaison de la DHT au niveau du LBD, les domaines NTD et C-ter interagissent entre eux, entre deux RA, ou au sein du même RA. Celui-ci est ensuite internalisé dans le noyau où il se lie à l'ADN. L'interaction NTD/C-ter prend ensuite fin et permet la liaison de protéines co-régulatrices (vert) (65).

Dix-huit acides aminés situés de part et d'autre des 11 hélices α sont impliqués dans les interactions directes avec le ligand. Alors que la plupart de ces interactions sont hydrophobes, les interactions ayant lieu entre les acides aminés Q712, M746, et R753 du RA avec l'oxygène O-3 sont des liaisons hydrogène. De même, le groupement hydroxyle 17 β -OH forme des liaisons hydrogène avec les acides aminés N706 et T878 du RA.

Par conséquent, les mutations touchant ces acides aminés ont des conséquences significatives du fait de l'altération de la spécificité de reconnaissance du ligand. De fait, la mutation T878A permet une activation aberrante du RA en réponse à l'acétate de cyprotérone ainsi qu'au flutamide, deux anti-androgènes. De façon intéressante, cette mutation permet aussi une activation aberrante du RA en réponse à d'autres hormones stéroïdes que les androgènes. Elle fournit donc un avantage sélectif important vis-à-vis de la croissance et de la survie des cellules tumorales prostatiques (58,67).

2. Modes d'action du récepteur des androgènes

Bien avant la puberté ou l'âge adulte, les androgènes jouent un rôle primordial dans l'initiation de l'axe de signalisation du phénotype masculin. Ils initient la différenciation de la glande prostatique à partir de la fin du second trimestre de gestation. Lors de la puberté, ils induisent la croissance de la prostate puis initient les fonctions sécrétrices de cette glande à l'âge adulte. Les androgènes ne peuvent médier leurs effets qu'en présence du RA à travers 2 modes d'action. Le premier mode d'action du RA est la voie génomique, dite classique ou canonique, majoritaire. La seconde voie est non génomique, non classique ou non canonique, et aboutit à une signalisation des androgènes beaucoup plus rapide que pour la première voie (68–70).

a) Voie génomique

En l'absence de ligand, le RA est localisé dans le cytoplasme de la cellule. Il forme alors un hétérocomplexe avec des protéines de choc thermique (HSP), des immunophilines, ainsi que des protéines du cytosquelette. Ce complexe de protéines chaperonnes, contenant entre autres les protéines HSP90, 70, et 56, aide au repliement de la protéine en maintenant le RA dans une conformation de haute affinité vis-à-vis de la liaison au ligand, facilitant ainsi la reconnaissance et la liaison de ligands spécifiques. Les HSP sont plus particulièrement attachées à des protéines du cytosquelette comme la protéine filamine A. Les filamines constituent une classe de protéines qui se fixent sur l'actine, permettant ainsi la stabilisation de sa structure tridimensionnelle. La filamine A interagit directement avec la région charnière du RA modulant sa conformation en vue d'une liaison au ligand efficace (71).

La testostérone circulante est liée à la globuline liant les hormones sexuelles et est ensuite réduite en DHT à l'intérieur de la cellule par l'enzyme 5α -réductase. En présence de DHT, l'association et la co-localisation de la filamine A avec le RA sont amplifiées. Il s'en suit un changement conformationnel au niveau des hélices H3, 4, et 12 du LBD aboutissant à la formation de la fonction de transactivation AF-2. Cette fonction AF-2 constitue la principale surface de liaison et d'interaction avec les co-activateurs du fait de la poche formée au sein du LBD. Il s'en suit un réarrangement conformationnel du RA ayant pour conséquence la dissociation de ses protéines chaperonnes. Le RA est ensuite capable d'interagir avec ses co-régulateurs dont l'importine α entraînant sa translocation dans le noyau de la cellule. Une fois dans le noyau, le RA est homodimérisé de façon intra- ou intermoléculaire, à travers les interactions entre les domaines NTD et C-ter (71,72).

Le RA fonctionne majoritairement en tant qu'homodimère, bien qu'il puisse aussi former des hétérodimères avec d'autres récepteurs aux hormones stéroïdes comme le RE. À l'intérieur du noyau, le RA va pouvoir se fixer à l'ADN en se liant aux AREs au niveau de régions promotrices et enhancers de gènes cibles. Cette liaison à l'ADN met fin à l'interaction entre les domaines NTD et C-ter et permet le recrutement d'histones acétyltransférases (HAT), de co-activateurs, et de la machinerie transcriptionnelle, induisant la transcription des gènes cibles. La nature du ligand lié au RA détermine la stabilité du complexe RA-ADN et par extension la mesure dans laquelle la transcription est initiée. Un antagoniste du RA par exemple pourra s'y lier et induire l'import nucléaire de même que la liaison à l'ADN, mais cette liaison à l'ADN sera fortement réduite aboutissant à une activité transcriptionnelle faible. La perte de la liaison du ligand induit le démasquage de la séquence d'export nucléaire (NES) et l'adressage du RA dans le cytoplasme où celui-ci sera à nouveau lié aux protéines chaperonnes. Par ailleurs, le RA peut être dégradé à travers le protéasome. Cette dégradation est médiée par la phosphorylation de résidus spécifiques au niveau du RA qui vont reconnaître l'ubiquitine ligase E3 (Fig. 14) (71-73).

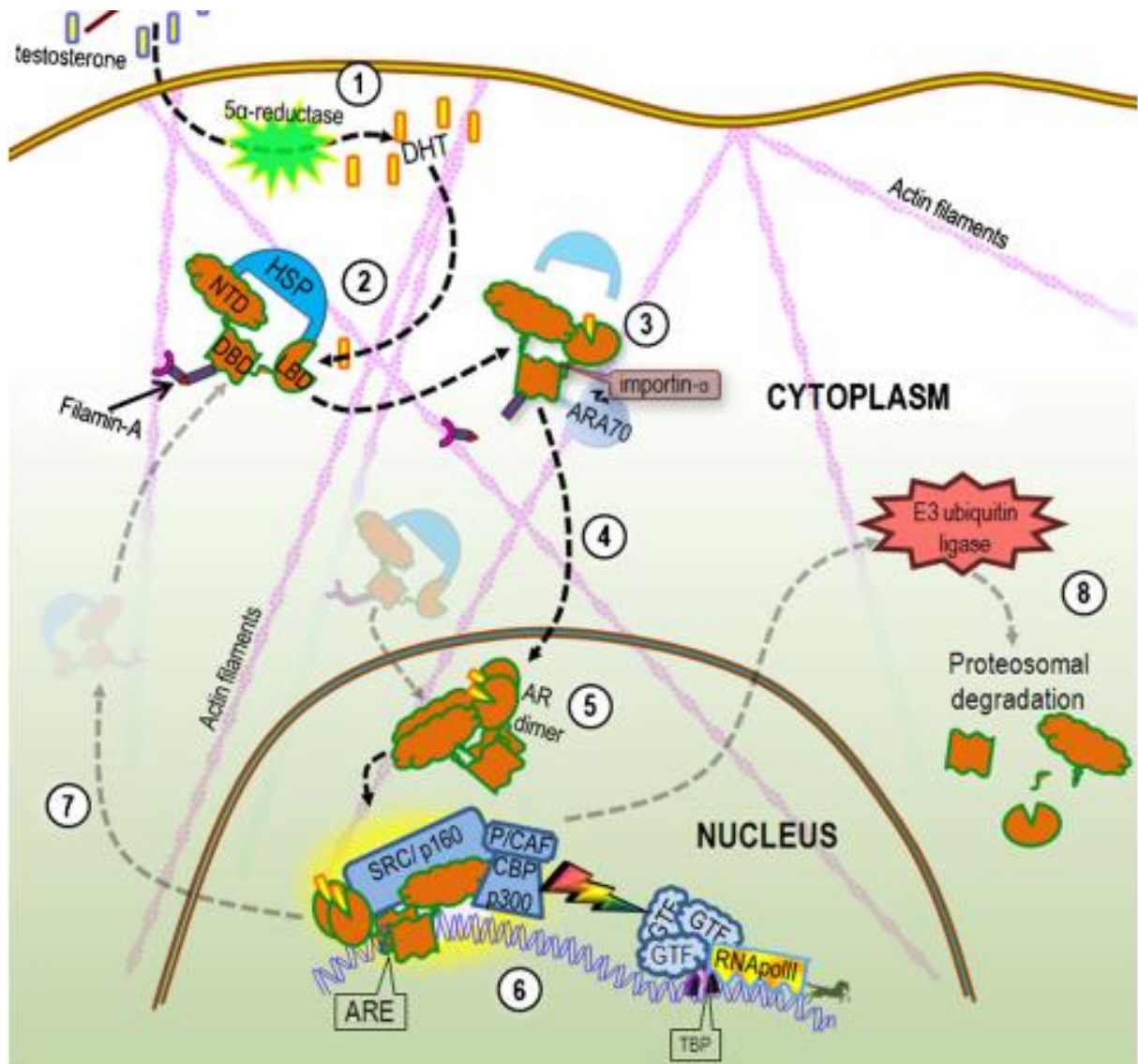


Figure 14 : Voie de signalisation génomique/classique/canonique du RA (71).

b) Voie non génomique

En plus de la voie génomique classique, le RA peut être activé selon une autre voie non génomique, non classique ou non canonique. Cette voie est caractérisée par une réponse extrêmement rapide de la cellule aux androgènes, de l'ordre de quelques minutes voire quelques secondes, indiquant une absence de transcription des gènes cibles. En effet, la voie génomique du RA implique des interactions au niveau de la membrane plasmique ou à l'intérieur du cytoplasme, ayant pour conséquences une augmentation du taux de calcium intracellulaire et l'activation de protéines kinases comme les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), la protéine kinase A, la protéine Akt, ou encore la protéine kinase C. Il a été démontré que le NTD du RA peut interagir avec la sous unité régulatrice p85 de la protéine phosphatidylinositol kinase-3 (PI3K), aboutissant à la régulation de la protéine Akt (74).

Par ailleurs, le RA peut interagir avec le domaine d'homologie SRC3 et stimuler rapidement l'activité kinase de la protéine SRC, aboutissant à l'activation de la protéine ERK2 (kinase régulée par des signaux extracellulaires). Enfin, le RA peut interagir avec la membrane plasmique où sont situées des cavéoles contenant de nombreuses protéines comme les protéines SRC ou MAPK. Le RA peut donc interagir et stimuler directement des voies de signalisation intracellulaires. Les kinases ayant été activées par le RA peuvent phosphoryler et activer le RA, même en absence de ligand. La voie non génomique du RA peut donc s'adapter à des taux variables d'androgènes, du fait de cette boucle de rétrocontrôle positif (Fig. 15) (74–77).

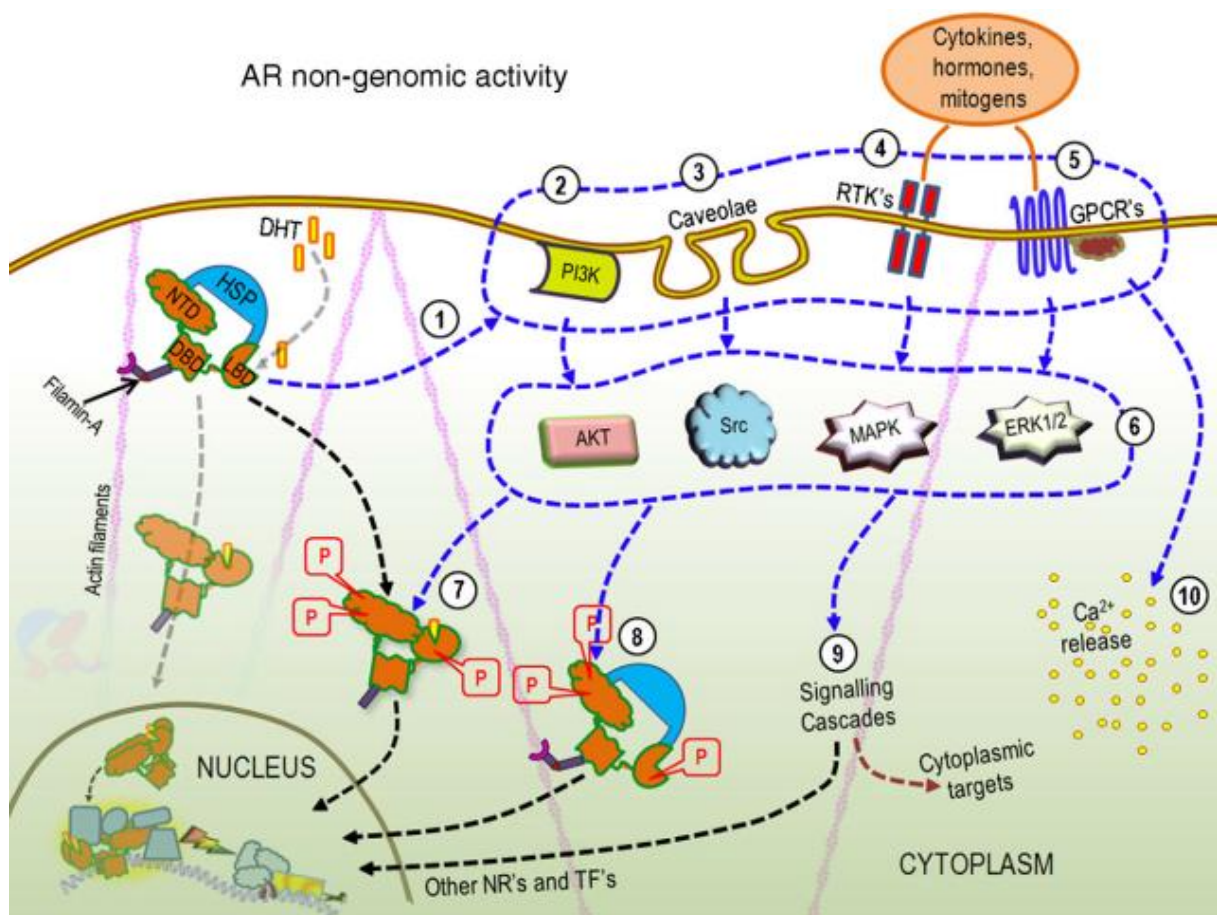


Figure 15 : Voie de signalisation non génomique/non classique/non canonique du RA (71).

c) Co-régulateurs du récepteur des androgènes

Un grand nombre de protéines co-régulatrices interagissent avec le RA et sont nécessaires au bon déroulement de la transcription. Ces co-régulateurs peuvent initier la transcription ou à l'inverse l'inhiber.

(1) Co-activateurs

La formation du complexe de pré-initiation de la transcription du RA nécessite le recrutement de co-activateurs. Par ailleurs, la liaison d'un ligand au niveau du LBD s'accompagne d'une augmentation de l'affinité des co-activateurs pour le RA. Les co-activateurs de la famille SRC (co-activateur de récepteur stéroïde) tels que SRC-1, TIF2 (facteur intermédiaire de transcription), et GRIP1 (protéine interagissant avec le récepteur des glucocorticoïdes), partagent la même organisation structurale et ont pour rôle le recrutement de facteurs de transcription ainsi que le recrutement d'autres co-activateurs ayant une fonction HAT. Ils interagissent avec le NTD et le LBD du RA. Ces co-activateurs sont caractérisés par la présence de motifs LxxLL localisés au centre de leur séquence peptidique, ainsi qu'une région C-terminale riche en glutamine, ces deux éléments servant à la liaison au RA. Ils stabilisent la liaison du ligand au RA et favorisent l'activation de ce dernier. Leur expression est fortement augmentée dans les CPRC (78). Les co-activateurs ayant une activité HAT, comme CBP/p300, permettent de faciliter le remodelage de la chromatine et la liaison de la machinerie transcriptionnelle. Les protéines co-régulatrices associées au RA (ARA) sont donc majoritairement des co-activateurs et sont nommées en fonction de leur poids moléculaire. Par exemple, la protéine ARA70 a un impact sur la stabilisation du ligand au niveau du RA et stimule cette liaison, ayant pour conséquence une augmentation de l'activation du RA. De cette manière, la transcription du PSA nécessite la fixation du RA complexé à ses co-activateurs au niveau des régions enhancer puis promotrice du gène, permettant le recrutement de l'ARN polymérase II (Fig. 16) (79–82).

(2) Co-répresseurs

À l'inverse des co-activateurs, les co-répresseurs inhibent l'initiation de la transcription des gènes cibles du RA. Deux exemples bien caractérisés sont les co-répresseurs NCoR (co-répresseur du récepteur nucléaire) et SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors). SMRT interagit avec les

domaines NTD et LBD du RA, à la fois en présence et absence de ligand. Inversement, NCoR n'interagit avec ces domaines qu'en présence de ligand. Ces deux co-répresseurs entraînent la dissociation de l'interaction ayant lieu entre les domaines NTD et C-ter du RA, et entrent en compétition avec les co-activateurs de la famille SRC. Par la suite, ils induisent le recrutement d'histones désacétylases (HDAC) entraînant l'empaquetement de l'ADN en nucléosomes. Ces HDAC empêchent notamment l'accès de la machinerie transcriptionnelle, des facteurs de transcription, et du RA aux régions promotrices de gènes. Ce faisant, ils répriment la transcription des gènes cibles. Il a été démontré que l'activité du co-répresseur NCoR1 diminue lors de la progression du CaP. La diminution de cette activité entraîne une résistance à l'anti-androgène Bicalutamide *in vitro* et *in vivo* (Fig. 16) (81–84).

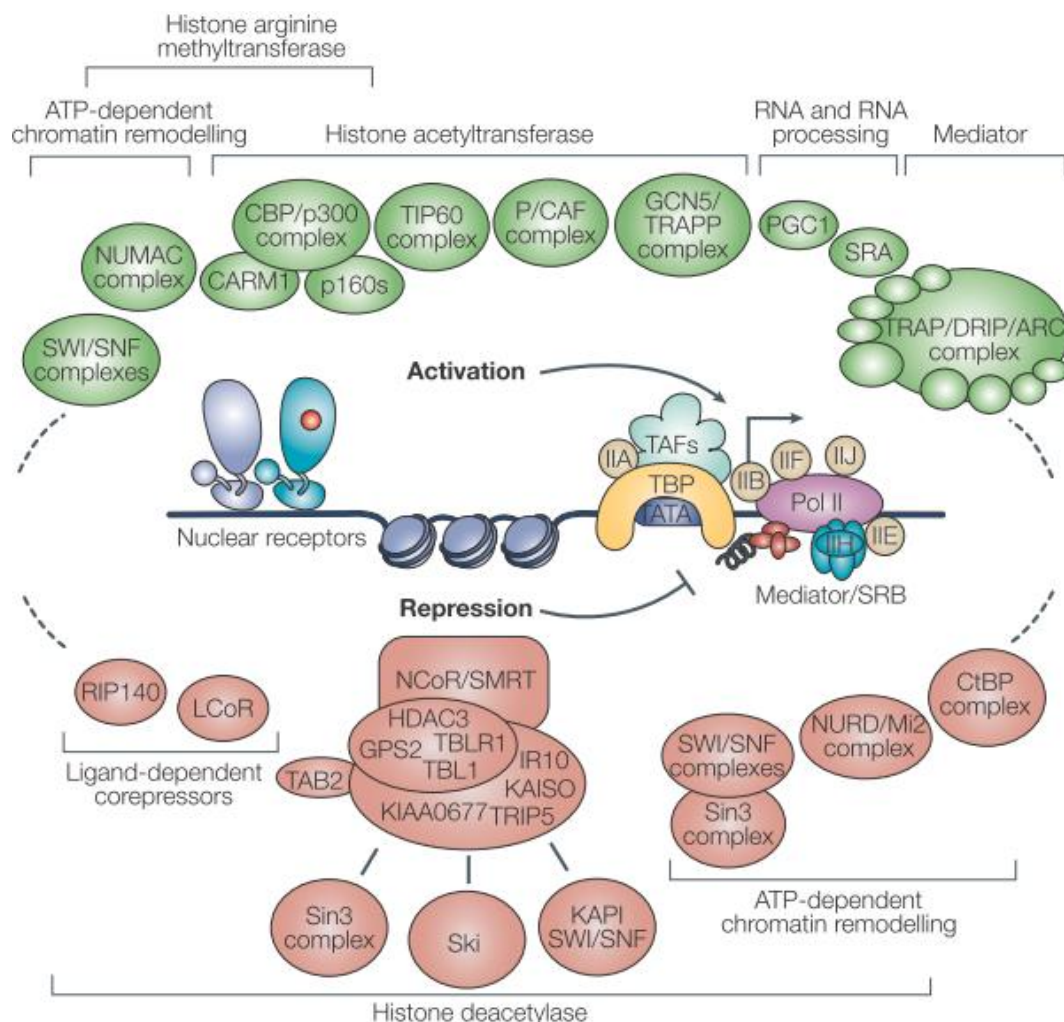


Figure 16 : La régulation de la transcription du RA nécessite la présence de complexes co-activateurs (vert) et co-répresseurs (rouges) (82).

Du fait de l'interaction des co-régulateurs avec le RA, qu'ils soient co-activateurs ou co-répresseurs, il en découle une régulation de la transcription de gènes cibles du RA extrêmement fine et complexe.

d) Gènes cibles du récepteur des androgènes

La transcription de nombreux gènes est sous le contrôle du RA, dont les plus connus sont les gènes du PSA, aussi appelé kallikréine 3, de la kallikréine 2, ainsi que TMPRSS2.

Le PSA est une glycoprotéine de la famille des kallikréines humaines ayant une activité sérine protéase. Impliquée dans la fluidification du sperme, elle empêche sa coagulation à travers la dégradation de protéines de haut poids moléculaire sécrétées par les vésicules séminales. Les taux de PSA au niveau de la prostate sont quasiment 1 million de fois supérieurs à ceux retrouvés dans le sérum. De faibles taux de PSA peuvent être notamment retrouvés dans le fluide amniotique, la glande mammaire lactante, ainsi que dans quelques sous types de tumeurs ovariennes et mammaires. Le gène du PSA est largement modulé par les androgènes et le RA sous-jacent. Pour ce faire, le RA se lie aux AREs aux régions promotrices du gène. Trois AREs, nommés AREI, II et III, ont été décrits pour ce gène, aux positions -170, -394 et -4200 paires de base, à distance du site d'initiation de la transcription. Les deux premiers AREs se situent au niveau de la région promotrice du gène, et le troisième au niveau de la région enhancer. En présence d'un ligand, le RA est activé et va se fixer sur ces 3 motifs, induisant le recrutement d'un complexe de transcription incluant les co-activateurs p160, CBP, p300 ainsi que l'ARN polymérase II (85–87).

La kallikréine 2 (hK2) est une sérine protéase similaire en de nombreux points au PSA. Ces deux protéases partagent 80 % d'homologie de séquence. En comparaison avec le PSA, la concentration de hK2 n'est que de 10 à 50 % dans la prostate et les taux dans le sérum sont 50 à 100 fois plus faibles. Bien qu'elle ne soit pas exclusivement fonctionnelle que dans la prostate, elle contient une région enhancer en 5' de 3 à 5 kb en amont du site d'initiation de la transcription, dans laquelle se trouve un ARE (88–90).

De façon similaire aux deux protéases précédentes, la sérine protéase transmembranaire de type 2, TMPRSS2, est également impliquée dans une cascade protéolytique dont la finalité est la liquéfaction du sperme. Son expression est localisée dans la prostate et est régulée par les androgènes. En effet, elle contient une

séquence de 15 paires de base ayant une homologie significative par rapport à la séquence consensus de l'ARE. Cette séquence putative est localisée à la position -148 par rapport au site de l'initiation de la transcription (Fig. 17) (91).

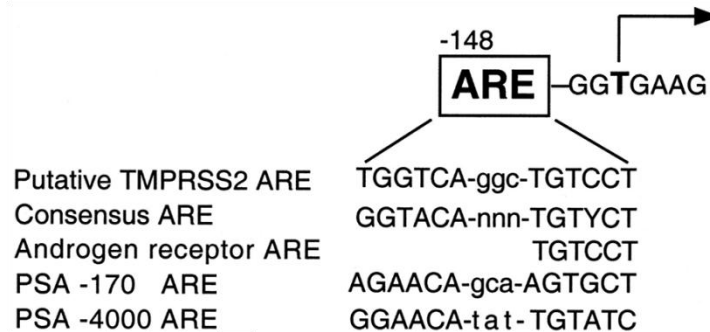


Figure 17 : Élément de réponse aux androgènes (ARE) putatif au niveau du gène *TMPRSS2* (91).

De façon intéressante, Tomlins et al. ont identifié en 2005 des réarrangements chromosomiques aboutissant à des fusions entre le gène *TMPRSS2* et la partie 3' de deux membres de la famille des facteurs de transcription oncogéniques ETS, à savoir ERG ou ETV1. Ils ont retrouvé ce gène de fusion chez 55 % des patients atteints d'un CaP (92). Il a ensuite été démontré que la fusion du gène *TMPRSS2* avec les oncogènes ETS est le réarrangement le plus fréquent dans le CaP. De plus, le gène de fusion *TMPRSS2:ERG* est à présent reconnu comme étant l'anomalie génétique la plus fréquente dans les cancers solides humains. Enfin, la surexpression de l'oncogène ERG est la plus communément reportée dans les cellules tumorales prostatiques. Elle est notamment d'autant plus fréquente chez des patients atteints d'un CaP à un âge jeune. Le gène de fusion *TMPRSS2:ERG* joue donc un rôle majeur dans la tumorigenèse prostatique (93–96). Ces données soulignent l'impact des androgènes et par extension du RA sur la progression tumorale du CaP.

3. Le récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate résistant à la castration

Le RA est une molécule effectrice nécessaire au développement normal mais aussi néoplasique de la prostate. En particulier, celui-ci reste activé dans plus de 80 % des CPRC, suggérant que la progression tumorale prostatique nécessite la réactivation du RA. Cette réactivation s'effectue selon divers mécanismes (71).

a) Surexpression

L'augmentation de l'expression du RA est une des anomalies les plus fréquemment retrouvées dans le CPRC. Cette augmentation entraîne une hypersensibilisation des cellules tumorales aux faibles taux d'androgènes résultant de la castration, les rendant capables de continuer à progresser malgré ces taux résiduels. Une amplification du gène du RA est souvent à l'origine de cette augmentation d'expression de la protéine. Les patients atteints de CPRC ayant suivi des traitements de thérapie hormonale présentent entre 17 et 75 % d'amplification génique du RA, en fonction du traitement reçu. À l'inverse, les patients n'ayant pas encore subi de traitement ne présentent que très rarement une amplification génique du RA. Cette amplification a pu être détectée dans les cellules tumorales circulantes de patients atteints d'un CPRC et est responsable d'une résistance face aux traitements ciblant le RA, à travers notamment la conversion d'anti-androgènes comme le Bicalutamide en agonistes du RA du fait de mutations faux-sens modifiant l'affinité du RA pour ses ligands. Les niveaux d'expression du RA sont donc déterminants pour la progression de la maladie (97–100).

b) By-pass

Un mécanisme de by-pass du RA a été mis en évidence dans lequel d'autres récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes sont activés avec comme finalité l'induction des mêmes voies de signalisation que celles en aval du RA. Dans cette optique, il a été mis en évidence que bien que le RG ne soit présent que dans 30 % des CaP, ce pourcentage augmente drastiquement dans les cas de CPRC. Le RG étant capable de réguler un certain nombre de gènes cibles du RA, l'augmentation de son expression induit l'acquisition d'une résistance à l'anti-androgène Enzalutamide. Il est important de noter que la maintenance de l'expression du RG dépend de l'inhibition du RA puisque la liaison du RA au locus du RG réprime son expression. Le fait est que l'administration de glucocorticoïdes peut être bénéfique aux patients atteints d'un CPRC, puisqu'ils inhibent la synthèse d'ACTH, et par ce biais diminuent la production d'androgènes. Des données supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer dans quelle mesure utiliser, ou non, ces glucocorticoïdes dans le traitement du CaP (101–103).

Un autre mécanisme de substitution du RA a été mis en évidence par l'intermédiaire d'autres voies de signalisation interagissant avec celle du RA. Une des voies de

signalisation les plus communément altérées dans le CaP est celle de PI3K/Akt. Cette voie très conservée joue un rôle essentiel dans la régulation des processus cataboliques et anaboliques de la cellule. De même, le gène suppresseur de tumeur *PTEN* (homologue de la tensine et de la phosphatase), impliqué dans l'inhibition de la voie PI3K/Akt, subit des mutations ou des délétions dans plus de la moitié des stades avancés du CaP. Il a été démontré que dans des modèles murins déficients pour *PTEN*, le RA et la voie PI3K/Akt peuvent interagir de façon réciproque via un rétrocontrôle. Dans ce modèle, l'inhibition du RA favorise l'expression de Pi3K, maintenant ainsi la survie des cellules tumorales prostatiques (104–106).

c) Altération des co-régulateurs

Comme indiqué précédemment, les co-régulateurs sont indispensables au bon fonctionnement normal du RA en régulant efficacement sa transcription. Par conséquent, les patients atteints de CPRC présentent fréquemment une augmentation de l'expression de co-activateurs du RA concomitante à une diminution de l'expression de co-répresseurs. En particulier, les co-activateurs de la famille SRC voient leur expression augmenter au fur et à mesure de la progression de la maladie. Cette augmentation de leur expression stimule l'activation du RA en présence de faibles taux d'androgènes et potentialise l'utilisation de ligands alternatifs par le RA. Par ailleurs, une surexpression du co-activateur SRC-2 dans l'épithélium prostatique murin est suffisante pour provoquer le développement d'un adénocarcinome prostatique. Inversement, la déplétion de SRC-2 dans des souris déficientes pour *PTEN* prévient le développement d'un CPRC (98,99,107,108).

En ce qui concerne les co-répresseurs, l'expression de NCoR1 et NCoR2 est communément diminuée par mutation et/ou délétion dans les CPRC. L'expression de SPOP (speckle-type POZ protein), un régulateur négatif du RA, est similairement diminuée aux stades avancés de la maladie. SPOP est une ubiquitine ligase E3 qui promeut l'ubiquitination et la dégradation sous-jacente non seulement du RA, mais aussi du co-activateur SRC-3, diminuant ainsi l'activité transcriptionnelle du RA. De ce fait, la perte d'expression de ces co-répresseurs facilite l'activité du RA et donc la progression tumorale (98,99,109).

d) Mutation ponctuelles

Plus de 150 mutations ponctuelles ont été décrites jusqu'à présent au niveau du RA, dans le CaP (<http://androgendb.mcgill.ca/>). Celles-ci concernent

majoritairement le LBD, mais aussi le NTD. Les mutations retrouvées le plus fréquemment sont celles situées dans le LBD. Elles facilitent la signalisation du RA en lui permettant de s'activer même en présence de faibles taux, voire absence, d'androgènes, et en conférant des propriétés d'agonistes aux antagonistes du RA.

(1) Mutations faux-sens

Les mutations les plus récurrentes au niveau du LBD sont les mutations faux-sens T878A, F877L, L702H, H875Y ainsi que W742L/C (Fig. 18).

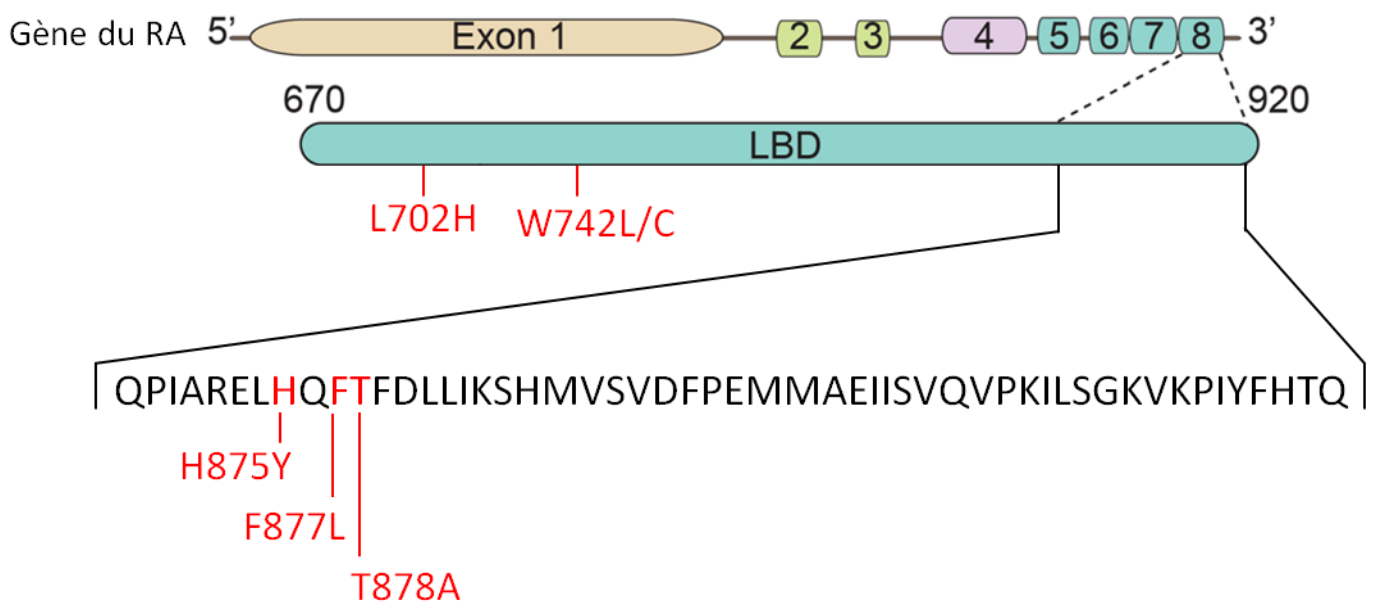


Figure 18 : Représentation des mutations faux-sens L702H, W742L/C, H875Y, F877L, et T878A au niveau du LBD du RA (110).

(a) T878A

Cette mutation a initialement été mise en évidence dans la lignée cellulaire tumorale prostatique LNCaP, dans laquelle les cellules sont encore sensibles aux androgènes. Elle confère au RA la capacité de s'activer en présence d'autres ligands que les androgènes, comme la progestérone, les estrogènes, ou encore les glucocorticoïdes. Elle lui permet notamment de s'activer en présence d'anti-androgènes comme le Flutamide. Cette adaptation du RA à d'autres ligands pourrait être due au fait que la mutation résulte en un espace plus grand au niveau du LBD, permettant ainsi au ligand d'y entrer et de s'accommoder plus facilement à la LBP.

Par ailleurs, la mutation T878A facilite l'interaction du RA avec le co-activateur SRC-1 et, à l'inverse, réduit l'interaction avec le co-répresseur NCoR1 (110–113).

(b) F877L

La mutation F877L a été découverte à partir d'ADN de plasma de patients atteints d'un CaP à un stade avancé et traités à l'Enzalutamide.

Cette mutation possède une affinité pour l'Enzalutamide 6 fois plus élevée par rapport au RA sauvage. Elle permet donc au RA d'utiliser l'Enzalutamide en tant qu'agoniste.

Elle se situe en aval de la mutation décrite précédemment T878A et y est étroitement liée d'un point de vue mécanistique. En effet, un double mutant provenant de la fusion de ces deux mutations a été retrouvé chez des patients dont la maladie a progressé suite au traitement à l'Enzalutamide. Ce double mutant F877L/T878A potentialise les effets d'agoniste de l'Enzalutamide en augmentant l'affinité du RA pour cet anti-androgène, et en stimulant les interactions entre les domaines NTD et C-ter du RA. De même, il amplifie le recrutement de co-activateurs au RA ainsi que sa mobilité intranucléaire (114–117).

(c) H875Y

La mutation H875Y élargit la spécificité de ligands du RA lui permettant de s'activer en présence d'estrogènes, de progestérone ou de glucocorticoïdes. Elle induit aussi une réponse positive du RA à des anti-androgènes comme le flutamide. Elle a par ailleurs été récemment retrouvée chez des patients atteints de CPRC et présentant une résistance à l'acétate d'abiratérone. (118–120).

(d) L702H

Cette mutation ayant été identifiée au niveau de cellules tumorales androgéno-indépendantes, elle confère au RA la propriété de s'activer en absence d'androgènes. De plus, elle rend le RA sensible à d'autres ligands comme la progestérone et les estrogènes. La présence de cette mutation chez des patients avant traitement à l'acétate d'abiratérone induit une résistance à cet agent et est corrélée à une diminution des taux de survie globale et sans progression post traitement. De façon similaire, la fréquence de cette mutation augmente suite au traitement à l'acétate d'abiratérone (121–123).

(e) W742L/C

Deux substitutions sont possibles pour cette mutation, à savoir W742L et W742C. Elles ont été mises en évidence dans la lignée cellulaire LNCaP traitée au Bicalutamide en absence d'androgènes pendant plusieurs semaines. Ces deux mutations sont capables de modifier la spécificité de ligands du RA, rendant ainsi possible son activation en présence des anti-androgènes Bicalutamide et Flutamide. Plus en détail, ces mutations augmentent la distance entre l'hélice H12 du RA et l'anneau β du Bicalutamide, diminuant ainsi l'encombrement stérique et permettant un réarrangement de l'hélice H12 qui aboutit à la formation de la fonction de transactivation AF-2 et à l'initiation de la transcription.

De façon similaire au double mutant F877L/T878A, il existe un double mutant W742C/T878A qui potentialise la réponse positive du RA à l'anti-androgène Bicalutamide (124–126).

Les mutations faux-sens localisées au niveau du NTD ne représentent qu'un tiers des mutations décrites dans le RA. Ces mutations aboutissent généralement à un recrutement amplifié de co-activateurs ou d'autres composants de la machinerie transcriptionnelle. Elles induisent notamment une augmentation des interactions ayant lieu entre les domaines NTD et C-ter, ainsi qu'une hypersensibilité à la DHT. Enfin, une stimulation de la rétention nucléaire, accompagnée d'une amplification de la stabilité protéique peuvent être observées. Ces événements ont pour finalité l'intensification de la transactivation du RA. En permettant au RA de s'adapter aux traitements et de continuer à induire l'activation des gènes cibles, l'apparition de mutations faux-sens constitue un événement clé dans la progression du CaP (127–130).

(2) Mutations non-sens

Le LBD du RA est le siège de nombreuses mutations permettant à ce dernier de contrecarrer les thérapies hormonales de première et seconde génération. En plus des mutations faux-sens décrites précédemment, les mutations non-sens aboutissant à un RA tronqué jouent un rôle majeur dans l'évolution de la maladie. En effet, au laboratoire nous avons pu mettre en évidence le fait qu'en perdant sa partie C-ter suite à un codon stop prématuré, le RA devient constitutivement actif, et ce même en l'absence d'androgènes (131). Ces données sont en adéquation avec les premières études menées par Jenster et al. démontrant que des mutants du RA ayant subi une

délétion et perdu leur LBD présentent une activation transcriptionnelle constitutive (132).

(a) RA Q641X

Le mutant RA Q641X est un mutant tronqué du RA constitutivement actif. Il provient d'une mutation non-sens au niveau de l'exon 4 sur l'acide aminé 641 de la région charnière, aboutissant à un codon stop prématuré et produisant une protéine du RA tronquée de son domaine C-ter (133) (Fig. 19).

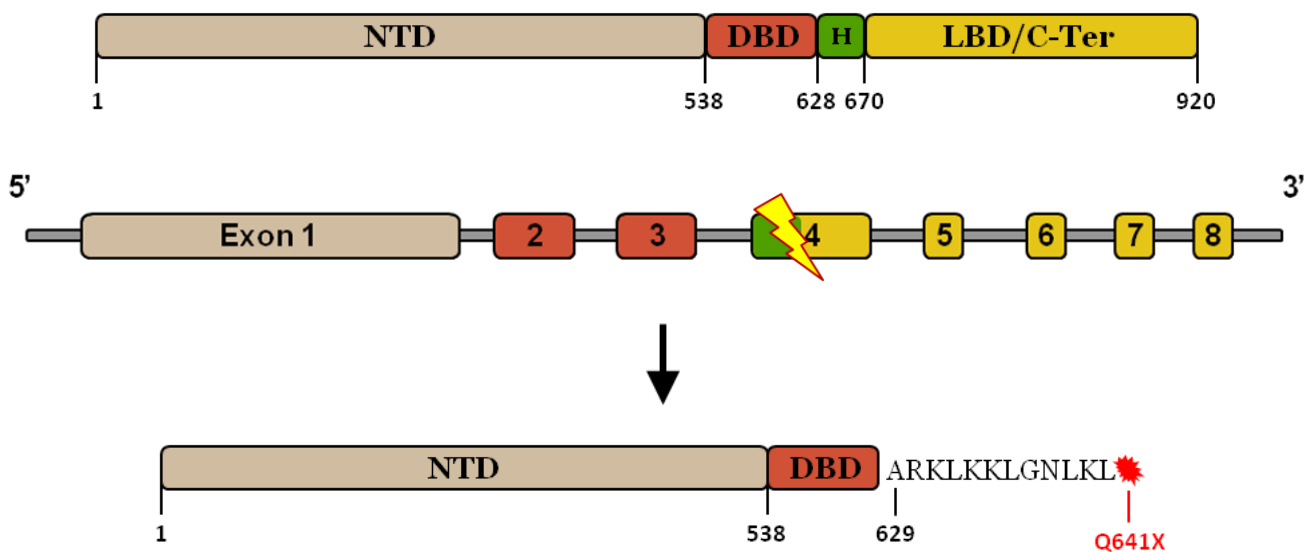


Figure 19 : Représentations schématiques du RA sauvage et du RA Q641X ayant subi une mutation non-sens dans l'exon 4 aboutissant à l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau de l'acide aminé 641. Le RA protéique sous-jacent est tronqué de toute sa partie C-terminale, incluant le LBD (133,134).

Ce mutant a été mis en évidence au laboratoire à partir d'un échantillon de patient atteint d'un CaP à un stade avancé, et à l'aide d'une approche fonctionnelle chez la levure. Dans cette approche, une souche de levure androgéno-dépendante est utilisée dans laquelle l'expression du gène de l'adénine, nécessaire à sa croissance, a été placée sous le contrôle du promoteur du PSA et d'AREs. Suite à la transformation de cette souche avec un plasmide portant un RA, normal ou muté, celle-ci est déposée sur un milieu de culture sélectif déficient en adénine. Ainsi, la transcription de l'adénine et donc la croissance des levures dépend uniquement de la présence de ligands du RA dans le milieu et de la spécificité de reconnaissance du RA à ces derniers (133,135) (Fig. 20).

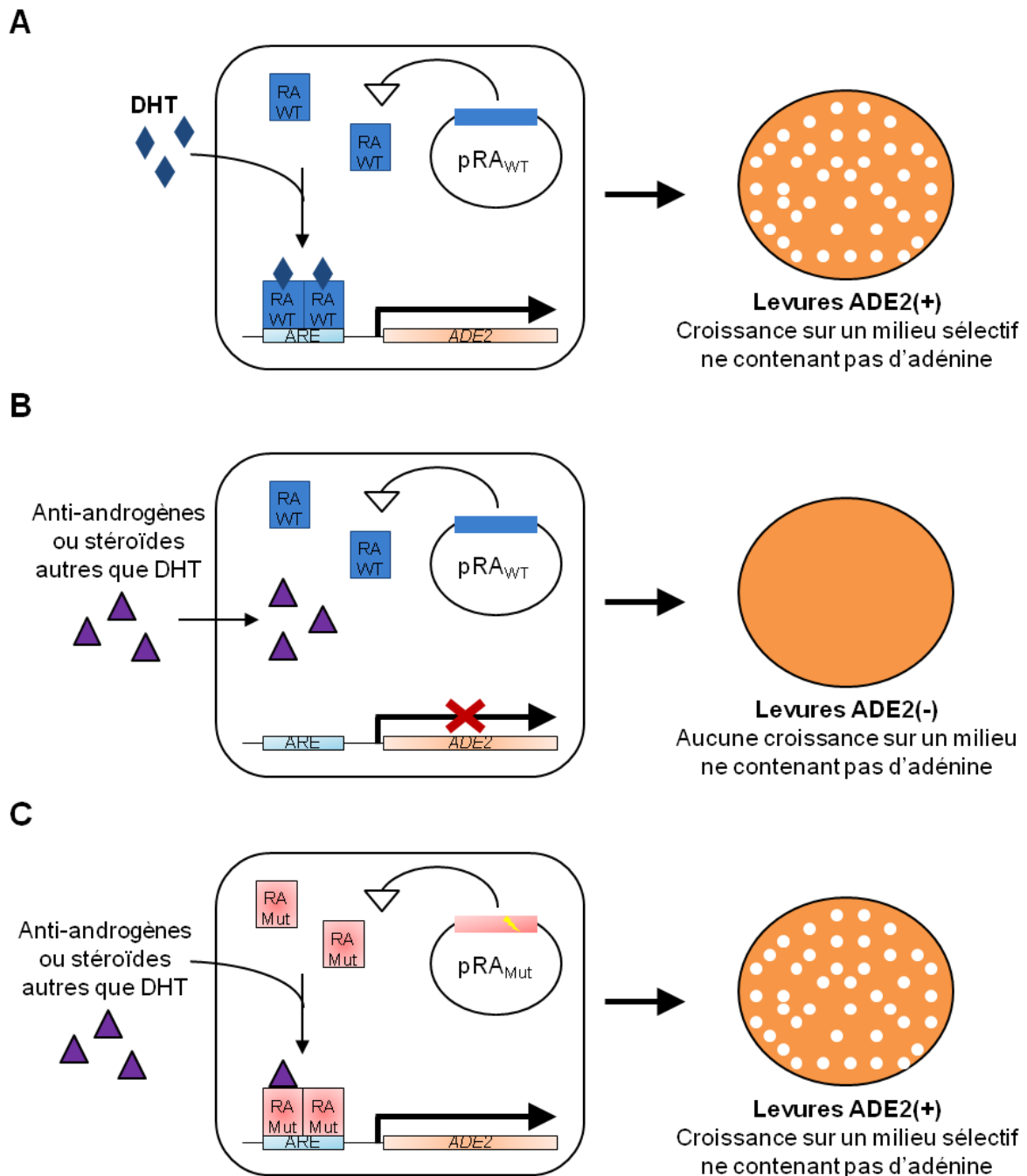


Figure 20 : Approche fonctionnelle chez la levure permettant de détecter des mutants du RA (135). L'expression du gène *ADE2* codant pour l'adénine, indispensable à la croissance des levures, est sous le contrôle d'AREs et est donc androgéno-dépendante. **(A)** L'activation du RA sauvage (WT) par la DHT induit l'expression du gène *ADE2* et permet la croissance des levures dans un milieu sélectif sans adénine. **(B)** En présence d'anti-androgènes, ou d'autres hormones stéroïdes que la DHT, ce gène n'est pas exprimé ne permettant pas la croissance de levures puisque le RA ne peut être activé. **(C)** Un mutant du RA constitutivement actif, ou présentant une affinité plus étendue à d'autres ligands, peut induire la croissance des levures dans un milieu sélectif déficient en adénine. (p = plasmide).

Le mutant RA Q641X a été largement étudié sur le plan fonctionnel au sein du laboratoire. Ces études ont permis de mettre en évidence sa distribution exclusivement nucléaire, en présence ou en absence de DHT, confirmant son activité constitutive initialement démontrée à travers des tests luciférase. De plus, il forme des agrégats au niveau des noyaux des cellules tumorales prostatiques, alors que le RA sauvage activé par la DHT présente une distribution nucléaire homogène. Ces différences de mode d'action se traduisent aussi par une altération des co-activateurs recrutés. Alors que le co-activateur SRC-2 est absent des agrégats nucléaires formés par le RA Q641X, d'autres co-activateurs comme CBP présentent une co-localisation amplifiée avec ce dernier, en présence ou absence de DHT. Il en résulte une activité amplifiée de plusieurs facteurs de transcription dont AP-1 (protéine activatrice) et NFAT (facteur nucléaire de cellules T activées) qui sont impliqués dans la prolifération, la survie, et la différenciation cellulaire. Le mutant RA Q641X est donc capable d'établir de nouvelles connections avec d'autres voies de signalisation permettant ainsi aux cellules d'échapper aux thérapies hormonales (133,136). Par ailleurs, l'expression de ce mutant dans les cellules tumorales prostatiques y entraîne une sécrétion de facteurs paracrines capables d'induire la translocation nucléaire et l'activation transcriptionnelle du RA dans les cellules avoisinantes, et ce même en l'absence de DHT (137). En plus de son rôle dans la conversion de la population cellulaire tumorale à un statut androgéno-indépendant, le mutant RA Q641X est aussi impliqué dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Ce processus permet aux cellules tumorales de s'établir à des sites distants de la tumeur primaire et d'y former des métastases. Suite à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules tumorales, celles-ci vont acquérir des capacités d'invasion et vont par la suite être capables de se disséminer par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins (138). Au laboratoire, il a été démontré que le mutant RA Q641X est capable d'induire ce phénotype mésenchymateux dans des cellules tumorales prostatiques. La surexpression de ce mutant dans les cellules tumorales prostatiques LNCaP induit une augmentation des taux d'ARNm et protéiques de la N-cadhérine, un marqueur mésenchymateux, par rapport au RA sauvage. Inversement, l'activation du RA sauvage entraîne une diminution de l'expression de ce marqueur mésenchymateux. Cette augmentation de l'expression de la N-cadhérine est corrélée à une amplification des taux d'ARNm d'autres marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, Snail et ZEB1 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1).

Cependant, la diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine n'a pas pu être observée. Étant donné que l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules tumorales lors de l'EMT est accompagnée d'une perte du phénotype épithélial, ces résultats suggèrent que le mutant RA Q641X est capable d'induire une EMT partielle dans les cellules tumorales prostatiques (139). D'autre part, la diminution d'expression du RA sauvage en présence du mutant entraîne une augmentation de l'expression de la N-cadhérine. Le mutant RA Q641X entre donc en compétition avec le RA sauvage pour médier ces effets sur l'EMT (140). Néanmoins, plusieurs études ont mis en évidence le fait que certains mutants tronqués comme le mutant RA Q641X interagissent avec le RA sauvage en formant des hétérodimères (141–143). En formant des homodimères, ce mutant est capable d'activer plusieurs constructions artificielles contenant des AREs en absence d'androgènes, mais ne peut par exemple activer le promoteur du gène PSA que dans une très faible mesure. À l'inverse, la formation d'hétérodimères entre le RA sauvage et le mutant permet une transactivation synergique du promoteur du gène PSA, en absence ou en présence d'androgènes. En addition, la co-expression du mutant et du RA sauvage amplifie rapidement la translocation nucléaire du RA sauvage. Il est important de noter que la formation d'hétérodimères entre le RA sauvage et le mutant RA Q641X diminue de façon proportionnelle à l'augmentation de l'expression du mutant. Ces résultats pourraient potentiellement expliquer la diminution d'expression du RA sauvage en présence du mutant RA Q641X mise en évidence au sein du laboratoire (140,141). De façon surprenante, Yang et al. ont pu mettre en évidence une activation constitutive du mutant RA Q641X en absence d'androgènes aboutissant de manière effective à l'activation de plusieurs gènes cibles caractéristiques du RA dont le gène du PSA. Ils ont par ailleurs pu démontrer que cette activation constitutive est considérablement diminuée en présence de shARNs (petits ARNs en épingle à cheveux) inhibant deux longs ARNs non codants, PRNCR1 (ARN non codant associé au CaP) et PCGEM1 (transcrit prostatique spécifique), connus pour être fortement surexprimés dans les cas de CaP avancés (144). De nombreuses zones d'ombre persistent donc encore au niveau des mécanismes impliqués dans les modes d'action de ce mutant RA Q641X.

Ce manque de données n'a pas empêché le développement de plusieurs axes de stratégies thérapeutiques. De façon intéressante, il a été démontré que deux molécules de la famille des stilbènes, connues pour moduler l'axe de signalisation du

RA, sont capables d'inhiber la dimérisation du RA sauvage et du mutant RA Q641X, diminuant ainsi de façon drastique leurs activités transcriptionnelles. Les stilbènes pourraient donc être considérés comme de nouveaux candidats à l'élaboration de composés thérapeutiques ciblant le processus d'hétérodimérisation entre le RA sauvage et les mutants tronqués (143). De même, l'inhibition du récepteur au facteur de croissance insulino-mimétique-1 (IGF-1) IGF-1R, par la molécule NVP-AEW541, aboutit à une diminution de l'activité du mutant RA Q641X. Le facteur de croissance IGF-1 étant impliqué dans la progression du CaP, ces données pourraient aussi mener à l'élaboration de nouveaux composés thérapeutiques ciblant le mutant RA Q641X (145). L'activité de ce mutant peut être aussi être diminuée à travers l'inhibition de la lysine déméthylase LSD1, un co-activateur du RA sauvage facilitant son activation transcriptionnelle dont l'expression augmente avec la progression de la maladie (146). Enfin, l'activité du mutant RA Q641X peut être inhibée par PFI-1, un inhibiteur de la famille de protéines BET (domaine extraterminal et bromodomaine) dont le rôle est de faciliter la transcription via le recrutement de facteurs de transcription au niveau de la chromatine acétylée (147). Ces deux dernières études sont très récentes et témoignent de l'importance de trouver un moyen de contrecarrer ce mutant RA Q641X au vu de son implication dans la progression du CaP.

(b) *RA Q785X*

Un autre mutant tronqué du RA provenant d'une mutation non-sens a récemment été découvert dans des échantillons de patients résistants à l'acétate d'abiratéron, le RA Q785X. Ce mutant provient d'une mutation non-sens aboutissant à un codon stop prématuré au niveau de l'acide aminé 785 au milieu du LBD. Il en résulte une protéine du RA tronquée de son domaine C-ter de façon partielle (Fig. 21) (148).

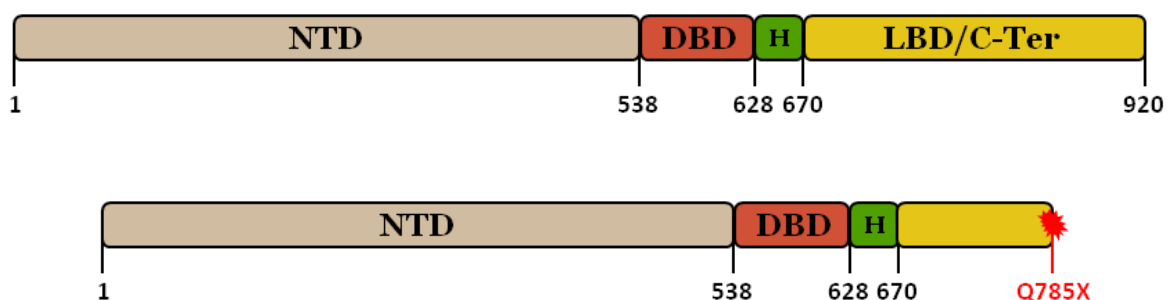


Figure 21 : Représentations schématiques des protéines du RA sauvage et du mutant RA Q785X.

De façon similaire au mutant RA Q641X, le mutant RA Q785X présente une localisation exclusivement nucléaire, indépendamment de la présence d'androgènes. Cependant, il ne possède pas la capacité d'induire une activité transcriptionnelle. Son rôle consiste en l'amplification de l'activité transcriptionnelle du RA sauvage en s'hétérodimérisant avec ce dernier, même en absence d'androgènes. De plus, il stabilise la liaison du RA sauvage à la chromatine et stimule le recrutement des co-activateurs p300. Ce mutant est donc plus impliqué en tant que co-régulateur du RA sauvage pour faciliter l'activité transcriptionnelle (148).

Mis à part le mutant RA Q641X, les mutations non-sens du RA restent un phénomène rare dans l'histoire naturelle de CaP. En effet, l'émergence de RA tronqués, dépourvus de leur LBD, et constitutivement actifs, est majoritairement due à un épissage aberrant.

(3) Épissage aberrant

La maturation de l'ARNm est nécessaire au bon déroulement de la transcription. L'ARN pré-messager est épissé afin d'éliminer les introns et donner lieu à un ARNm mature. Cette maturation se fait notamment par l'intermédiaire d'un épissage alternatif, permettant la production de multiples ARNm et donc de multiples protéines à partir d'un seul gène. À noter qu'environ 90'000 protéines peuvent être produites dans les cellules humaines, bien qu'elles ne soient codées que par approximativement 25'000 gènes, l'épissage alternatif est en effet indispensable à la production de protéines diverses ayant des fonctions distinctes (149).

(a) RA-V7

Une dérégulation du processus d'épissage alternatif aboutissant à un épissage aberrant du RA et à une protéine tronquée a été mise en évidence il y a une dizaine d'années dans des cellules tumorales prostatiques. Plusieurs variants d'épissage ayant perdu leur LBD ont ainsi été découverts, dont le RA-V7, aussi appelé AR3. Le variant RA-V7 est le variant le plus fréquemment et abondamment exprimé chez les patients atteints d'un CPRC (150,151). Il est constitué des 3 premiers exons du RA sauvage, puis d'une séquence exonique cryptique à l'intérieur de l'intron 3. L'épissage de cette séquence exonique cryptique résulte en une protéine tronquée de toute sa partie C-ter, et donc du LBD, du fait de l'interruption prématurée de la traduction, en aval des 16 acides aminés spécifiques à ce variant (152) (Fig. 22).

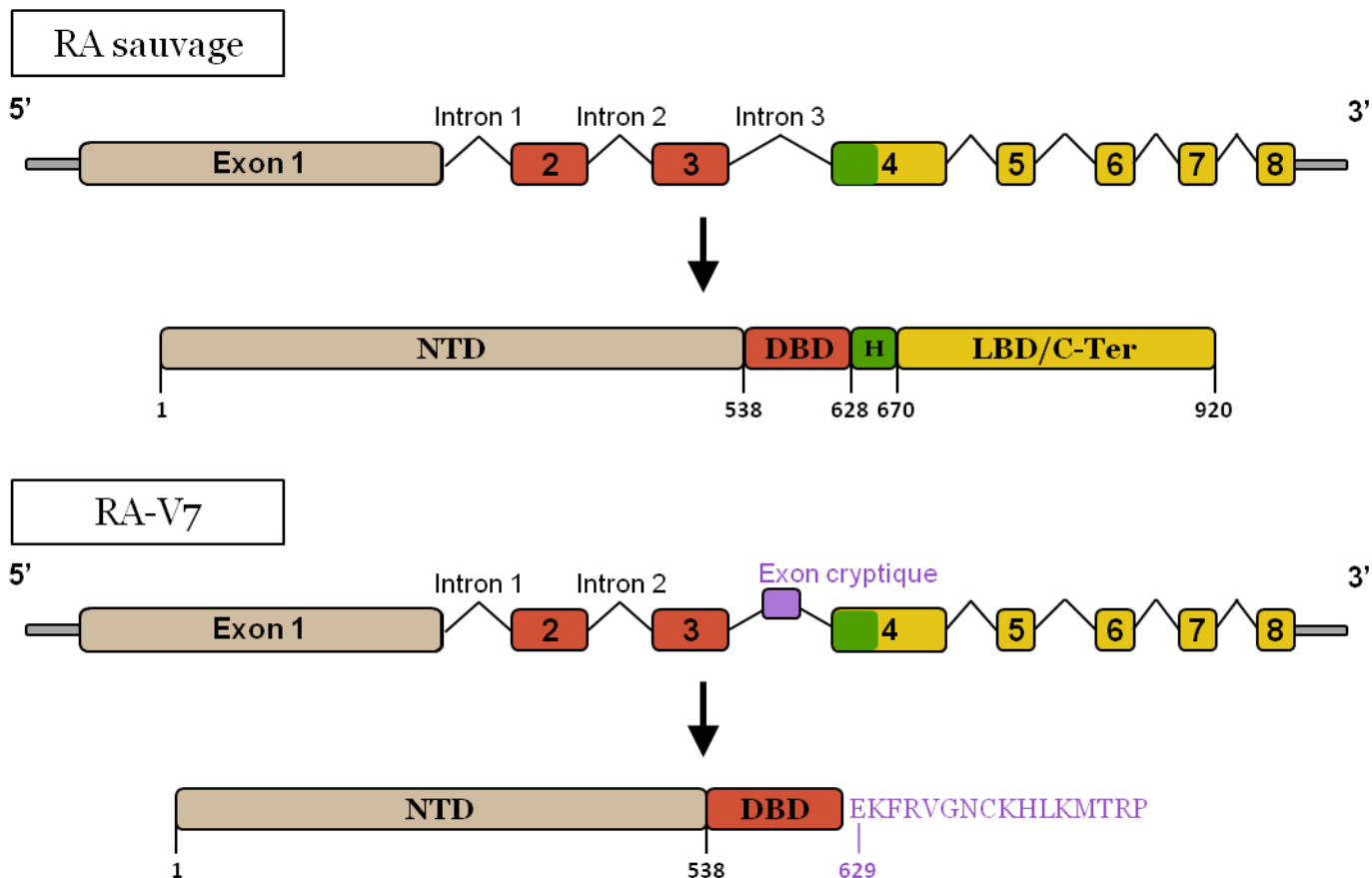


Figure 22 : Représentation schématique de l'épissage aberrant aboutissant au variant RA-V7 en comparaison avec le RA sauvage (134,152).

Le variant RA-V7 est largement impliqué dans la résistance aux thérapies de castration. Les anti-androgènes Enzalutamide et Bicalutamide ne parviennent pas à inhiber la croissance de cellules tumorales prostatiques exprimant le RA-V7, bien qu'ils puissent supprimer l'activation transcriptionnelle des gènes cibles du RA sauvage hormono-dépendant (153). De plus, l'expression du variant RA-V7 est rapidement et fortement, plus de 53 fois, augmentée dans un modèle de xéno greffe résistant à l'acétate d'abiratéron, en comparaison avec le modèle sensible au traitement (154). Ces données corroborent le fait que l'expression du RA-V7 augmente graduellement au fur et à mesure de l'évolution vers une résistance à la castration. Cette augmentation se retrouve notamment dans des biopsies de prostatectomies de patients n'ayant pas encore été traités hormonalement, et est corrélée de façon positive au risque d'échappement hormonal de ces patients suite à la chirurgie. À noter qu'une expression amplifiée du RA-V7 chez ces patients hormono-naïfs est effectivement associée à une progression significativement plus rapide vers un CPRC. De même, les taux d'expression d'ARNm du variant mesurés dans des échantillons de métastases osseuses de patients atteints d'un CPRC est

inversement proportionnelle à leur taux de survie et ceux-ci ont un mauvais pronostic. Ces patients présentent par ailleurs un marquage intranucléaire du RA intense, ainsi qu'une dérégulation de nombreux transcrits impliqués dans le cycle et la survie cellulaire (151,155,156). De façon surprenante, l'expression du variant RA-V7 a été retrouvée dans 100 % des biopsies de métastases osseuses provenant d'une cohorte de 30 patients atteints d'un CPRC (157). Le variant RA-V7 présente une localisation exclusivement nucléaire. Il est constitutivement actif, et induit l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes cibles du RA, en présence ou en absence d'androgènes. Il peut donc favoriser la croissance des cellules tumorales prostatiques de façon androgéno-indépendante (158). En addition, le RA-V7 est capable d'induire l'activation d'autres gènes cibles spécifiques, en plus de ceux classiquement activés par le RA. Ce programme transcriptionnel contient entre autres des gènes du cycle cellulaire comme le gène UBE2C (enzyme conjuguant l'ubiquitine E2). L'expression d'UBE2C est corrélée de façon positive à l'expression du RA-V7 chez les patients atteints de CPRC (159). Similairement au RA Q641X, le variant RA-V7 peut interagir avec le RA sauvage. L'augmentation de l'expression du RA-V7 est couplée à une amplification de la transcription du gène du RA sauvage dans un modèle encore hormono-dépendant. De même, l'inhibition du RA sauvage induit une diminution de l'activité du variant RA-V7 ainsi que de la transcription des gènes cibles par ce dernier dans ce modèle. Inversement, dans un modèle ayant acquis une résistance à la castration, la suppression du RA sauvage induit une augmentation de l'expression du variant RA-V7 ainsi qu'une amplification de l'expression des gènes cibles de ce variant. Ces données suggèrent que le variant RA-V7 a les capacités d'interagir avec le RA sauvage afin d'activer ses gènes cibles, et ce en fonction du stade de la maladie, soulignant ainsi son adaptabilité (159,160).

Le RA-V7 a donc un rôle majeur dans la progression du CaP et l'émergence d'un CPRC. Par conséquent, de nombreuses mises au point ont été réalisées pour la détection du RA-V7 en tant que marqueur de sélection. Le variant RA-V7 ayant la particularité de présenter une rétention de séquence exonique cryptique, la jonction entre cette séquence et l'exon 3 est unique et peut être facilement détectée et quantifiée par RT-qPCR (transcription inverse-réaction de polymérase en chaîne quantitative). Cette technique est applicable à tous les contextes où l'ARN peut être extrait, pour des échantillons de biopsies, autopsies, résections chirurgicales, ou encore pour les cellules tumorales circulantes (CTCs). Des analyses de CTCs de

patients atteints d'un CaP ont en outre permis de mettre en évidence une dynamique de l'expression du RA-V7. Chez ces patients, le statut d'expression du RA-V7 dans les CTCs subit une conversion et passe de négatif à positif au fur et à mesure de l'avancement de la thérapie hormonale (161,162).

Plusieurs études ont été menées afin de mettre en évidence de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le RA-V7. Les variants RA-V7 et RA Q641X sont issus de processus différents mais présentent en définitive la même organisation structurale de RA tronqué sans LBD. Ainsi, les études ayant mis en évidence une inhibition de l'activité du variant RA Q641X par divers procédés sont applicables au variant RA-V7. Par conséquent, les deux molécules de la famille des stilbènes capables d'inhiber la dimérisation du RA sauvage et du RA Q641X peuvent aussi inhiber la dimérisation ayant lieu entre le RA sauvage et le RA-V7 (143). De même, la molécule NVP-AEW541 inhibitrice d'IGF-1R cible le RA-V7 et diminue son activation transcriptionnelle (145). En addition, l'inhibition de la lysine déméthylase LSD1, le co-activateur du RA sauvage, entraîne une diminution de l'activation transcriptionnelle du RA-V7 (146). Enfin, PFI-1, l'inhibiteur de la famille de protéines BET, réduit aussi de façon significative l'activité du RA-V7 (147).

Comme il est mentionné précédemment, les variants majoritaires RA-V7 et RA Q641X correspondent à des protéines tronquées dont la partie C-ter est absente. De ce fait, une stratégie innovante a été récemment développée dans laquelle le NTD est le domaine ciblé. Cette approche est possible grâce à la découverte de la molécule EPI-001 interagissant avec le NTD et bloquant sa transactivation. Cette petite molécule a été isolée à partir d'une éponge marine, *Geodia lindgreni*, du fait de sa ressemblance structurale avec le bisphénol A. Ces données indiquent que ce composé est d'origine industrielle et que l'organisme des éponges a probablement bioaccumulé des dérivés du bisphénol A à partir d'eau de mer polluée. L'EPI-001 est donc un métabolite du bisphénol A capable d'interagir avec la région AF-1 du NTD, d'inhiber les interactions du RA avec ses co-activateurs, et de diminuer les interactions du RA avec les AREs au niveau de ses gènes cibles.

Son action est spécifique puisqu'il ne bloque pas l'activité d'autres récepteurs aux hormones stéroïdes. Qui plus est, l'EPI-001 est capable d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire une cytoréduction au niveau de xénogreffes androgéno-dépendantes de CPRC, et ce sans toxicité (163). Les études menées sur les effets de

cette molécule ont ainsi donné des résultats plus qu'encourageants ces dernières années. En effet, même en présence de taux d'androgènes croissants, supplémentés par l'ajout d'androgènes synthétiques, l'EPI-001 inhibe de façon consistante l'activité du RA à plus de 80 %. Son mode d'action est unique puisqu'il n'induit pas la translocation nucléaire du RA contrairement aux anti-androgènes utilisés en thérapie hormonale (164). En plus d'inhiber l'expression et l'activité transcriptionnelle du RA sauvage, l'EPI-001 inhibe l'activité transcriptionnelle de plusieurs variants du RA dont le RA-V7 en présence et en absence du RA sauvage. Les niveaux d'expression des transcrits de plusieurs gènes cibles spécifiques du RA-V7, dont UBE2C, sont ainsi diminués en présence d'EPI-001. De ce fait, la croissance des cellules tumorales prostatiques androgéno-indépendantes et résistantes à la castration, exprimant ces variants, est inhibée de façon significative grâce à l'EPI-001. Il est important de noter que la longueur de la séquence polyQ du NTD n'a aucun impact sur l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du RA induite par l'EPI-001. Plus en détail, l'EPI-001 exerce ses effets en inhibant l'activité transcriptionnelle des deux régions TAU-1 et TAU-5 constituant la fonction de transaction AF-1 du NTD (165–167). La mise en évidence et la caractérisation de ce composé représentent une étape importante dans la mise au point de traitements contre le CPRC et un dérivé de ce composé est actuellement en phase II d'un essai clinique pour les patients atteints d'un CPRC ([NCT02606123](#)).

(b) Autres variants du RA

De nombreux autres variants résultant d'un épissage aberrant du RA ont été identifiés chez des patients atteints d'un CaP. Cependant, leur implication est plus faible par rapport au RA-V7 qui reste le variant le plus fréquemment et abondamment exprimé chez les patients atteints d'un CPRC. Ils ne seront donc pas détaillés ici. La figure 23 récapitule les variants mis en évidence à ce jour (Fig. 23) (134).

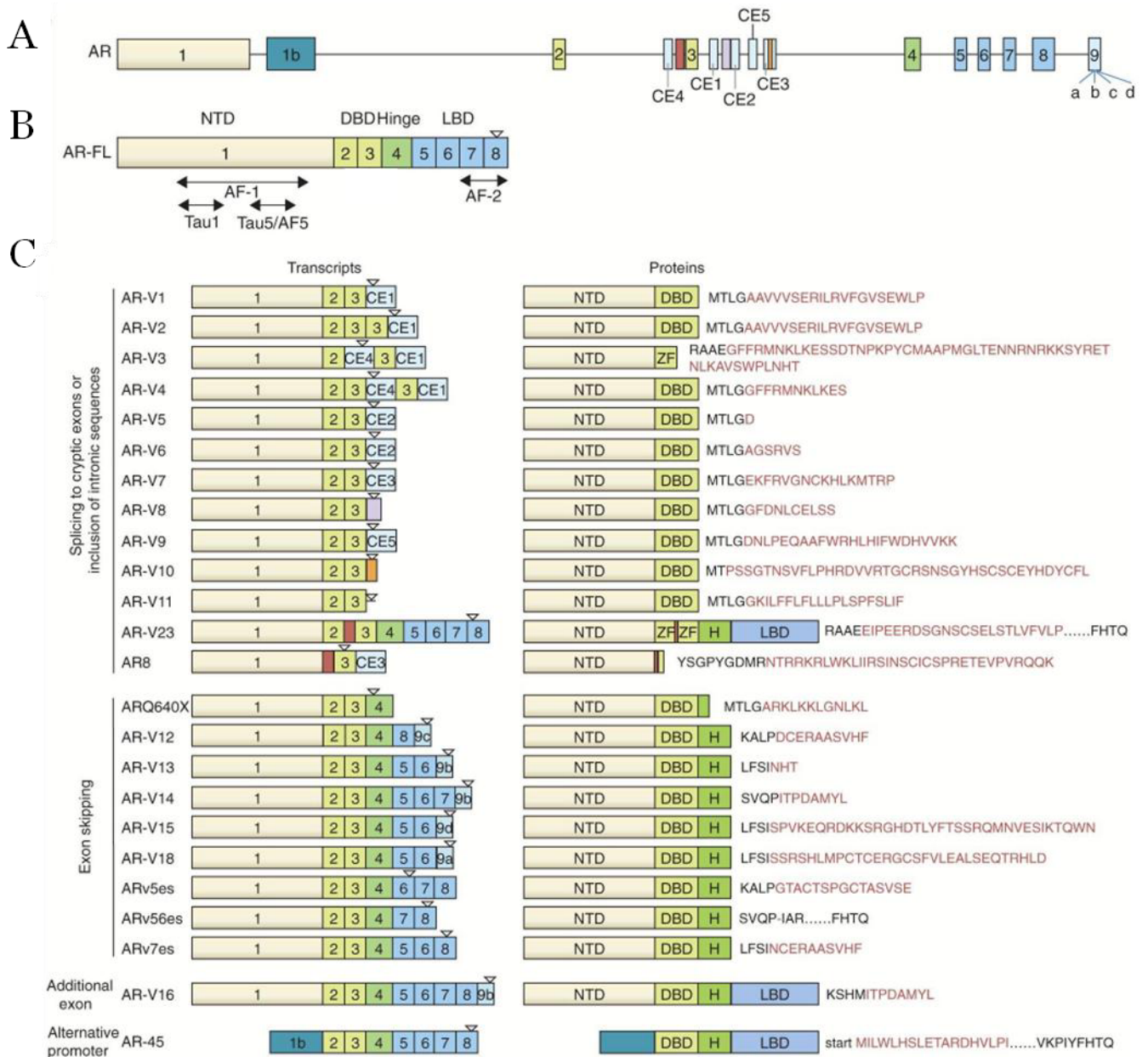


Figure 23 : Représentation de la structure du RA sauvage et des transcrits et protéines des variants du RA (134). (A) Structure du gène du RA sauvage incluant les exons canoniques et les exons cryptiques (CE). (B) Structure de l'ARNm du RA sauvage comprenant les exons codant pour le NTD, le DBD, la région charnière, et le LBD. Les domaines AF-1, incluant TAU-1 et TAU-5, et AF-2, constituent les fonctions de transactivation. (C) Structures des ARNm et protéines des variants du RA. Les séquences peptidiques spécifiques aux variants sont indiquées en rouge. Le « - » au niveau du RA v56es représente une jonction unique. Les triangles inversés correspondent à l'endroit où s'interrompt la transcription. L'exon 9 du RA présente 4 sites d'épissage cryptique, et les exons cryptiques correspondants sont indiqués comme 9a, 9b, 9c, et 9d (134).

e) Perspectives

Les variants du RA jouent un rôle clé dans la progression tumorale, soulignant l'importance de la voie de signalisation du RA dans l'évolution de la maladie. La figure 24 résume les mécanismes utilisés par le RA pour s'adapter et échapper aux thérapies hormonales, induisant une résistance à la castration (Fig. 24).

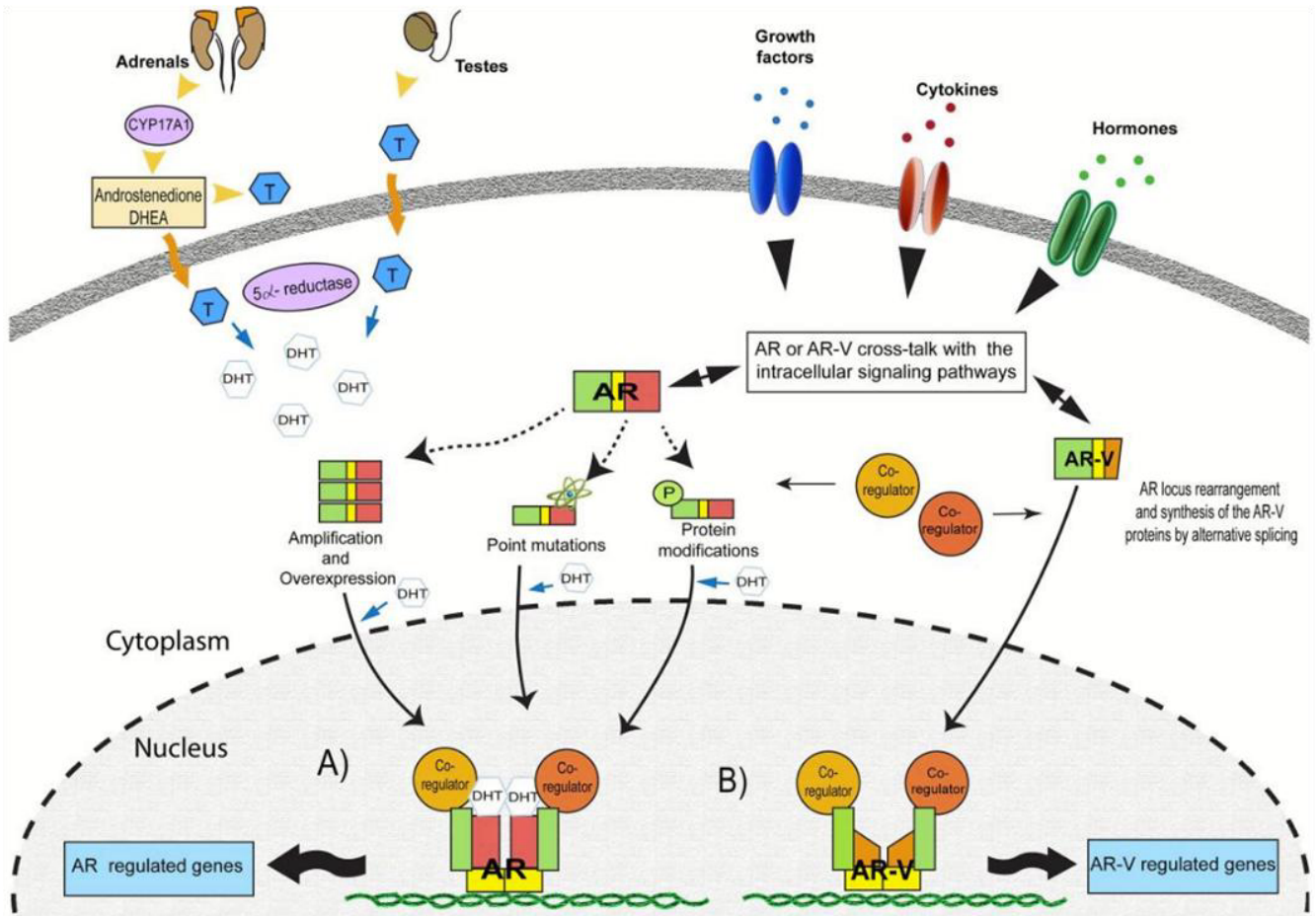


Figure 24 : Schéma récapitulatif des mécanismes d'échappement du RA à la castration (129).

Ces mécanismes d'échappement du RA à la castration ont été largement étudiés et sont à présent bien caractérisés. Cependant, ces études se sont majoritairement focalisées sur les cellules tumorales prostatiques, sans tenir compte de l'expression du RA au niveau du stroma. Des études ont mis en évidence le fait que le variant RA-V7 est capable de favoriser la progression tumorale à travers la sécrétion de facteurs paracrines comme le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) et IGF-1 (168). Ces facteurs sont des constituants majeurs du stroma tumoral. Néanmoins, l'impact des variants du RA sur le stroma tumoral n'a, à ce jour, pas encore été élucidé.

II. Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est un sujet d'intérêt croissant qui a été de plus en plus étudié ces dernières années, démontrant une prise de conscience grandissante vis-à-vis de son influence sur la progression tumorale et de l'importance de sa prise en compte dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Fig. 25).

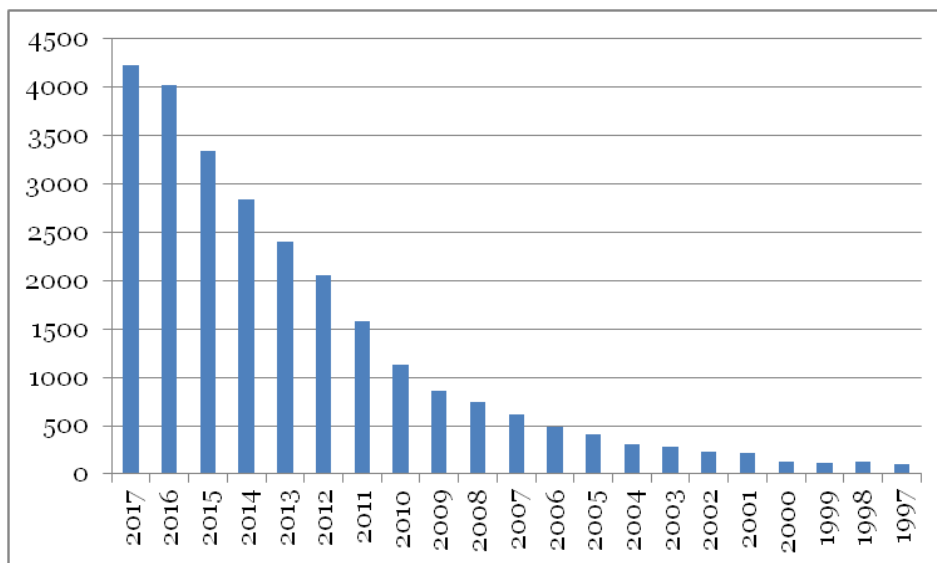


Figure 25 : Nombre de publications par année traitant du microenvironnement tumoral au cours des 20 dernières années, d'après PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=tumor+microenvironment>).

Le processus tumoral a longtemps été considéré comme étant induit par des mutations génétiques, des altérations chromosomiques, et une instabilité génomique. Cependant, bien que la survie des patients atteints d'un cancer ait significativement augmenté, les patients atteints à des cas avancés rechutent quasiment systématiquement et cette rechute est associée à une résistance au traitement. Un nouveau paradigme a donc émergé dans lequel la maintenance et la progression de la tumeur dépendent notamment fortement de signaux externes en provenance du microenvironnement. La tumeur ne doit donc plus être appréhendée de façon réductionniste comme une seule entité unique, mais plutôt comme un tissu complexe composé de plusieurs sous-populations cellulaires interagissant les unes avec les autres de façon réciproque (169).

Le microenvironnement tumoral constitue l'environnement cellulaire dans lequel la tumeur évolue. Mis à part les cellules tumorales, celui-ci est composé de vaisseaux sanguins environnants, de matrice extracellulaire, de molécules de signalisation, et d'autres cellules non-tumorales. Ces cellules qui composent le microenvironnement tumoral sont multiples et permettent la création de plusieurs microenvironnements tumoraux en fonction du stade tumoral. En effet, dans des conditions physiologiques, ou au tout début de l'initiation tumorale, le microenvironnement, ou stroma, a un rôle suppresseur de tumeur. À l'inverse, au fur et à mesure de la progression tumorale, le stroma va progressivement devenir permissif pour finir par favoriser considérablement la progression tumorale. Le stroma tumoral est donc un organe dynamique capable de s'adapter à l'évolution de la tumeur, la multiplicité des types cellulaires y résidant créant une succession de microenvironnements (170). Par conséquent, le microenvironnement tumoral est un compartiment dynamique et très hétérogène du fait de la présence de nombreux types cellulaires différents, en plus de la matrice extracellulaire et du réseau de vascularisation, comme résumé sur la figure suivante (Fig. 26) (171).

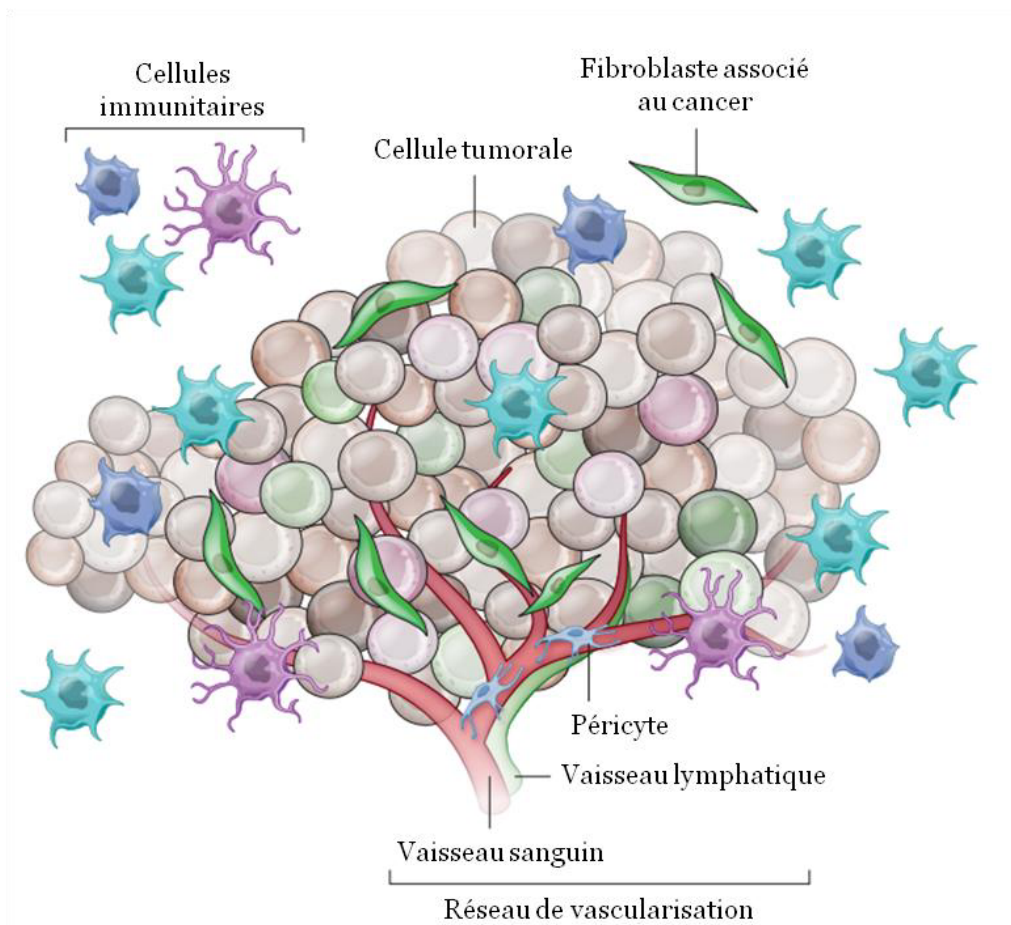


Figure 26 : Les différents composants du microenvironnement tumoral (171).

A. Les composants du microenvironnement tumoral

1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est produite par toutes les cellules du microenvironnement et constitue une armature pour ces dernières à travers un réseau de fibres intriquées formant une structure tridimensionnelle. La MEC est constituée de deux compartiments, à savoir le tissu conjonctif interstitiel et la membrane basale. La membrane basale est principalement constituée de collagène IV et de laminine. Son rôle est de séparer physiquement l'épithélium du stroma adjacent et de contrôler la différenciation et l'organisation cellulaire. Le tissu conjonctif quant à lui est majoritairement composé de collagène I et de fibronectine et assure une charpente structurale aux tissus (Fig. 27) (172).

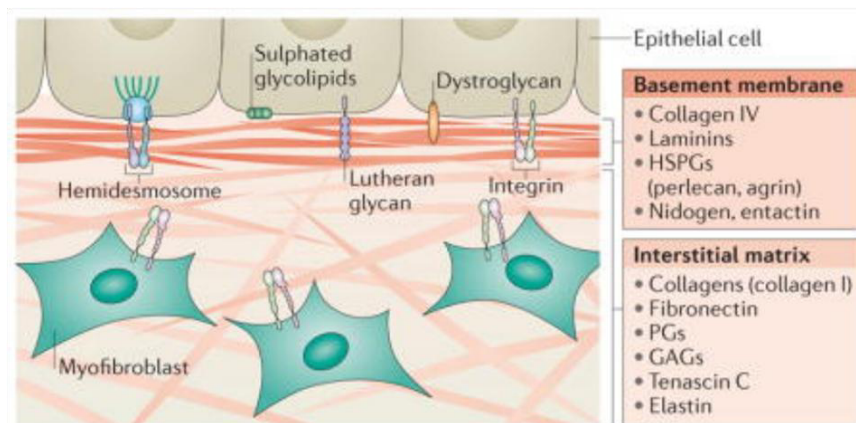


Figure 27 : La membrane basale et le tissu conjonctif interstitiel constituent la matrice extracellulaire (173).

La MEC est impliquée dans la progression tumorale en favorisant la croissance cellulaire et l'angiogenèse, en limitant l'apoptose, et en activant l'EMT aboutissant à la migration et l'invasion des cellules tumorales. La migration des cellules tumorales est due à la présence de métalloprotéinases matricielles (MMPs) dont le rôle est de dégrader la MEC, permettant ainsi son remodelage. La rigidité de la MEC va de ce fait diminuer et permettre la dissémination des cellules tumorales jusqu'à l'intravasation dans les vaisseaux sanguins (174,175). Par ailleurs, des marqueurs de la MEC ont été démontrés comme étant des marqueurs pronostics de la progression tumorale. Une expression élevée de MMPs par exemple est corrélée à un mauvais pronostic et à un risque élevé de rechute (176). De même, une expression élevée de la ténascine-C, composante du tissu conjonctif interstitiel favorisant la progression tumorale du fait

d'une désorganisation de la vascularisation, est associée à une diminution du taux de survie des patients (177).

2. Le réseau de vascularisation

La formation de vaisseaux sanguins est une propriété indispensable acquise à un stade précoce durant la progression tumorale. Ce processus correspond au switch angiogénique et est essentiel non seulement à la maintenance et à la croissance des cellules tumorales via l'apport d'oxygène et de nutriments, mais aussi à la dissémination métastatique. L'angiogenèse est une des caractéristiques principales du processus tumoral et est réalisée à travers le développement, la différenciation et l'activation de cellules endothéliales quiescentes permettant ainsi le développement de nouveaux vaisseaux sanguins. Des péricytes viennent ensuite entourer ces vaisseaux sanguins néoformés et collaborent avec les cellules endothéliales afin de synthétiser une membrane basale vasculaire puis une paroi vasculaire capables de supporter la pression sanguine (170,178).

Bien que plusieurs facteurs soient impliqués dans l'angiogenèse, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est le facteur angiogénique prédominant. Son expression est largement augmentée durant la progression tumorale, ainsi que celle de son récepteur, le VEGFR. Cette augmentation s'accompagne d'une vascularisation anarchique de la tumeur ainsi que d'une perméabilité vasculaire accrue induisant l'apparition d'une hypertension interstitielle. L'ensemble de ces modifications entraîne un défaut de perfusion de la tumeur qui non seulement limite la pénétration de molécules thérapeutiques, mais induit aussi une surproduction continue du VEGF. De ce fait, plusieurs composés thérapeutiques ont été développés afin de cibler cet axe de signalisation, comme le Bevacizumab, un anticorps monoclonal ciblant le VEGF, ou encore le Sunitinib, un inhibiteur du récepteur tyrosine kinase au VEGF, VEGFR. De telles approches n'ont cependant mené qu'à des réponses transitoires et à une persistance de la progression tumorale du fait notamment de la compensation de l'angiogenèse par d'autres voies de signalisation, comme la voie du PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) ou du FGF (facteur de croissance des fibroblastes) (Fig. 28) (179–181).

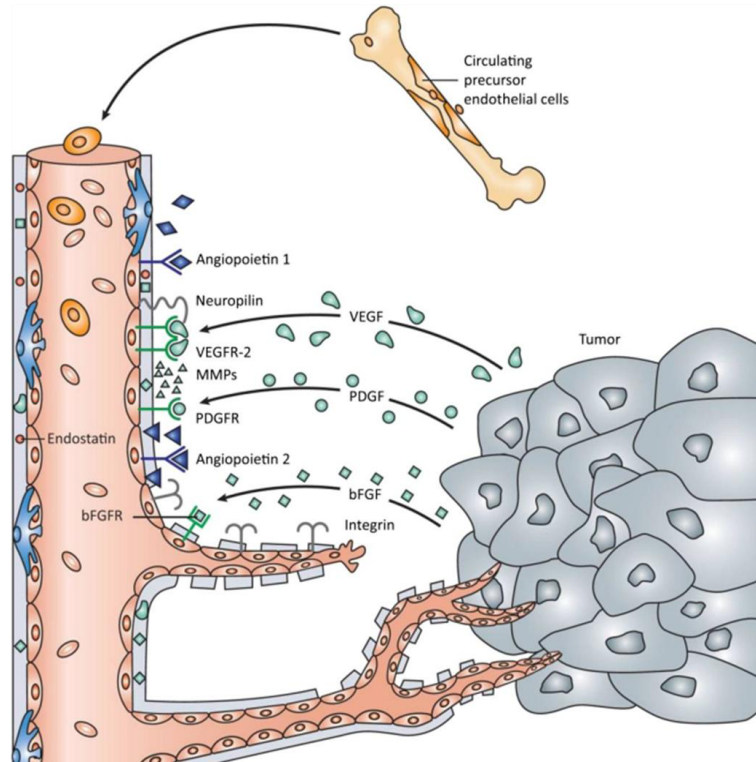


Figure 28 : Mécanismes de l'angiogenèse tumorale (180).

Qui plus est, un autre mécanisme de vascularisation peut être utilisé par la tumeur, à savoir la lymphangiogenèse. Ce phénomène n'existe plus chez l'adulte mais peut être réactivé lors du processus tumoral. En temps normal, les vaisseaux lymphatiques drainent les excès de fluide, mais aussi quelques cellules, produits par les tissus vers la circulation sanguine. Lorsque la pression interstitielle est trop élevée, comme c'est le cas en présence d'une tumeur, les vaisseaux lymphatiques sont maintenus ouverts constamment. Les cellules tumorales peuvent ainsi se disséminer à travers les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions lymphatiques adjacents, ce phénomène étant amplifié par la création de nouveaux vaisseaux lymphatiques (182,183).

3. Les cellules immunitaires

Les cellules du système immunitaire constituent un système de défense vital contre les agents pathogènes tout en régulant l'homéostasie tissulaire ainsi que le processus de cicatrisation. Du fait de leurs fonctions physiologiques, elles sont fortement impliquées dans les réactions inflammatoires, ayant notamment lieu au niveau de la tumeur. Certaines cellules immunitaires sont capables d'inhiber la progression tumorale alors que d'autres la favorisent considérablement. De plus, une même famille de cellules immunitaires peut avoir ces deux rôles en fonction du stade tumoral (Tableau 4) (169,184,185).

Type cellulaire	Fonction
Lignée myéloïde	
Macrophages associés à la tumeur	Les macrophages M1 classiquement activés sont pro-inflammatoires et ont une activité anti-tumorale. Inversement, les macrophages M2 sont anti-inflammatoires, pro-tumorigéniques, et favorisent l'angiogenèse et l'invasion.
Cellules dendritiques	Les cellules dendritiques sont des cellules monocytaires présentatrices d'antigènes, dont les antigènes tumoraux, dérivées de la moelle osseuse.
Macrophages exprimant TIE2	TIE2 étant le récepteur de l'angiopoïétine, un facteur angiogénique, les monocytes exprimant TIE2 favorisent l'angiogenèse à travers une boucle de signalisation paracrine établie avec les cellules endothéliales exprimant l'angiopoïétine.
Neutrophiles	Les neutrophiles N1 sont pro-inflammatoires, anti-tumorigéniques, et sécrètent les cytokines favorisant les cellules TH1. À l'inverse, les neutrophiles de phénotype N2 sont anti-inflammatoires, pro-tumorigéniques et sécrètent les cytokines favorisant les cellules TH2.
Mastocytes	Les mastocytes favorisent l'angiogenèse tumorale en sécrétant des facteurs capables de stimuler la prolifération des cellules endothéliales.
Cellules myéloïdes suppressives	Les cellules myéloïdes suppressives contrecarrent l'immunosurveillance tumorale en interférant avec l'activation des lymphocytes T, l'activité cytotoxique, et la présentation d'antigènes.
Lignée lymphoïde	
Lymphocytes natural killer	Les lymphocytes « natural killer » peuvent détecter et éliminer les cellules tumorales lorsque celles-ci ne présentent aucun marqueur physiologique, ou lorsqu'elles présentent des marqueurs de stress.
Lymphocytes T auxiliaires	Les lymphocytes T auxiliaires CD4+ de type 1 (TH1) sont pro-inflammatoires et anti-tumorigéniques. Lorsqu'ils sont de type 2 (TH2), ils sont anti-inflammatoires et pro-tumorigéniques.
Lymphocytes T régulateurs	Les lymphocytes T régulateurs ont un rôle pro-tumorigénique en supprimant l'immunosurveillance tumorale.
Lymphocytes T cytotoxiques	Les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales et les éliminent en induisant une apoptose médiée par la perforine et la granzyme.
Lymphocytes B	Les lymphocytes B sécrètent des cytokines pro-tumorigéniques et favorisent l'émergence de lymphocytes T auxiliaires de type 2 (TH2).

Tableau 4 : Les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral peuvent inhiber (vert) ou favoriser (rouge) la progression tumorale. Dans certains cas, elles peuvent avoir les deux rôles en fonction du stade tumoral (gris) (169).

Les changements phénotypiques observés au sein de certaines populations de cellules immunitaires du microenvironnement durant la progression tumorale sont semblables à ceux observés lors de l'établissement d'une inflammation chronique. Cette inflammation chronique initiée par la tumeur favorise donc fortement la progression tumorale et rend la tumeur comparable à une blessure qui ne guérirait jamais (186).

4. Les fibroblastes associés au cancer

a) *Importance des fibroblastes dans le processus tumoral*

Dès 1858, Rudolph Virchow proposa une nouvelle théorie sur le cancer selon laquelle les lésions néoplasiques se développent très souvent à des sites d'irritation chronique. Il en conclut que peu importe le type d'irritation, qu'elle soit mécanique, chimique, ou thermique, le fait qu'elle soit chronique est un facteur essentiel à la prolifération tissulaire néoplasique. Selon lui, il y a un lien causal entre inflammation et cancer (187). Harold Dvorak reprend ce postulat en 1986 et compare le processus tumoral au processus de cicatrisation. Il rapporte que les processus cellulaires et biochimiques associés à la cicatrisation sont similaires à ceux impliqués dans la croissance et le développement du stroma tumoral (188). La cicatrisation est un processus séquentiel comportant plusieurs phases. Dans un premier temps, les cellules immunitaires sont recrutées au site de la blessure afin d'en extraire les agents pathogènes. Puis, la prolifération et la migration cellulaire sont stimulées afin de repeupler l'épithélium lésé. Par après, le site de la blessure subit une angiogenèse afin de permettre la formation de nouveaux vaisseaux apportant oxygène et nutriments aux cellules. Pour finir, la prolifération des fibroblastes locaux est activée ainsi que la migration de fibroblastes non locaux vers le site de la blessure. Les fibroblastes permettent la formation de MEC et leur différenciation en myofibroblastes, ou fibroblastes activés, induit une contraction physique de la blessure aboutissant à son obturation (189). Ces processus de cicatrisation sont très similaires aux processus de développement du microenvironnement tumoral. Les seules différences entre ces 2 processus se trouvent au niveau de la régulation. Il y a une perte de contrôle des multiples phénomènes biochimiques, moléculaires, et cellulaires caractérisant chaque étape. Par exemple, dans un contexte sain, lorsque le processus de cicatrisation est achevé, les fibroblastes ayant redéposé la MEC et obturé la plaie subissent un phénomène d'anoïkis correspondant à une mort cellulaire (190). Lors du processus

tumoral, semblable à une inflammation chronique, les fibroblastes restent activés de façon constante induisant une fibrose. La fibrose correspond à un dépôt excessif de MEC qui aboutit à une destruction de la structure ainsi qu'un défaut fonctionnel de l'organe où elle a lieu. De façon paradoxale, ce dépôt excessif de MEC stimule les fibroblastes qui vont continuer à produire de la MEC, aboutissant à l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle positif favorisant le processus tumoral (173,191) (Fig. 29).

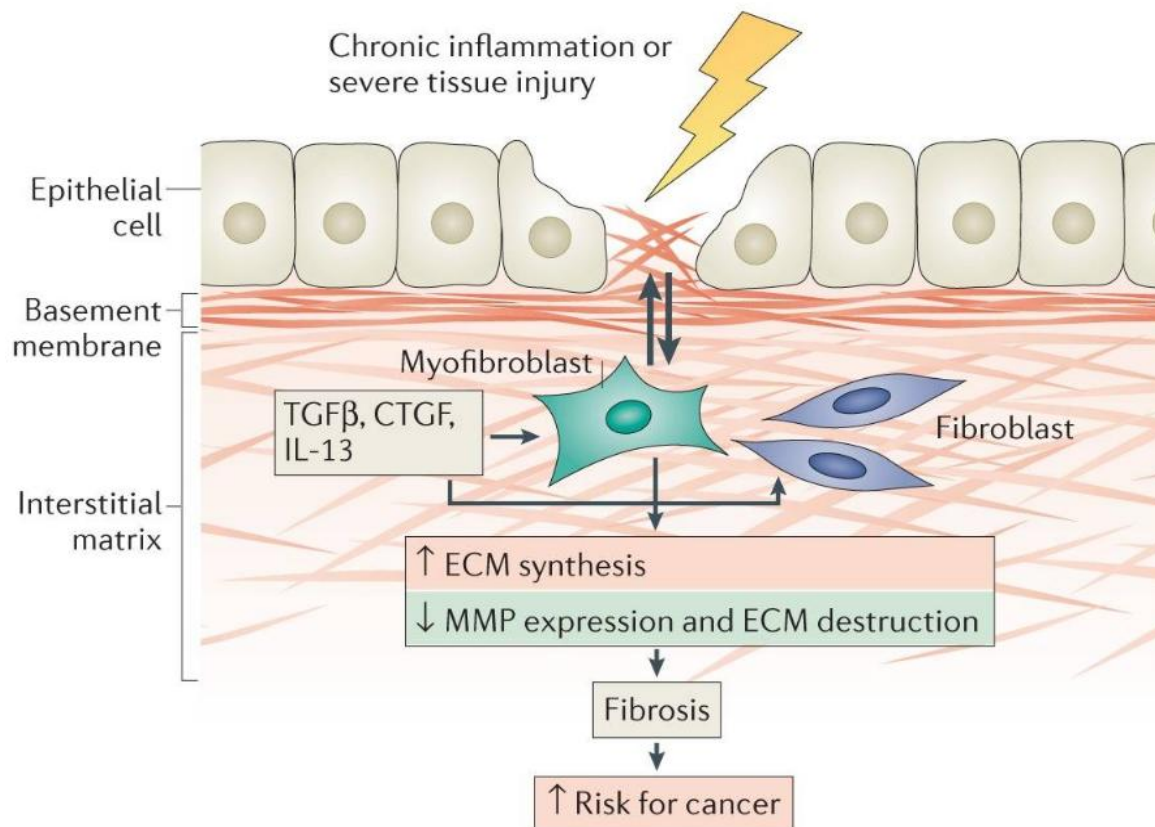


Figure 29 : Le remodelage aberrant de la MEC par les fibroblastes favorise le processus tumoral (173).

Les fibroblastes sont des cellules non-vasculaires, non-épithéliales, et non-inflammatoires, qui représentent la principale composante cellulaire du tissu conjonctif interstitiel. En plus de sécréter les composants de la MEC, ils peuvent aussi réguler la différenciation des cellules épithéliales ainsi que l'inflammation. Qui plus est, ils peuvent sécréter des MMPs impliquées dans la dégradation de la MEC, et sont ainsi responsables de la maintenance de l'homéostasie globale de la MEC. Leur activation constitutive au cours de la progression tumorale a donc des conséquences dramatiques (192).

b) Rôle des fibroblastes associés au cancer

La notion que des fibroblastes au niveau du stroma tumoral acquièrent un phénotype modifié, similaire à celui des fibroblastes durant la cicatrisation, et soient constitutivement actifs, a été étudiée depuis les années 1970. De tels fibroblastes 'activés' ont été nommés fibroblastes associés au cancer, ou CAFs (193,194). Les CAFs représentent le type cellulaire le plus abondant au niveau du microenvironnement tumoral et favorisent très largement la progression tumorale selon divers procédés (195).

(1) Remodelage de la matrice extracellulaire

Les CAFs sont capables de favoriser la progression tumorale en créant un stroma desmoplasique à travers une production accrue de protéines de la MEC comme le collagène I, la fibronectine, ou encore la ténascine-C. À noter qu'une desmoplasie au niveau du stroma tumoral est effectivement corrélée à un mauvais pronostic pour plusieurs cancers solides. L'augmentation de la sécrétion de fibronectine par les CAFs entraîne une surproduction de fibrilles aboutissant à une MEC beaucoup plus compacte, ayant pour conséquence une amplification de la motilité et de l'invasion des cellules tumorales. De plus, une rigidité accrue de la MEC empêche une bonne distribution des agents thérapeutiques (196,197). À l'inverse, les CAFs peuvent aussi sécréter de façon plus importante un certain nombre de MMPs entraînant la dégradation et le remodelage de la MEC. Ce remodelage favorise l'invasion des cellules tumorales puisqu'il leur permet de franchir la membrane basale, puis de traverser le tissu conjonctif, et enfin d'atteindre et de pénétrer dans les vaisseaux sanguins via une intravasation (198).

(2) Angiogenèse

Du fait d'une augmentation de la sécrétion de plusieurs facteurs pro-angiogéniques, les CAFs facilitent l'angiogenèse tumorale. En effet, il a été démontré que les CAFs sécrètent d'avantage de VEGF du fait d'une hausse de la sécrétion de l'interleukine-6 (IL-6) par ces CAFs. Cette amplification de la sécrétion de l'IL-6 au niveau des CAFs est induite par les cellules cancéreuses et le contexte inflammatoire tumoral. De façon surprenante, l'IL-6 stimule la sécrétion de VEGF au niveau des CAFs mais pas au niveau des cellules tumorales. L'inhibition de l'IL-6 induit d'ailleurs une inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale *in vivo* (199). De façon similaire, la sécrétion d'autres facteurs impliqués dans l'angiogenèse comme

le PDGF et le FGF est significativement augmentée au niveau des CAFs (200,201). Enfin, les CAFs stimulent la sécrétion d'un autre facteur pro-angiogénique, à savoir la chimiokine CXCL12, encore appelée SDF-1 (facteur dérivé du stroma-1) (Fig. 30). Cette chimiokine permet d'induire le recrutement de cellules progénitrices endothéliales, précurseurs des cellules endothéliales, au niveau de la tumeur (202). Par ailleurs, son expression au niveau des CAFs est corrélée au stade de la tumeur et au risque de rechute chez des patientes atteintes de cancer du sein (203).

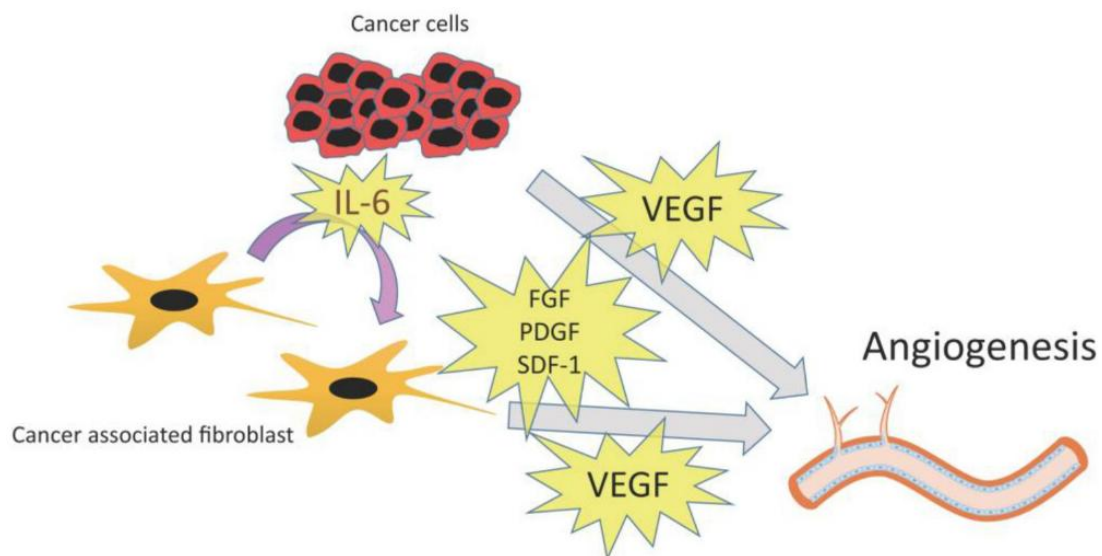


Figure 30 : Les CAFs peuvent promouvoir l'angiogénèse tumorale en sécrétant divers facteurs et cytokines (198).

(3) Immunosuppression et inflammation

Le système immunitaire jouant un rôle considérable lors du développement tumoral, les CAFs vont induire un échappement à ce dernier en créant un environnement immunosuppresseur. Pour ce faire, les CAFs sécrètent diverses chimiokines afin de recruter des cellules immunitaires favorisant la progression tumorale comme les cellules myéloïdes suppressives, les lymphocytes T régulateurs, ou encore les macrophages associés à la tumeur de type 2. Les cellules myéloïdes suppressives suppriment l'immunité adaptative mais peuvent aussi inhiber les lymphocytes natural killer, et favoriser les lymphocytes T régulateurs. En plus de favoriser l'immunosuppression, ces cellules myéloïdes suppressives peuvent stimuler l'angiogénèse en sécrétant du VEGF et du FGF. Par ailleurs, les cellules myéloïdes suppressives, les lymphocytes T régulateurs, et les macrophages associés à la tumeur de type 2 sont capables d'amplifier la polarisation des lymphocytes T auxiliaires et de

les différencier en lymphocytes auxiliaires de type 2, induisant une suppression des lymphocytes T cytotoxiques (204–206).

Le contexte inflammatoire induit lors du processus tumoral peut être considéré comme une réponse physiologique vis-à-vis d'une prolifération aberrante et d'un remodelage tissulaire causés par des mutations oncogéniques dans les cellules tumorales. Cette inflammation est une des caractéristiques principales de la tumeur et facilite la progression néoplasique. Ce contexte inflammatoire se traduit par une activation de l'angiogenèse, un remodelage de la MEC, mais surtout par une infiltration de cellules immunitaires et de cytokines et chimiokines médiant cette inflammation (170). Les CAFs ont été démontrés comme favorisant ce contexte inflammatoire du fait de la sécrétion de plusieurs cytokines favorisant le recrutement de cellules immunitaires pro-inflammatoires. En sécrétant, entre autres, la chimiokine CCL2, les CAFs induisent le recrutement de cellules de la lignée myéloïde au site tumoral, dont les macrophages. Les CAFs peuvent aussi moduler le recrutement de lymphocytes en sécrétant les chimiokines CXCL9, CXCL10, CXCL12, ainsi que S100A4, encore appelé FSP-1 (protéine spécifique des fibroblastes). Une fois recrutés au site tumoral, l'activation des lymphocytes est modulée par les CAFs à travers l'induction d'un phénotype de type 2 favorisant la progression tumorale (207,208).

(4) Cellules souches cancéreuses

En plus d'influencer considérablement le microenvironnement tumoral en modulant la composition de la MEC, l'angiogenèse, et l'infiltrat immunitaire, les CAFs sont d'autant plus impliqués dans la progression tumorale du fait de leur impact sur les cellules tumorales. En effet, les CAFs ont la capacité de stimuler la population de cellules souches cancéreuses (CSCs). Les CSCs correspondent à une faible proportion des cellules tumorales ayant des propriétés pro-tumorigéniques et capables d'initier la tumeur *de novo* du fait de leurs caractéristiques de cellules souches. À noter qu'elles sont effectivement capables de s'auto-renouveler et de donner naissance à différents types cellulaires, en plus de pouvoir induire la formation d'une tumeur nouvellement synthétisée. Qui plus est, ces CSCs sont impliquées dans la résistance aux traitements et favorisent les rechutes, en plus d'être à l'origine de l'établissement de métastases à distance (209). Plusieurs facteurs sécrétés par les CAFs, comme l'IL-17 par exemple, activent la voie Wnt- β -Caténine et

augmentent la population de CSCs au sein de la tumeur (210). De plus, l'induction de l'expression de marqueurs de cellules souches par les CAFs, comme CD44, ALDH1 (aldéhyde déshydrogénase), ou encore la nestine, permet aux CSCs de maintenir leurs caractéristiques de cellules souches (211,212). Enfin, la sécrétion de CCL2 par les CAFs, ayant un rôle dans l'immunomodulation, est aussi impliquée dans la régulation positive des CSCs à travers l'activation de la voie de signalisation Notch (213). Les CAFs peuvent donc favoriser la progression tumorale en maintenant le caractère de cellules souches des cellules tumorales.

(5) Switch métabolique

Dans les années 1920, Otto Warburg a émis l'hypothèse selon laquelle les cellules cancéreuses, en dépit de la présence d'oxygène, dépendent majoritairement de la glycolyse pour la production d'adénosine triphosphate (ATP). La glycolyse est bien moins efficace que la phosphorylation oxydative mitochondriale qui produit plus d'ATP (2 versus 36 ATP). Ce phénomène dans lequel les cellules cancéreuses subissent une glycolyse aérobie a ainsi été nommé « effet Warburg » (214). Par conséquent, les cellules cancéreuses consomment une grande quantité de glucose, associée à un shift de la respiration à la fermentation cellulaire. Cette consommation croissante de glucose s'accompagne d'une synthèse de glycogène et de lactate aboutissant à une acidification empêchant le fonctionnement normal des mitochondries dans les cellules tumorales (215). Il y a une dizaine d'années, Lisanti et al. ont mis en évidence le fait que les cellules tumorales induisent cet effet Warburg au niveau des CAFs. Les CAFs sécrétant de ce fait du lactate et du pyruvate, les cellules tumorales vont par la suite tirer profit de cette sécrétion par les CAFs de métabolites hautement énergétiques et les utiliser au travers du cycle de Krebs, permettant ainsi une production d'ATP efficace grâce à la phosphorylation oxydative. Ce phénomène a été appelé « effet Warburg inverse » (216). Les CAFs sont donc capables de servir de 'réservoir' à nutriments et de fournir des métabolites aux cellules tumorales afin d'optimiser leur production énergétique et de favoriser la progression tumorale (Fig. 31) (217).

Par ailleurs, une perte d'expression de la cavéoline-1, formant les cavéoles, est observée lors de l'effet Warburg dans les cellules tumorales, induisant un stress oxydatif aboutissant à une dysfonction des mitochondries. Cette perte d'expression est transmise au microenvironnement tumoral et permet la différenciation des CAFs avoisinants (218). Ainsi, le niveau d'expression de la cavéoline-1 au niveau des CAFs a

pu être utilisé comme facteur pronostic, et une faible expression de cette protéine est corrélée à un mauvais pronostic et à un faible taux de survie pour de nombreux cancers (219). De même, une augmentation de l'expression du transporteur monocarboxylate 4 (MCT4), impliqué dans le transport du lactate en dehors des cellules, est corrélée à un mauvais facteur pronostic et à une moindre survie pour un grand nombre de cancers (220).

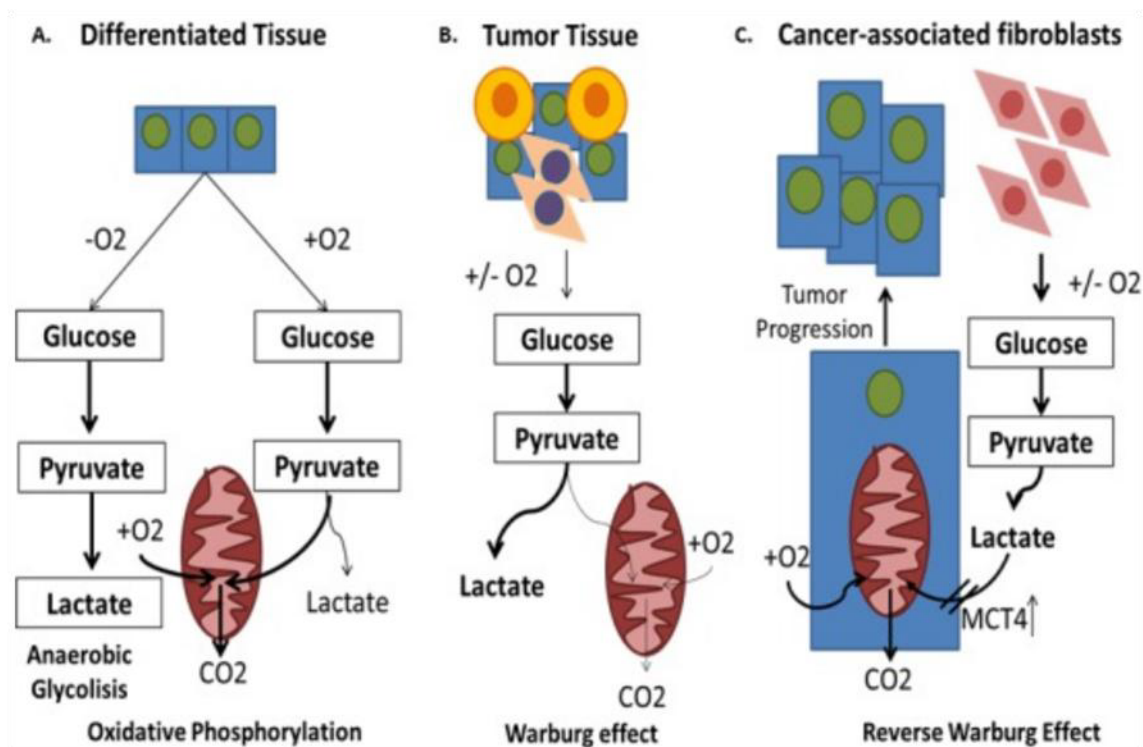


Figure 31 : Effet Warburg et effet Warburg inverse (217).

(6) Prolifération des cellules tumorales

La prolifération anarchique et incontrôlée des cellules tumorales est une des principales caractéristiques du développement tumoral (170). Les CAFs sont capables d'influencer de façon positive cette prolifération en sécrétant de nombreux facteurs de croissance. Parmi ceux-ci se trouvent le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance hépatocytaire (HGF), l'IGF-1, le PDGF, le FGF, ou encore le VEGF. Ces facteurs de croissance activent la voie de signalisation des MAPK ainsi que la voie PI3K/Akt, induisant la prolifération mais aussi la survie cellulaire (221,222). Les CAFs peuvent aussi sécréter du TGF- β , impliqué dans la prolifération cellulaire tumorale à travers l'activation de la voie de signalisation Smad2/Smad4 (Small/Mothers against decapentaplegic) (223). De plus, il a été démontré que les CAFs ont la capacité d'amplifier l'expression du facteur associé au carcinome

urothélial-1 UCA-1, associé à la progression tumorale dans plusieurs cancers, aboutissant à une suractivation de la cible mécanistique de la rapamycine mTOR. Cette enzyme mTOR étant largement impliquée dans la prolifération cellulaire, sa suractivation induit une surexpression de la cycline D1 et de l'oncogène KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) et déclenche les phases de prolifération S et G2/M dans les cellules tumorales (224). Enfin, les CAFs sécrètent la chimiokine CXCL12, impliquée dans l'angiogenèse, l'immunomodulation, mais aussi dans la prolifération cellulaire tumorale. En se liant à son récepteur CXCR4, situé au niveau des cellules cancéreuses, CXCL12 induit aussi l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK, tout en activant la voie Wnt/ β -Caténine, toutes trois déclenchant la prolifération cellulaire. En plus de favoriser la prolifération cellulaire, CXCL12 est notamment impliquée dans l'invasion et la migration des cellules tumorales (225).

(7) Migration des cellules tumorales et métastases

L'établissement de métastases à distance constitue l'étape ultime du processus tumoral dont l'issue est systématiquement létale. Le processus métastatique est composé de plusieurs étapes et comprend la migration puis l'invasion des cellules tumorales accompagnées de la dégradation de la MEC, l'intravasation et la survie des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, et enfin la dissémination et l'extravasation aboutissant à la formation d'une niche métastatique à distance (226). Les CAFs sont largement impliqués dans ces diverses étapes. En premier lieu, les CAFs favorisent l'EMT, indispensable à l'établissement du processus métastatique, et ce dans de nombreux cancers. Les CAFs induisent la sécrétion de l'IL-6 qui induit l'EMT du fait de l'augmentation de la vimentine, un marqueur mésenchymateux, et de la diminution de la E-cadhérine, un marqueur épithélial, au niveau des cellules tumorales (227). À travers la sécrétion de TGF- β , les CAFs peuvent aussi induire l'expression de marqueurs mésenchymateux supplémentaires dans les cellules tumorales comme les facteurs de transcription Snail1, ZEB1, Twist1, ou encore la fibronectine-1, témoins d'un phénotype d'EMT (228). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de Snail1 au niveau des cellules tumorales induit une surexpression de la prostaglandine E2 au niveau des CAFs favorisant l'EMT. Ce mécanisme permet l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle positif intensifiant l'EMT (229). De façon intéressante, il a été mis en évidence que le Cetuximab, un

anticorps monoclonal se liant au récepteur de l'EGF, est impliqué non seulement dans l'activation des CAFs, mais aussi dans l'amplification de leurs capacités d'induction de l'EMT des cellules tumorales (230). En plus d'induire l'EMT, les CAFs expriment un certain nombre de MMPs qui dégradent la MEC et facilitent la migration et l'invasion des cellules tumorales. L'expression du TGF- β dans les CAFs induit notamment l'expression de MMP-2 et MMP-9 (231,232). L'expression de MMP-9 peut d'ailleurs être inhibée à l'aide d'acides gras polyinsaturés *in vitro* et *in vivo* (233). De plus, il a été démontré que l'axe de signalisation du FGF induit l'expression de MMP-7 au niveau des CAFs (201). D'autres facteurs comme la palladine permettent aux CAFs de favoriser l'invasion des cellules tumorales. Cette protéine associée à l'actine a un rôle dans la motilité cellulaire en modulant l'assemblage et la maintenance de multiples structures cellulaires dépendantes de l'actine, comme les invadopodes, des protrusions retrouvées aux extrémités des cellules invasives (234). La surexpression de la palladine dans les CAFs leur permet de former des invadopodes dans lesquels sont présentes des enzymes protéolytiques dont les MMPs. Les CAFs peuvent ainsi remodeler la MEC et créer des 'tunnels' dans lesquels pourront s'engager les cellules tumorales (235). De façon similaire, Vignjevic et al. ont récemment démontré que les CAFs étaient notamment capables d'induire l'invasion des cellules tumorales indépendamment des MMPs, en exerçant une pression mécanique sur la membrane basale. Dans cette étude, des cellules tumorales de colon ont été mises en présence de CAFs et séparées de ces derniers par un modèle de membrane basale élaboré à partir de mésentère. Les résultats ont mis en évidence qu'en présence d'inhibiteurs de MMPs, les CAFs réussissent tout de même à traverser la membrane basale en exerçant des forces de contraction, de traction, et d'étirement sur celle-ci (236). Après avoir franchi la MEC, les cellules tumorales subissent une intravasation et se retrouvent dans les vaisseaux sanguins où elles deviennent des CTCs devant supporter une forte pression sanguine. En plus d'accompagner les CTCs lors de la dissémination, les CAFs leur fournissent un avantage de survie et augmentent leurs probabilités d'atteindre une niche métastatique (237). D'autre part, des CAFs circulants ont été retrouvés dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, mais pas chez des patientes atteintes à un stade précoce, alors que des CTCs ont été retrouvées dans les deux groupes de patientes. Ces données suggèrent que ces CAFs circulants pourraient être utilisés en tant que marqueur pronostic (238). Après avoir été disséminés à travers la circulation sanguine, les CTCs

doivent subir une extravasation et traverser la membrane endothéliale afin de s'établir dans une niche métastatique. Les CAFs ont aussi été démontrés comme ayant un rôle dans cette étape en favorisant la transmigration des cellules tumorales à travers la barrière endothéliale dans un modèle tridimensionnel *in vitro* (239). De plus, la présence des CAFs a été détectée au niveau des niches métastatiques en amont de l'arrivée des cellules tumorales, favorisant ainsi l'établissement d'une niche pré-métastatique (240). Par conséquent, les CAFs accompagnent et préservent les cellules tumorales durant toutes les étapes du processus métastatique.

En conclusion, les CAFs favorisent très largement toutes les étapes du processus tumoral et constituent donc un allié de choix pour les cellules tumorales (Fig. 32).

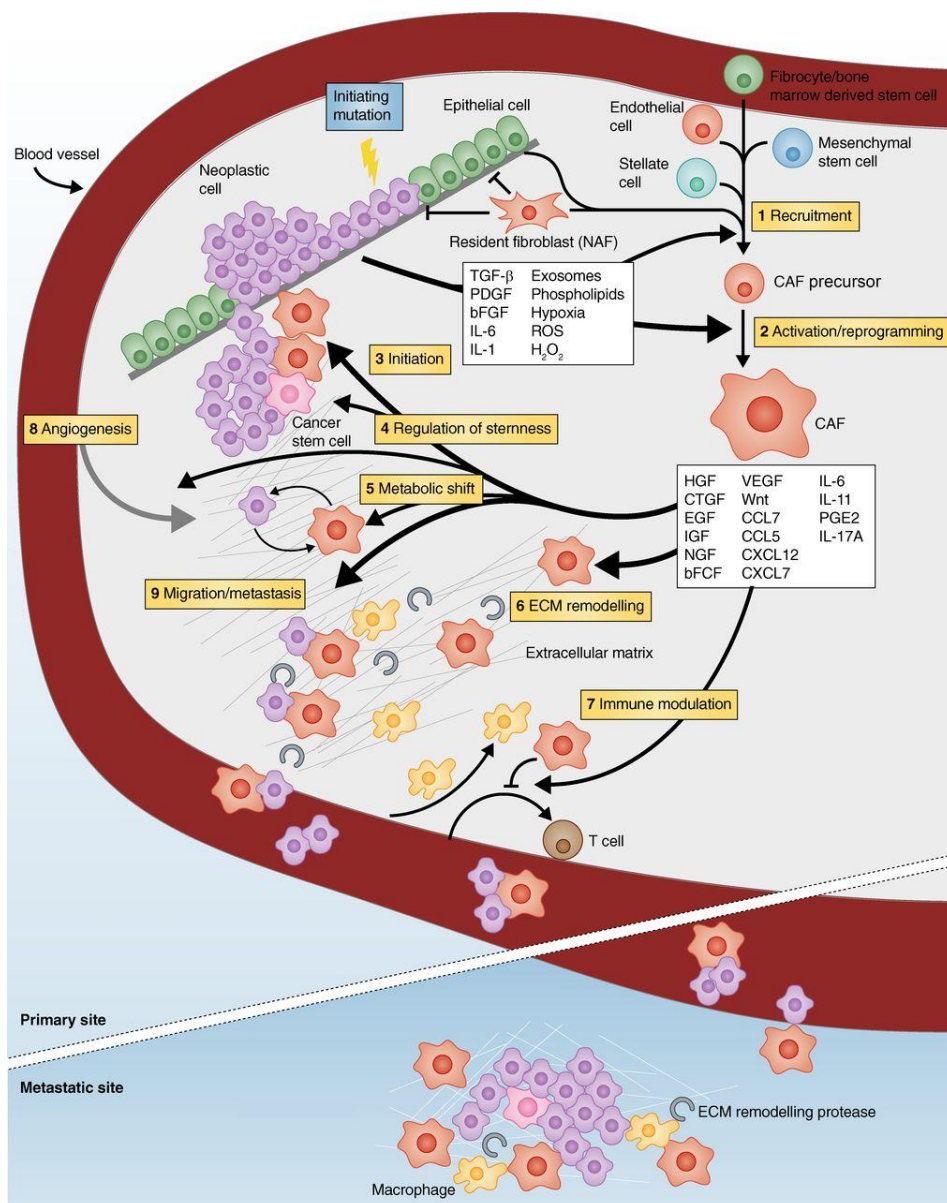


Figure 32 : Résumé schématique de l'impact positif des CAFs à tous les stades de la progression tumorale (241).

c) *Dialogue entre les fibroblastes associés au cancer et les cellules tumorales*

Les CAFs favorisent toutes les étapes de la progression tumorale et constituent donc un composant dynamique du microenvironnement tumoral capable d'orchestrer les interactions ayant lieu entre les cellules tumorales et le stroma réactif. L'initiation des CAFs se fait au fur et à mesure de la progression tumorale, ces cellules n'existent pas dans un contexte sain. En effet, les fibroblastes normaux, non transformés, sont capables d'inhiber la prolifération et la migration des cellules tumorales (242). L'apparition des CAFs est induite par les cellules tumorales du fait des facteurs qu'elles sécrètent, dont de nombreux facteurs de croissance, comme le TGF- β et le PDGF, fortement impliqués dans l'activation des CAFs. Le TGF- β est impliqué dans différents stades de la progression tumorale et son expression par les cellules tumorales induit l'expression de CXCL12 dans les CAFs. Cette chimiokine favorisant amplement la progression tumorale, il s'en suit l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle positif entre les cellules tumorales et les CAFs (243). De même, la sécrétion du PDGF par les cellules tumorales permet le recrutement et l'activation des CAFs au niveau du site tumoral, du fait de l'expression du récepteur du PDGF, le PDGFR- β , au niveau des CAFs (244). L'inhibition de ce récepteur par l'Imatinib, un inhibiteur de récepteur à activité tyrosine kinase, inhibe le recrutement de CAFs ainsi que la croissance tumorale et le processus métastatique au niveau d'un modèle murin orthotopique de cancer colorectal (245). En plus du TGF- β et du PDGF, d'autres facteurs sécrétés par les cellules tumorales sont impliqués dans l'activation des CAFs, comme le VEGF, ou encore le FGF (246,247). Un certain nombre de facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales induisent donc l'activation des CAFs, mais cette activation peut aussi être médiée par d'autres facteurs comme les inhibiteurs tissulaires de MMPs (TIMPs), ou encore certains micro-ARNs (miARNs). L'inhibition des TIMPs dans des fibroblastes leur permet d'acquérir un phénotype de CAFs et de favoriser la progression tumorale dans un modèle murin de cancer mammaire (248). De façon similaire, l'inhibition des miARNs miR-1 et miR-206, concomitante à l'augmentation de miR-31, induit l'activation des CAFs et favorise la progression tumorale dans un modèle *in vitro* de cancer pulmonaire (249).

Les cellules tumorales sont donc capables d'induire l'activation des CAFs en sécrétant de nombreux facteurs différents. Les CAFs étant capables par la suite de faciliter la

progression des cellules tumorales, il s'établit ainsi un dialogue entre les deux types cellulaires. Cette communication entre les cellules tumorales et les CAFs aboutit à l'établissement d'une boucle de régulation paracrine ainsi qu'à un rétrocontrôle positif continu entre ces deux populations cellulaires (Fig. 33) (250,251).

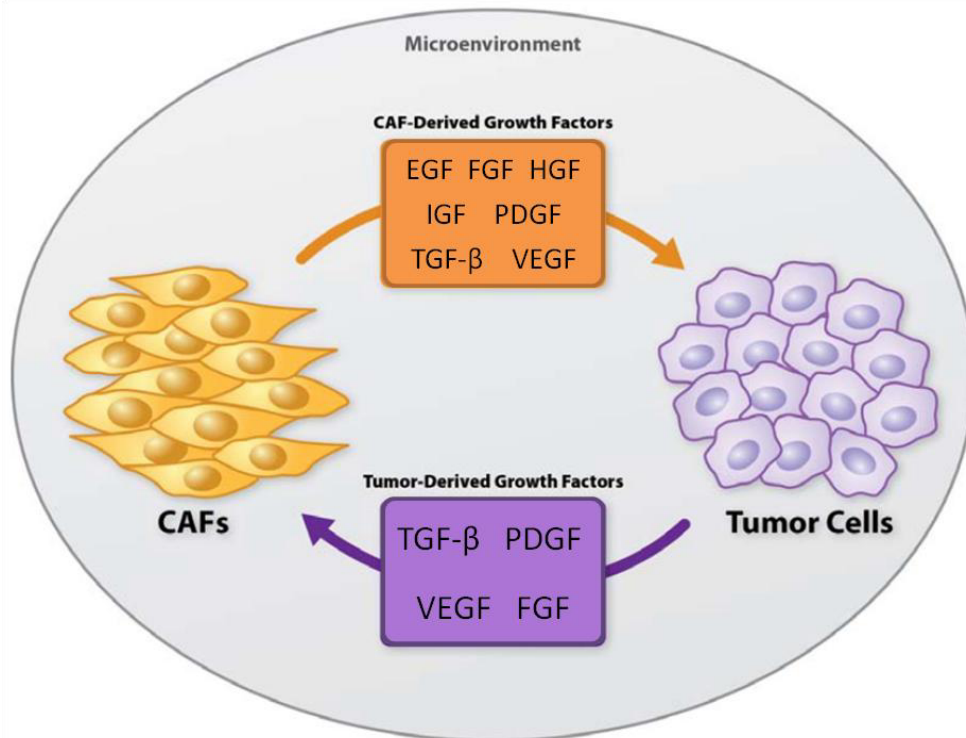


Figure 33 : Boucle de régulation positive entre les cellules tumorales et les CAFs (250).

d) Origine des fibroblastes associés au cancer

Les CAFs sont définis comme étant une population dynamique et hétérogène de cellules ressemblant à des fibroblastes activés, présents au niveau du microenvironnement tumoral, et capables de favoriser l'initiation et la progression tumorale. Ils acquièrent ces capacités pro-tumorigéniques suite à l'exposition aux facteurs sécrétés par les cellules tumorales. L'activation des CAFs résulte donc d'une altération induite par les sécrétions paracrines des cellules tumorales. Par conséquent, les CAFs ne constituent pas une population cellulaire définie en tant que telle, *stricto sensu*, mais représentent plutôt un état physiologique de la cellule ayant acquis des propriétés pro-tumorigéniques. De même que certaines cellules acquièrent des propriétés de cellules souches par exemple, les cellules recrutées au niveau du

stroma réactif tumoral acquièrent des capacités de CAFs, correspondant donc à un état dynamique de cellules ressemblant à des fibroblastes, retrouvées aux alentours de la tumeur, et favorisant très largement sa progression (252,253).

Ceci explique que bien que la population de CAFs représente la population cellulaire majoritaire du microenvironnement tumoral, l'origine des CAFs n'a, à l'heure actuelle, pas encore été déterminée de façon précise. Néanmoins, diverses études ont pu mettre en évidence plusieurs origines possibles des CAFs.

(1) Fibroblastes résidents

La source la plus proche de CAFs pour les cellules tumorales correspond aux fibroblastes résidents, situés à proximité au niveau du stroma réactif. En effet, la granuline, sécrétée au niveau du microenvironnement tumoral, induit une augmentation de l'expression de gènes de plusieurs chimiokines et cytokines caractéristiques des CAFs, dans des fibroblastes mammaires *in vitro*. Ces fibroblastes mammaires traités à la granuline ont par la suite été injectés dans un modèle murin et ont permis la formation de tumeurs mammaires (254). De même, la conversion de fibroblastes en CAFs, sous l'effet du TGF- β sécrété par les cellules tumorales, a pu être mise en évidence dans un modèle murin de cancer mammaire. Les CAFs ainsi convertis sécrètent par la suite de grandes quantités de CXCL12 favorisant la progression tumorale et maintenant le phénotype de CAFs (243).

(2) Cellules tumorales et endothéliales

Les cellules tumorales présentent une plasticité et une dynamique remarquables. Cette caractéristique leur permet de subir divers processus comme l'EMT induisant l'initiation du processus métastatique. Cette EMT des cellules tumorales est non seulement responsable de l'établissement de métastases à distance, mais permet aussi aux cellules tumorales d'acquérir un phénotype de CAFs. Ce processus est initié par une dérégulation des MMPs induisant une augmentation des niveaux de radicaux libres oxygénés dans les cellules tumorales, stimulant par la suite leur transdifférenciation en CAFs (255). De façon similaire, sous l'action du TGF- β sécrété par les cellules tumorales, les cellules endothéliales peuvent subir une transition endothélio-mésenchymateuse dans laquelle les marqueurs endothéliaux comme CD31/EPCAM (molécule d'adhésion des cellules épithéliales) sont diminués, et l'expression de marqueurs mésenchymateux de CAFs, comme FSP-1, émerge au

niveau des cellules endothéliales. Ce phénomène de transition endothélio-mésenchymateuse a été vérifié dans 2 modèles murins de carcinogénèse (256).

(3) Cellules souches mésenchymateuses

(a) Définition

Les cellules souches mésenchymateuse (MSCs) sont des cellules souches multipotentes dérivant de la moelle osseuse et ayant la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en plusieurs types cellulaires d'origine mésenchymateuse, dont les ostéoblastes, les adipocytes, les chondrocytes, les ténocytes, et les myocytes. Elles possèdent notamment des capacités immunomodulatrices et régénératrices du fait de la sécrétion de facteurs paracrines ayant un impact sur la migration, la prolifération et la survie des cellules avoisinantes. Ainsi, les MSCs jouent un rôle important dans toutes les phases du processus de cicatrisation. Lors de la phase inflammatoire, les MSCs coordonnent les cellules inflammatoires et inhibent les effets délétères des cytokines inflammatoires, tout en stimulant la phagocytose des agents infectieux. Par la suite, les MSCs sont impliquées dans la phase proliférative en exprimant plusieurs facteurs de croissance dont le FGF, le PDGF, l'EGF, et le VEGF, favorisant notamment l'angiogénèse. Enfin, les MSCs participent au remodelage de la MEC en favorisant la sécrétion et le dépôt de MEC (257,258). Comme il a été dit précédemment, le processus tumoral ressemble au processus de cicatrisation. Dans cette optique, les MSCs sont recrutées au site tumoral dans un contexte de blessure chronique et se différencient en CAFs sous l'effet des facteurs sécrétés par la tumeur (259).

(b) Différenciation en CAFs

Pour mettre en évidence la différenciation des MSCs en CAFs, Mishra et al. ont réalisé une étude pionnière dans laquelle des MSCs ont été mises en présence de milieu conditionné de cellules tumorales mammaires durant 30 jours. Ils ont pu déterminer qu'au bout de ce laps de temps, les MSCs présentent des capacités prolifératives et migratoires accrues, ainsi qu'une augmentation significative de l'expression de plusieurs marqueurs de CAFs, à savoir α -SMA (actine du muscle lisse de type α), la vimentine, FSP-1, ainsi que CXCL12. De plus, ces MSCs différenciées en CAFs favorisent l'initiation et la progression tumorale *in vivo* (260). De façon intéressante, il a été démontré que la proportion de CAFs dérivant des MSCs se situe entre 20 et 25%, suggérant que les MSCs constituent une source non négligeable et

relativement importante de CAFs au sein du stroma tumoral (261,262). Diverses études ont par la suite tenté de mettre à jour les mécanismes sous-jacents impliqués dans la différenciation des MSCs en CAFs. Ainsi, il a été démontré que la voie de signalisation du TGF- β est fortement impliquée dans la différenciation des MSCs en CAFs. En effet, la voie Smad2/Smad3, située en aval du récepteur au TGF- β , est activée dans des MSCs dans lesquelles l'expression d' α -SMA est augmentée suite à un traitement à la GRP78 (protéine régulée par le glucose 78), suggérant une différenciation en CAFs. La GRP78 est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique surexprimée par les cellules tumorales. Confirmant cette hypothèse, le traitement des MSCs avec un inhibiteur du récepteur au TGF- β induit une forte diminution du marqueur de différenciation α -SMA (263). De même, des études ont mis en évidence une augmentation de l'expression d' α -SMA au niveau de MSCs en co-culture directe avec des cellules de cancer colorectal. De façon intéressante, seules les MSCs ayant un contact direct avec des cellules tumorales présentent une augmentation d' α -SMA. Cette augmentation du marqueur de différenciation α -SMA au niveau des MSCs s'accompagne d'une hausse de l'expression du facteur Hes1, un effecteur de la voie Notch, suggérant que la différenciation en CAFs est aussi dépendante de la voie Notch. Le traitement des MSCs avec un inhibiteur du récepteur de Notch induit une diminution de la voie Smad2/Smad3, suggérant que la voie Notch et la voie du TGF- β interagissent ensemble pour induire la différenciation en CAFs (264). De façon surprenante, le traitement des MSCs avec du TGF- β a été démontré comme étant suffisant pour l'induction d'un phénotype de CAFs du fait de l'augmentation des marqueurs CXCL12, FSP-1, de la vimentine, ou encore de la protéine d'activation des fibroblastes (FAP) (265). De la même manière, il a été démontré que le traitement de MSCs avec du FGF suffit à induire une différenciation en CAFs à travers l'augmentation du marqueur α -SMA et de la vimentine. Étonnamment, le traitement au FGF induit une activation de son effecteur Erk mais aussi de Smad3, suggérant une interaction avec la voie du TGF- β . Effectivement, l'ajout d'un inhibiteur d'Erk induit une inhibition de l'activation de Smad3 et de l'expression des marqueurs de CAFs dans les MSCs. La différenciation en CAFs induite par le FGF nécessite donc la voie de signalisation du TGF- β (266).

D'autres facteurs, comme l'ostéopontine, sont impliqués dans la différenciation des MSCs en CAFs. L'ostéopontine est une phosphoprotéine d'adhérence cellulaire du tissu osseux surexprimée dans de nombreux cancers. Sa sécrétion par les cellules

tumorales induit une augmentation de l'expression de la chimiokine CCL5 au niveau des MSCs. Cette chimiokine est capable d'induire le recrutement de MSCs supplémentaires au niveau du site tumoral tout en induisant une boucle autocrine du fait de la présence du récepteur CCR5 à la surface des MSCs. Cette régulation positive aboutit notamment à l'augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs de CAFs dont α -SMA, FSP1, mais aussi CXCL12 (267). Ce processus a été étudié plus en détail et il s'avère que l'ostéopontine induit de façon dose-dépendante une augmentation de l'expression du TGF- β dans les MSCs en fonction du temps, induisant une hausse de l'expression des marqueurs de CAFs α -SMA, FSP-1, la vimentine, mais aussi la ténascine-C. Qui plus est, l'ostéopontine active la transcription du TGF- β en induisant la liaison du facteur de transcription MZF1 (doigt de zinc myéloïde) au niveau du promoteur de TGF- β (268). La voie de signalisation du TGF- β semble donc être la voie majoritairement impliquée dans la différenciation des MSCs en CAFs.

Les MSCs se différencient donc en CAFs sous l'effet de divers facteurs sécrétés par la tumeur. Par la suite, les CAFs sécrètent à leur tour divers facteurs qui vont agir de façon positive sur toutes les étapes de la progression tumorale favorisant ainsi la transition à un stade malin (Fig. 34) (269).

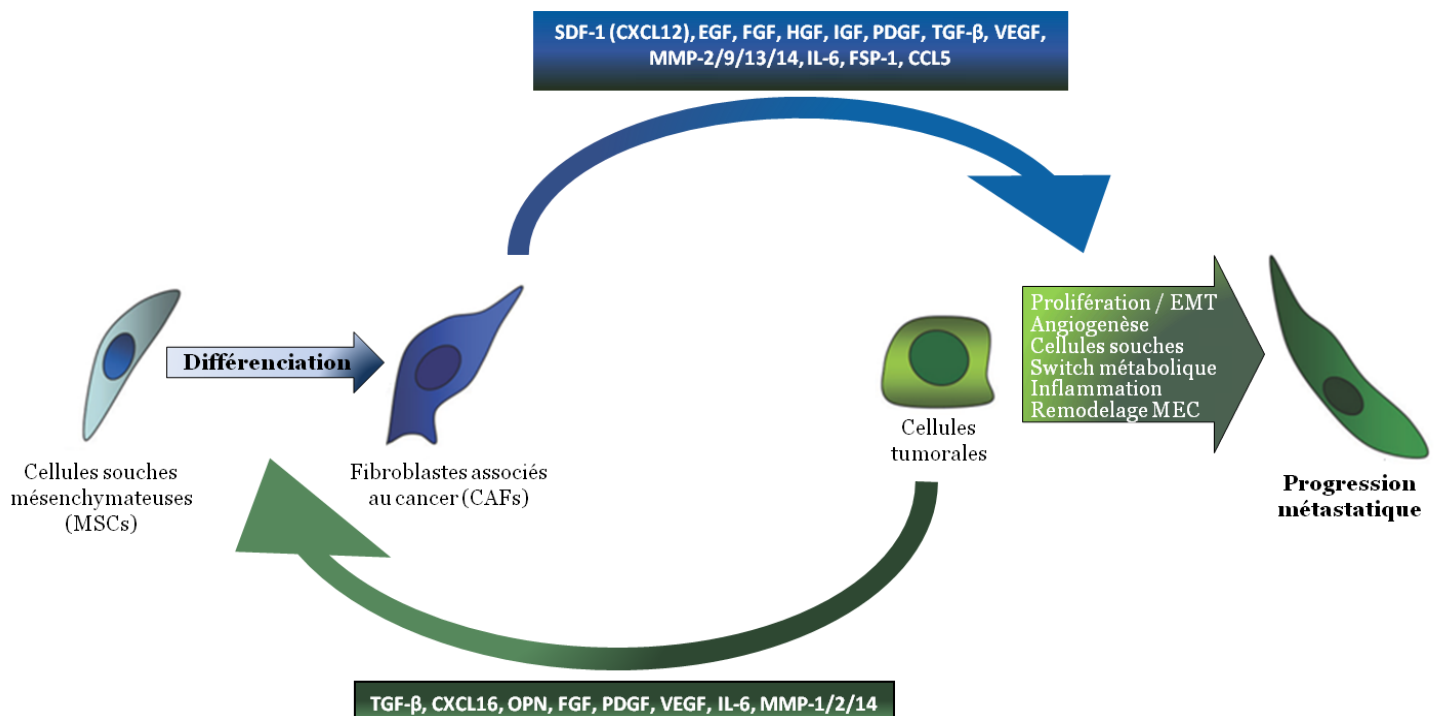


Figure 34 : Interactions entre les cellules tumorales et les MSCs aboutissant à leur différenciation en CAFs maintenant ensuite la progression tumorale jusqu'au stade métastatique (196).

e) Marqueurs des fibroblastes associés au cancer

Les CAFs peuvent dériver de plusieurs populations cellulaires différentes, induisant ainsi une grande hétérogénéité au sein de cette population de CAFs. De plus, les CAFs représentant plus un état qu'une cellule, il devient difficile de les catégoriser de façon précise. Ainsi, plusieurs marqueurs ont été sélectionnés pour les définir bien qu'ils ne soient pas spécifiques. Qui plus est, selon la population cellulaire d'origine, il est possible que les marqueurs de CAFs ne soient pas les mêmes, d'autant plus que l'expression de ces marqueurs peut évoluer fur et à mesure de l'évolution de la maladie et du type de cancer. Il est donc important de prendre en considération qu'il n'existe, à l'heure actuelle, aucun marqueur moléculaire définissant les CAFs de façon exclusive et spécifique, mais plutôt un consensus de marqueurs déterminés de façon empirique grâce aux études menées à ce sujet (270–273). Les marqueurs sélectionnés pour définir les CAFs correspondent généralement aux marqueurs exprimés par les fibroblastes activés, comme α -SMA, exprimée par les myofibroblastes par exemple. Cependant, l'expression d' α -SMA n'est pas spécifique des CAFs puisqu' α -SMA est aussi exprimée par les fibroblastes normaux ainsi que les cellules musculaires lisses. De façon similaire, la protéine FAP est exprimée au niveau des cellules mésodermiques quiescentes dans de multiples tissus. Il en va de même pour la ténascine-C, la vimentine, ou encore le PDGFR- β qui sont tous exprimés dans d'autres types cellulaires que les CAFs (274–276). FSP-1 semble néanmoins être le seul marqueur ayant une distribution relativement exclusive et pouvant identifier une population unique de CAFs. Les CAFs consistent donc en une population cellulaire très hétérogène ayant probablement des rôles distincts dans la progression tumorale (Fig. 35) (277–279).

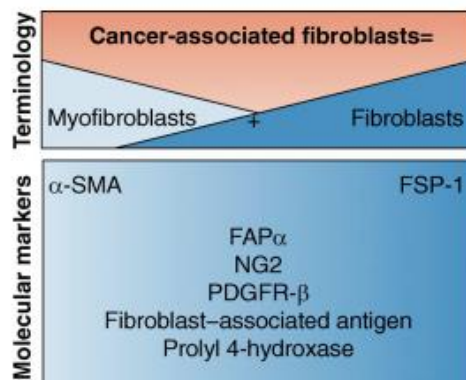


Figure 35 : Les CAFs semblent être constitués de myofibroblastes et de fibroblastes ayant des marqueurs moléculaires distincts. Néanmoins, plusieurs marqueurs peuvent être exprimés simultanément (241).

B. Le microenvironnement tumoral prostatique

Les interactions ayant lieu entre les cellules tumorales et le stroma réactif ont pu être observées et caractérisées dans de nombreux cancers solides dont le CaP. Au niveau de la glande prostatique, le stroma réactif est initié durant le développement de néoplasies intra-prostatiques (PIN) correspondant aux lésions précancéreuses du CaP. Le stroma réactif évolue par la suite de manière concomitante aux PIN jusqu'à la mise en place de la tumeur et la progression tumorale subséquente (Fig. 36) (280).

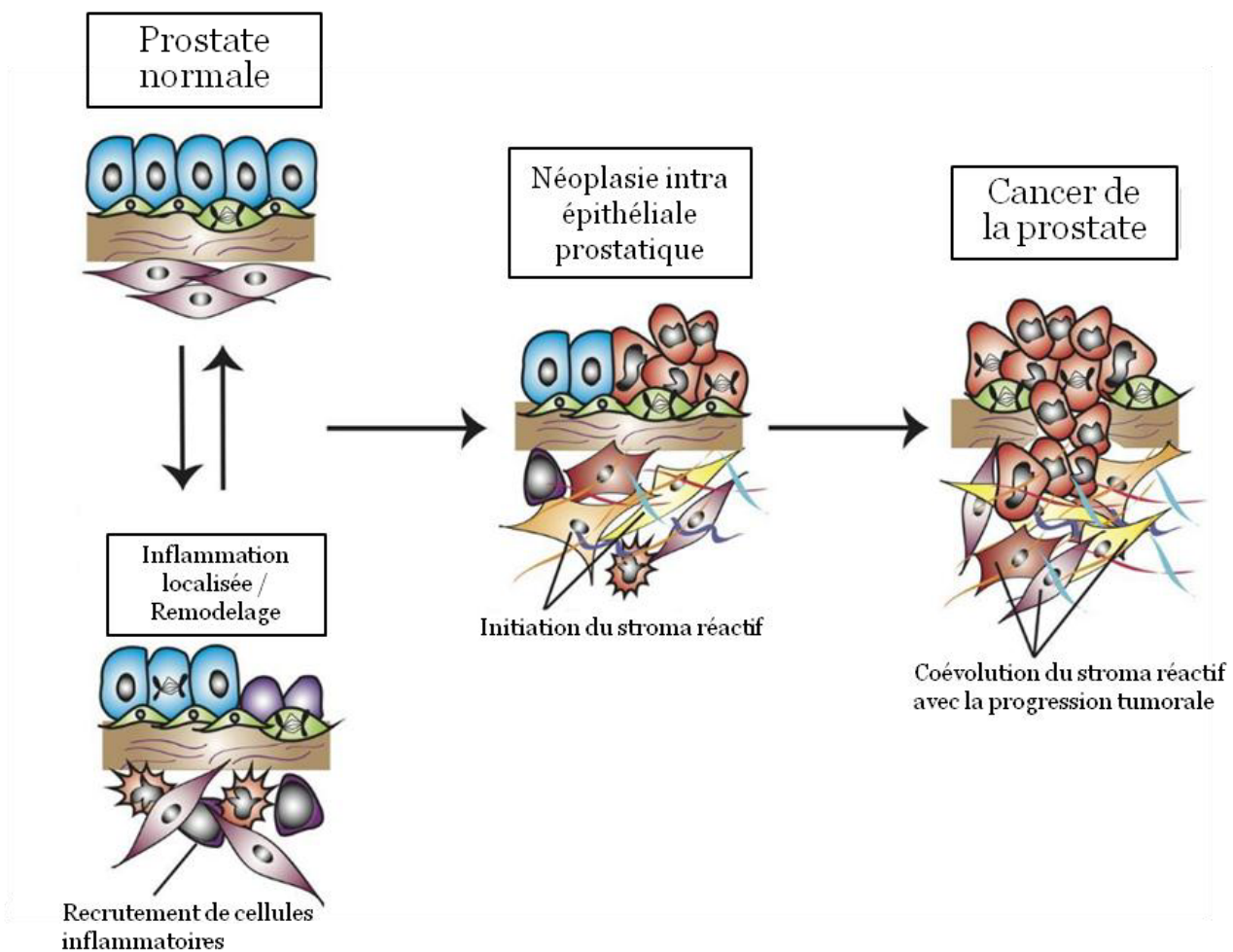


Figure 36 : Homéostasie de la glande prostatique et formation du stroma réactif dans le CaP (280).

Le microenvironnement tumoral prostatique est fortement impliqué dans la progression du CaP, en particulier du fait de la création d'un contexte inflammatoire, de la stimulation de l'angiogenèse, et de l'apparition de CAFs (281).

1. Angiogenèse

L'angiogenèse est un des processus essentiels à la progression tumorale, en particulier au niveau du CaP. Le VEGF, en tant que facteur angiogénique majeur, a été largement étudié ces dernières années dans le CaP et son expression a pu être corrélée à un mauvais pronostic ainsi qu'à une faible survie globale et spécifique pour les patients atteints d'un CaP. De plus, ce facteur a pu être considéré comme marqueur prédictif des rechutes suite aux traitements (282). Ainsi, de nombreux axes de thérapies ont été développés afin de cibler la voie de signalisation du VEGF et l'angiogenèse, résumés dans la figure ci-après (Fig. 37) (283).

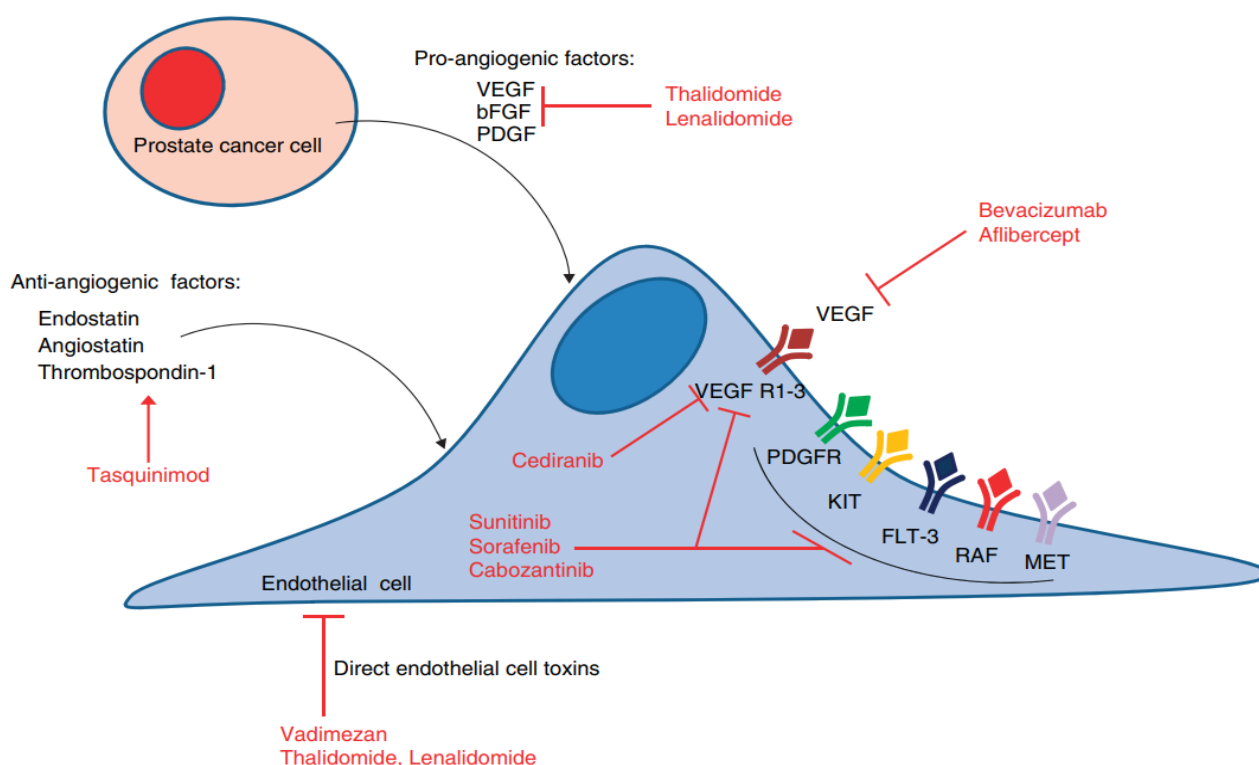


Figure 37 : Représentation schématique des voies de signalisation de l'angiogenèse ciblées par des agents thérapeutiques (283).

Le Bevacizumab et l'Aflibercept sont 2 agents ciblant directement le VEGF. Le Thalidomide et le Lenalidomide ciblent quant à eux les facteurs angiogéniques de façon plus large, incluant le VEGF mais aussi le FGF et le PDGF. Le Sunitinib, le Sorafenib, le Cediranib, et le Cabozantinib, sont des inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase présents au niveau des cellules endothéliales. Le Vadimezan, le Thalidomide, et le Lenalidomide sont des agents supprimant la formation de vaisseaux sanguins en inhibant les cellules endothéliales. Enfin, le Tasquinimod est

un agent inducteur de facteurs anti-angiogéniques comme l'endostatine, l'angiostatine, ou encore la thrombospondine-1 (283). Bien que les agents ayant atteint la phase III d'essai clinique aient pu améliorer la survie sans progression des patients atteints d'un CaP, aucun n'a pu améliorer la survie globale, et certains ont conduit à l'abandon de l'essai clinique pour futilité (284). Le ciblage de la voie angiogénique est donc nécessaire mais pas suffisant, probablement du fait que l'angiogenèse n'est de loin pas le seul processus favorisant la progression tumorale.

2. Inflammation et infiltrat immunitaire

La création d'un contexte inflammatoire est considérée depuis longtemps comme étant indispensable au développement du CaP, l'inflammation chronique étant associée à des stades bénins comme à des stades avancés du CaP. De plus, des études histologiques menées sur 191 biopsies de patients atteints d'un CaP ont pu mettre en évidence qu'entre 80 et 90 % de ces échantillons présentent des signes d'infiltrats immunitaires, et ces infiltrats sont de plus en plus importants au fur et à mesure de la progression du CaP. Cette caractéristique peut ainsi constituer un marqueur pronostic de la maladie (285,286). Ces infiltrats immunitaires sont constitués de cellules immunitaires provenant à la fois du système immunitaire inné et adaptatif. Bien que leur composition puisse varier en fonction du stade de la maladie et de l'âge du patient, la majorité des infiltrats est composée de 70 à 80 % de lymphocytes T auxiliaires CD4+, de 10 à 15 % de lymphocytes B, et de 10 à 15 % de macrophages (287). Les lymphocytes T auxiliaires CD4+ peuvent avoir des effets suppresseurs de tumeur ou pro-tumorigéniques en fonction du stade tumoral. De plus, un nombre élevé de ces lymphocytes s'avère être des lymphocytes T régulateurs favorisant la progression tumorale du CaP (288). De même, les lymphocytes B ont un effet pro-tumorigénique en favorisant l'émergence de lymphocytes T auxiliaires de type 2 pro-tumorigéniques et en recrutant des macrophages. La présence de lymphocytes B est en outre corrélée à un stade élevé de la maladie et à un risque important de rechute (289). Enfin, les macrophages présents au niveau du stroma prostatique sont majoritairement des macrophages de type M2 pro-tumorigéniques. Ce phénotype M2 des macrophages est associé à un score de Gleason élevé et à un stade avancé de la tumeur (290). Qui plus est, ces macrophages de type M2 ont été démontrés comme étant capables de favoriser l'apparition de CAFs (291).

3. Les fibroblastes associés au cancer prostatique

Le microenvironnement tumoral prostatique contient une quantité importante de CAFs qui constituent la population cellulaire majoritaire de ce stroma réactif (241). Ils favorisent non seulement la progression tumorale mais sont aussi impliqués dans l'initiation du processus tumoral. En effet, Olumi et al. a pu mettre en évidence le fait que l'association de CAFs avec des cellules tumorales prostatiques initiées, mais non tumorigéniques, suffit à favoriser l'initiation et la progression tumorale *in vivo*, du fait de l'apparition d'une masse tumorale de 1250 mg (292). La tumeur ainsi obtenue présente de fortes capacités prolifératives et invasives. En comparaison, l'inoculation de ces mêmes cellules tumorales prostatiques initiées associées à des fibroblastes normaux aboutit à l'obtention d'une masse de kératinocytes de 10 mg. Ces études ont été poursuivies *in vitro* et ont permis de mettre une évidence une altération de la morphologie épithéliale, ainsi qu'une augmentation de la survie et la prolifération des cellules tumorales prostatiques initiées, en co-culture avec les CAFs (292). En plus de favoriser la prolifération cellulaire tumorale, les CAFs favorisent l'invasion des cellules tumorales prostatiques en induisant l'EMT du fait de l'augmentation des marqueurs mésenchymateux Snail, Twist, ainsi que la vimentine, associée à une diminution du marqueur épithélial E-cadhérine. Cette induction de l'EMT est par ailleurs due à la sécrétion de MMPs par les CAFs. De plus, l'EMT induite par les CAFs favorise en outre l'apparition de CSCs ayant des capacités à former de nouvelles tumeurs augmentées (293).

Les CAFs sont donc capables de favoriser l'émergence d'une population de CSCs prostatiques au sein de la tumeur. Qui plus est, les CAFs amplifient les capacités de ces CSCs à former des structures glandulaires prostatiques contenant un grand nombre de lésions, ayant un index prolifératif élevé, ainsi que des caractéristiques histopathologiques tumorales. Ces effets sur les CSCs sont médiés par l'annexine A1, une protéine se liant aux phospholipides en présence de calcium et régulant les signaux inflammatoires induits par les glucocorticoïdes, sécrétée par les CAFs (294,295). De façon intéressante, le stade de la maladie influe grandement ces interactions entre les CAFs et les CSCs. Les CAFs provenant d'un CPRC sont d'autant plus impliqués dans la stimulation des CSCs à former des tumeurs agressives et peu différenciées, par rapport à des CAFs provenant d'un CaP hormono-naïf. Ce phénomène est encore plus amplifié lorsque les CSCs proviennent elles aussi d'un CPRC, par rapport à des CSCs provenant d'un CaP hormono-naïf (296).

Les CAFs prostatiques sont notamment impliqués dans l'immunomodulation et l'inflammation. En présence de CAFs, les cellules tumorales prostatiques activent plusieurs voies de signalisation inflammatoires comme la voie NF- κ B (facteur nucléaire-kappa B), la voie COX-2 (cyclo-oxygénase-2), ou encore la voie HIF-1 (facteur induit par l'hypoxie), aboutissant à la production de dérivés réactifs de l'oxygène. Par ailleurs, l'inhibition de NF- κ B, COX-2, et HIF-1 permet de bloquer l'invasion des cellules tumorales prostatiques et l'expression des marqueurs mésenchymateux de l'EMT. De même, l'inhibition de ces 3 facteurs bloque l'expression de marqueurs de cellules souches au niveau des cellules tumorales et les empêche de former des prostasphères. Ces facteurs sont donc indispensables pour induire l'EMT, l'invasion, ainsi que des caractéristiques de cellules souches des cellules tumorales prostatiques (297). En créant un contexte inflammatoire, les CAFs peuvent recruter des cellules du système immunitaire, dont les monocytes, en sécrétant la chimiokine CXCL12. Sous l'effet des CAFs, ces monocytes se différencient par la suite en macrophages possédant un phénotype de type M2. Ces macrophages M2 ainsi obtenus favorisent l'invasion et l'angiogenèse des cellules tumorales prostatiques, tout en étant corrélés à un stade de Gleason plus élevé (291). Les CAFs favorisent donc fortement la progression tumorale prostatique et leur présence est associée à une agressivité plus élevée de la maladie. Une étude réalisée sur une cohorte d'une quarantaine de patients a révélé qu'effectivement les CAFs sont présents chez 59 % des patients atteints d'un CaP métastatique alors que la détection de CAFs est négative chez des patients atteints à un stade localisé. La présence de CAFs pourrait donc être utilisée en tant que biomarqueur pronostic pour différencier les stades avancés des stades précoces (298).

L'activation des CAFs est un sujet ayant aussi été étudié au niveau du microenvironnement tumoral prostatique. Dans cette optique, la cytokine IL-6 a été mise en évidence comme étant un des facteurs clé responsable de l'activation des fibroblastes prostatiques en CAFs. À noter que le traitement de fibroblastes prostatiques normaux avec de l'IL-6 suffit effectivement à induire un phénotype de CAFs du fait de l'augmentation du marqueur α -SMA (293,299). Sachant que les MSCs sont une source importante de CAFs, Jung et al. ont pu démontrer le fait que les cellules tumorales prostatiques induisent le recrutement des MSCs en sécrétant la chimiokine CXCL16, dont le récepteur CXCR6 se trouve à la surface des MSCs. Les MSCs sont ainsi recrutées depuis la moelle osseuse jusqu'au site tumoral prostatique.

Par la suite, sous l'effet de la chimiokine CXCL16, les MSCs se différencient en CAFs du fait de la surexpression du marqueur α -SMA et de la vimentine. Les CAFs ainsi activés sécrètent de grandes quantités de CXCL12 dont le récepteur CXCR4 se situe au niveau des cellules tumorales prostatiques. L'axe de signalisation CXCL12/CXCR4 induit par la suite l'EMT au niveau des cellules tumorales prostatiques aboutissant à l'établissement de métastases à distance (Fig. 38) (300).

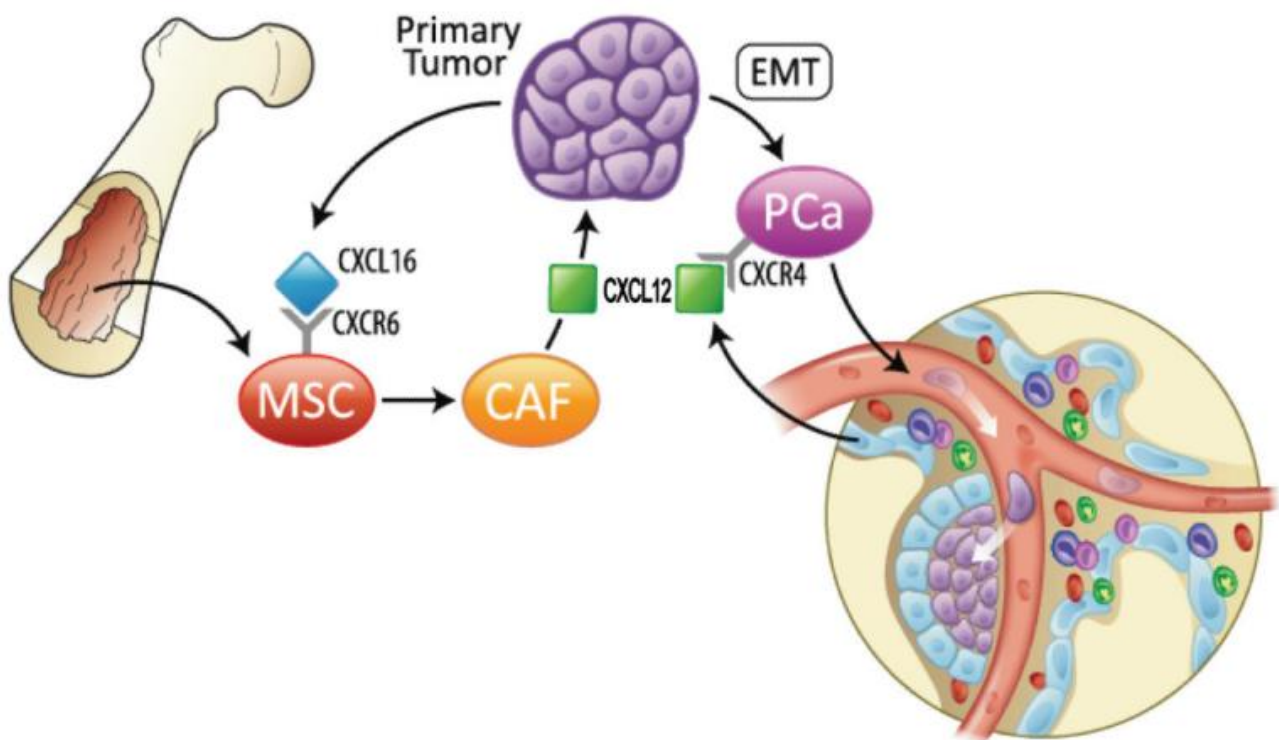


Figure 38 : Dialogue entre les cellules tumorales et les MSCs différenciées en CAFs privilégiant la progression du CaP (PCa) jusqu'au processus métastatique (300).

Les cellules tumorales prostatiques sont donc capables de recruter des MSCs et de les différencier en CAFs, leur fournissant ainsi un allié de poids jouant en leur faveur lors de la progression tumorale. Cette activation des MSCs en CAFs semble être une étape majeure lors de laquelle les cellules tumorales sécrètent divers facteurs dans le but de corrompre des cellules physiologiquement saines et de leur faire acquérir des propriétés pro-tumorigéniques. Ce processus a été considérablement étudié ces dernières années bien que de nombreuses zones d'ombre persistent encore. Notamment, les effets des variants du RA, impliqués dans la résistance à la castration, sur la différenciation des MSCs en CAFs, n'ont à ce jour pas été étudiés.

PROJET DE THÈSE

Comme mentionné dans l'introduction, les variants du RA ont une implication majeure dans la résistance à l'hormonothérapie chez des patients atteints d'un CaP à un stade localement avancé ou métastatique. Leurs effets ont été amplement caractérisés au niveau des cellules tumorales prostatiques impliquant la progression de ces dernières. Cependant, le processus tumoral ne dépend pas uniquement des cellules tumorales, mais aussi du microenvironnement tumoral sans lequel la tumeur ne pourrait progresser. En effet, une boucle de régulation paracrine s'établit entre les cellules tumorales et le stroma, et ce à travers les CAFs. Un rétrocontrôle positif s'instaure donc entre les CAFs et les cellules tumorales favorisant considérablement toutes les étapes du processus tumoral, jusqu'à l'établissement de métastases. Néanmoins, les effets des variants du RA sur les interactions ayant lieu entre les cellules tumorales prostatiques et le stroma avoisinant, en particulier les CAFs, n'ont à ce jour pas été mis en évidence. Cette interrogation constitue la base de mon projet de thèse. Dans cette optique, j'ai cherché à étudier l'impact de variants du RA sur la corruption du stroma prostatique en me focalisant sur l'origine des CAFs, et plus particulièrement sur leur différenciation à partir des MSCs.

Pour ce faire, j'ai élaboré 2 grands axes d'études au cours de ma thèse, ayant pour point commun l'étude de marqueurs de différenciation en CAFs :

- 1) Dans un premier temps, j'ai mis au point un modèle *in vitro* de co-culture entre des cellules tumorales prostatiques exprimant, ou non, un variant du RA, et des MSCs.
 - A. Pour ce faire, j'ai utilisé en premier lieu une approche de co-culture indirecte entre des cellules tumorales prostatiques exprimant, ou non, un variant du RA, et des MSCs en inserts.
 - B. Par la suite, une approche de milieu conditionné par les cellules tumorales prostatiques exprimant, ou non, un variant du RA, a été développée et appliquée sur les MSCs.
- 2) Dans un deuxième temps, un modèle murin permettant la visualisation *in vivo* d'un marqueur du microenvironnement tumoral a été optimisé.

La finalité de ce projet de thèse a consisté en une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance à la castration du fait de la compréhension de l'influence des variants du RA sur le microenvironnement tumoral à travers la différenciation en CAFs.

RÉSULTATS

PARTIE I : CO-CULTURES *IN VITRO*

A) Co-cultures indirectes en inserts

La première partie de mon projet de thèse a consisté en l'étude de l'influence de variants du RA, exprimés par les cellules tumorales prostatiques, sur la différenciation des MSCs en CAFs, en utilisant en premier lieu une approche de co-culture indirecte. Pour ce faire, l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation en CAFs a été étudiée par PCR quantitative dans des MSCs en inserts mises en présence de cellules tumorales prostatiques LNCaP transduites, ou non, avec un variant du RA.

- Matériel & Méthodes

La lignée cellulaire tumorale prostatique utilisée au laboratoire pour réaliser les expériences est la lignée humaine LNCaP (lymph node carcinoma of the prostate), clone FGC (cellules à croissance rapide), provenant de la collection ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures). Ces cellules épithéliales sont dérivées d'une biopsie du ganglion lymphatique supraclaviculaire gauche d'un patient âgé de 50 ans et atteint d'un CaP métastatique. Cette lignée est androgéno-sensible et exprime un RA endogène portant la mutation T878A au niveau du LBD (301). Elle possède aussi toute la machine cellulaire nécessaire pour l'étude de l'activation de l'axe de signalisation du RA. De ce fait, il est possible de comparer après transduction de ces cellules, les activités des variants du RA, à celles du RA sauvage, ou du RA endogène.

Ces cellules sont maintenues dans du RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 10 mM de tampon HEPES, 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich), et 1 mM de pyruvate (Invitrogen).

Les cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine (hMSCs, Lonza, Walkersville, MD) ont été maintenues dans le milieu de culture spécifique (MSCGM™) du fournisseur, en accord avec les instructions de ce dernier (Lonza, Walkersville, MD). Les MSCs n'ont pas été utilisées après le 5^{ème} passage.

Afin de permettre l'expression des variants du RA dans les cellules LNCaP, un protocole de transduction a été établi au sein du laboratoire (140). Les constructions lentivirales ont été réalisées à partir du plasmide pLenti PGK Blast DEST (Addgene). Dans ce plasmide, le RA sauvage (RA WT), ainsi que les variants constitutivement actifs du RA, RA Q641X, et RA-V7, sont fusionnés à la GFP (protéine verte fluorescente), et leur expression est sous le contrôle du promoteur fort PGK. Ce plasmide possède aussi une cassette de résistance à la blasticidine, permettant ainsi la sélection des cellules ayant été effectivement transduites.

Pour réaliser les expériences de co-cultures indirectes, les cellules LNCaP transduites avec le RA WT, le variant RA Q641X, ou le variant RA-V7, ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Le contrôle négatif consistant en des cellules LNCaP transduites avec un plasmide « vide », n'exprimant que la GFP. Après transduction, les cellules sont incubées pendant 7 jours en présence de 3 µg/mL de blasticidine (Thermo Fisher Scientific). Au bout de 7 jours de traitement des cellules LNCaP, les MSCs, préalablementensemencées dans des inserts 3 jours avant, ont été déposées sur ces cellules LNCaP. Au même moment, le milieu de culture a été changé et du DMEM contenant 10 % de SVF décomplémenté, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich), ainsi que 10 nM de DHT, a été ajouté aux 2 types cellulaires (Fig. 39).

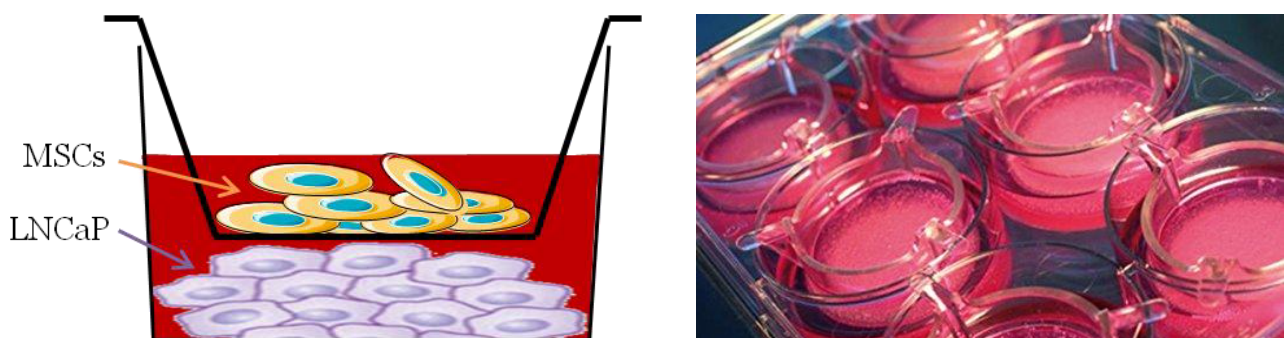


Figure 39 : Modèle de co-culture indirecte entre les cellules LNCaP et les MSCs en inserts.

Après 7 jours de co-culture, les ARNs ont été extraits des cellules LNCaP et des MSCs à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel) conformément aux instructions du fournisseur. La concentration et la pureté des ARNs ont ensuite été déterminées à travers la mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific). Par la suite, une transcription inverse a été réalisée à partir de 500 ng d'ARNs pour les cellules LNCaP, et 50 ng pour les MSCs, à l'aide du kit Iscript™ Supermix (Bio-Rad), selon les recommandations du fournisseur. Enfin, les niveaux d'expression de plusieurs gènes ont été analysés par PCR quantitative à l'aide du kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), et du système LightCycler® 480 Real-Time PCR (Roche Life Science). Les amorces des gènes *PBGD*, *FSP-1 (S100A4)*, *PDGFR-β*, *CXCL12 (SDF-1)*, et *VEGF* ont été utilisées selon le protocole du fournisseur (QuantiTect Primer Assays, Qiagen). Les niveaux d'expression des gènes ont été déterminés en tant que ratio Δ CT du gène d'intérêt par rapport au gène de ménage *PBGD*.

Les niveaux d'expression des gènes ont été déterminés pour chaque condition dans 3 expériences indépendantes et chaque RT-PCR quantitative a été réalisée en triplicat.

Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées en utilisant les tests de Student et ANOVA, à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme significative.

- Résultats / Discussion

Le variant RA Q641X induit une augmentation de l'expression du marqueur de différenciation FSP-1 dans les MSCs

FSP-1 (ou S100A4) est un marqueur de différenciation en CAFs récurrent dont l'expression a été considérablement étudiée et démontrée comme étant fortement caractéristique d'un phénotype de CAFs (241,277). Les CAFs ont été mis en évidence comme dérivant de plusieurs origines, dont les MSCs qui représentent une source importante de CAFs (198,300). De ce fait, l'expression de FSP-1 a été étudiée dans des MSCs en inserts en co-culture indirecte avec des cellules tumorales prostatiques

LNCaP exprimant, ou non, un variant du RA, afin d'étudier l'impact de variants du RA sur la différenciation des MSCs en CAFs.

De façon intéressante, au bout de 7 jours de co-culture indirecte, l'expression de FSP-1 est significativement plus élevée dans les MSCs mises en présence de LNCaP exprimant le variant RA Q641X, par rapport à toutes les autres conditions (Fig. 40). En comparaison avec la condition des MSCs mises en présence uniquement de DMEM, la condition du variant RA Q641X est la seule condition dans laquelle les MSCs présentent une augmentation de l'expression de FSP-1. Il n'y a aucune différence du niveau d'expression de FSP-1 dans les MSCs entre les conditions DMEM, en présence du RA WT, ou en présence du variant RA-V7. Qui plus est, les MSCs mises en présence de cellules LNCaP exprimant uniquement la GFP présentent une expression de FSP-1 plus faible que dans la condition DMEM. Les cellules LNCaP ne sont donc pas capables à elles seules d'induire l'expression de FSP-1 dans les MSCs. Il en va de même pour les cellules LNCaP exprimant le RA sauvage ou le variant RA-V7. Par conséquent, ces résultats suggèrent que le variant RA Q641X semble être le seul ayant les capacités d'induire une augmentation de l'expression de FSP-1 au niveau des MSCs. Les niveaux d'expression des transgènes, représentés par l'expression de la GFP, ne présentent aucune variation entre les différentes conditions dans les cellules LNCaP transduites (Fig. 41). L'augmentation de l'expression de FSP-1 étant d'un facteur 2, ces données semblent indiquer que le variant RA Q641X est capable d'induire une différenciation des MSCs en CAFs de façon spécifique.

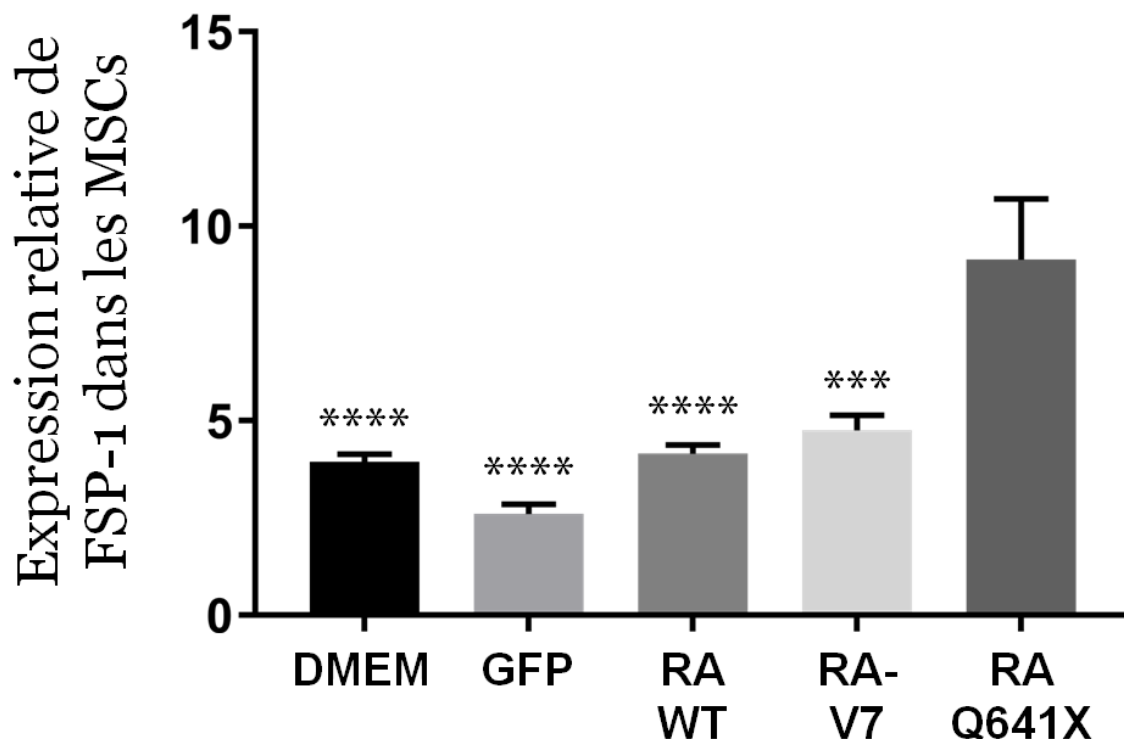


Figure 40 : Expression quantitative du marqueur de différenciation FSP-1 dans des MSCs mises en présence de cellules LNCaP transduites.

Le marqueur de différenciation en CAFs FSP-1 a été analysé par RT-PCR quantitative au niveau de MSCs. En tant que contrôle négatif, les MSCs n'ont été mises en présence que de milieu de culture (DMEM). Les analyses quantitatives ont été réalisées dans les MSCs après 7 jours de co-culture indirecte avec des cellules LNCaP transduites avec le RA sauvage (RA WT), le variant RA-V7 (RA-V7), le variant RA Q641X (RA Q641X), ou un plasmide vide (GFP).

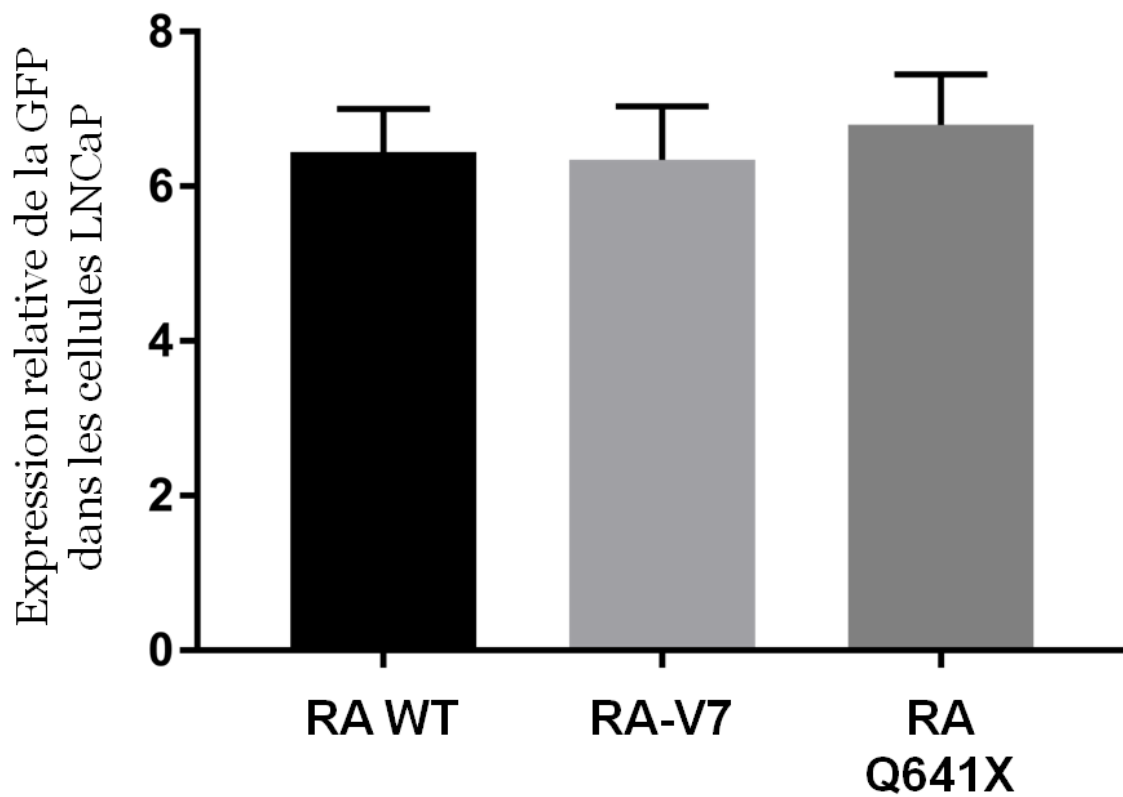


Figure 41 : Expression quantitative de la GFP dans les cellules LNCaP transduites.

Les niveaux d'expression de la GFP, mesurés par RT-PCR quantitative, ne présentent aucune différence significative entre les cellules LNCaP exprimant le RA sauvage (RA WT), le variant RA-V7 (RA-V7), ou le variant RA Q641X (RA Q641X).

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence le fait que le variant RA Q641X est capable d'induire une augmentation de l'expression de FSP-1 dans les MSCs, suggérant une différenciation en CAFs. Cette augmentation est spécifique puisque des analyses complémentaires de la GFP dans les cellules LNCaP transduites ont permis de démontrer des niveaux équivalents d'expression des transgènes entre les conditions du RA sauvage et des variants, après 7 jours de co-culture (Fig. 41). De façon surprenante, l'augmentation de l'expression de FSP-1 n'a pas pu être mise en évidence dans les MSCs mises en présence de LNCaP exprimant le variant RA-V7. Ces données laissent à penser que ces deux variants semblent avoir des impacts différents au niveau du microenvironnement tumoral, en particulier sur la différenciation en CAFs.

Par ailleurs, d'autres expériences supplémentaires de co-culture ont été réalisées afin de mettre à jour une augmentation de l'expression d'autres marqueurs de différenciation des CAFs dans les MSCs mises en présence du variant RA Q641X, en vain. Qui plus est, des analyses de l'expression de la GFP par RT-PCR quantitative dans les cellules LNCaP transduites au niveau de ces expériences supplémentaires ont permis de mettre en évidence une différence d'expression des transgènes entre les différentes conditions. L'approche utilisée présente donc des limites qui pourraient expliquer l'impossibilité de confirmer l'augmentation de l'expression de FSP-1 avec d'autres marqueurs de différenciation en CAFs. Par conséquent, une nouvelle approche a été développée au sein du laboratoire dans laquelle l'expression du transgène ne se fait non plus par sélection à la blasticidine, mais de façon inductible et dose-dépendante à la doxycycline, permettant ainsi une modulation des niveaux d'expression des transgènes.

B) Milieux conditionnés et système inductible

La deuxième sous-partie du premier volet de mon projet de thèse a fait suite au développement d'une nouvelle approche au sein du laboratoire utilisant un système inductible à la doxycycline, permettant ainsi une expression plus modulable et plus précise des transgènes au niveau des cellules LNCaP transduites (140). En parallèle, j'ai mis au point une approche de milieu conditionné dans le but de confirmer et visualiser au niveau cellulaire l'expression de FSP-1 dans les MSCs, mises en présence du variant RA Q641X, à l'aide d'une approche d'hybridation in situ en fluorescence (FISH).

L'expression des transgènes étant sous la dépendance d'un élément de réponse à la tétracycline, le système inductible permet de moduler précisément cette expression via l'ajout de doxycycline, un analogue de la tétracycline. Cette approche étant plus robuste que la précédente, cela m'a permis de diminuer les temps de co-culture. En effet, 48h de présence de milieu conditionné de cellules LNCaP exprimant la variante RA Q641X ont suffi à induire une augmentation de l'expression du marqueur FSP-1 dans les MSCs, déterminée par RT-PCR quantitative. De plus, une augmentation de l'expression d'autres marqueurs de différenciation en CAFs, dont PDGFR- β , CXCL12 (SDF-1), ainsi que VEGF, a pu être mise en évidence dans les MSCs mises en présence de milieu conditionné de cellules LNCaP exprimant la variante RA Q641X, au bout de 48h. Cette approche de milieu conditionné combinée au système inductible m'a donc permis de confirmer l'augmentation de l'expression de FSP-1 en présence du variant RA Q641X, initialement observée en co-culture indirecte, et de la valider en mettant à jour l'augmentation d'autres marqueurs de différenciation en CAFs en présence de ce variant.

De même, cette approche a rendu possible la visualisation au niveau cellulaire de l'évolution de l'expression du marqueur FSP-1 dans les MSCs en présence du variant RA Q641X, en utilisant la technique de FISH. Cette technique est basée sur l'hybridation de sondes d'ADN complémentaires au transcrit étudié. L'ADN branché hybridé est ensuite amplifié par 2 étapes d'amplification successives. Par la suite, l'hybridation de sondes fluorescentes complémentaires permet la visualisation du signal. Ces expériences ont été possibles grâce à une collaboration mise en place avec

la plateforme technologique de criblage phénotypique à haut débit de l'IGBMC, dirigée par Laurent Brino. Il a ainsi été possible d'analyser cellule par cellule la fluorescence des transcrits correspondant à l'expression de FSP-1. Pour cela, suite à l'approche FISH, les images ont été acquises puis analysées à l'aide du système ArrayScan Cellular Imaging System et du logiciel Cellomics HCS Studio (Thermo Fisher Scientific). Le cytoplasme et le noyau des MSCs ayant été marqués séparément, les spots de fluorescence correspondant à l'expression des transcrits de FSP-1 ont pu être quantifiés dans chaque MSC de façon individuelle. Les résultats de ces expériences m'ont permis de voir que dans la condition des MSCs mises en présence de milieu conditionné de cellules LNCaP exprimant le variant RA Q641X, l'augmentation de l'expression de FSP-1 ne se fait que dans un nombre restreint de cellules mais de façon considérable.

Par ailleurs, les ARNs des cellules LNCaP transduites ayant produit les milieux conditionnés ont été analysés par RT-PCR quantitative, afin de déterminer si certains facteurs de différenciation, sécrétés par les cellules tumorales et impliqués dans la différenciation en CAFs, subissent une augmentation en présence des variants. En effet, l'expression du facteur VEGF, impliqué dans la différenciation en CAFs, est significativement augmentée dans les cellules LNCaP exprimant le variant RA Q641X. Ces données confirment des résultats obtenus antérieurement au laboratoire montrant une augmentation de l'expression quantitative et de la sécrétion du VEGF dans des cellules LNCaP exprimant le variant RA Q641X (données non publiées).

L'ensemble de ces résultats a donné lieu à la rédaction d'une publication scientifique soumise à la revue scientifique PLOS ONE, ci-après.

Constitutively active androgen receptor variant enhances mesenchymal stem cells differentiation into cancer associated fibroblasts

Short title: Stroma corruption by androgen receptor variant

Edwige Schreyer^{1*}, Eva Erdmann¹, Anne Maglott-Roth¹, Pauline Ould-Madi Berthélémy¹, Jocelyn Céraline^{1,2,3}

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France; Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7104, Illkirch, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, Illkirch, France; Université de Strasbourg, Illkirch, France.

² Service d'Onco-Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

³ Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France.

* Corresponding author

E-mail: schreyer.edwige@gmail.com (ES)

Abstract

Constitutively active androgen receptor (AR) variants are involved in resistance to castration therapy leading to castration-resistant prostate cancer. These AR variants support prostate tumor progression by inducing expression of androgen-responsive genes in an androgen-depleted environment. However, the effects of AR variants on the tumor microenvironment have not yet been studied. We analyzed the impact of AR variants on the conversion of mesenchymal stem cells (MSCs) into cancer-associated fibroblasts (CAFs) known to facilitate tumor progression. Gene expression analyses indicated that the constitutively active Q641X AR variant increased the levels of expression of VEGF-A, a CAF differentiation factor. Using a prostate tumor cell conditioned medium approach, we demonstrated that, when expressed in LNCaP cells, Q641X AR variant increased the expression of several CAF differentiation markers in MSCs. Our results suggest novel consequences of constitutively active AR variants for stroma corruption through the generation of CAFs.

Introduction

Currently, the standard treatment for patients with advanced prostate cancer (PCa) is androgen deprivation by medical castration therapy. However, most patients ultimately relapse and develop a castration-resistant PCa (CRPC) leading to a lethal stage of the disease [1–4]. It has been shown that recurrence is almost always associated with reactivation of androgen receptor (AR) signaling. One of the mechanisms involved in this reactivation is the generation of constitutively active AR variants [5–8]. These variants are able to drive expression of canonical, but also non-canonical androgen-responsive genes, in an androgen-independent manner. This is because AR variants lack the ligand binding domain, which also explains resistance to therapies that target this domain [9–12]. AR-V7 is most abundantly and frequently expressed in CRPC. It originates from alternative splicing, one of the mechanisms responsible for the synthesis of AR variants [13,14]. Nonsense mutations creating a premature stop codon, such as the Q641X AR variant, have also been reported in CRPC [15].

In addition to their role in CRPC development, these constitutively active AR variants have been linked to PCa progression. AR-V7 and Q641X AR are able to upregulate the expression of mesenchymal markers through competition with full length AR [16,17]. These

mesenchymal markers are associated with epithelial to mesenchymal transition (EMT) and the systemic dissemination of PCa cells. In addition, AR-V7 can promote PCa by modulating the expression of tumor-associated paracrine factors such as TGF- β and IGF-1 [18].

Cytokines and growth factors, including TGF- β and IGF-1, are major components of the tumor microenvironment, and the tumor-associated stroma is essential for cancer development. Interactions between tumor cells and the surrounding microenvironment have a dramatic influence on disease initiation and progression, as well as patient prognosis [19,20]. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are the most abundant stromal cells within tumor-associated stroma. CAFs have the ability to produce a network of cytokines that fuel the growth, angiogenesis and metastatic capabilities of cancer cells [21–23]. Interestingly, although CAFs share the capacity to promote tumor progression, they derive from many different origins. Most CAFs derive from resident tissue fibroblasts, but also from mesenchymal stem cells (MSCs) located in the bone marrow [24,25]. Prostate tumor cells are able to recruit MSCs to the tumor site by secreting several factors, e.g. chemokines, including CXCL16 [26]. These factors stimulate the differentiation of MSCs into CAFs that subsequently secrete other pro-tumorigenic factors. As a result, a reciprocal feedback loop is established between fibroblasts and cancer cells leading to the malignant phenotype of cancer [26,27].

It appears that AR in stromal cells facilitate prostate disease progression [28,29], but how AR variants influence stromal cells and how they influence tumor progression through microenvironment has not previously been investigated.

In the present study, we demonstrate that in the presence of the Q641X AR variant, levels of paracrine factors in prostate tumor cells known to stimulate MSCs conversion into CAFs are enhanced. What is more, MSCs differentiation into CAFs was effective when MSCs were in presence of conditioned medium of PCa cells expressing the constitutively active AR variant. These results highlight for the first time an unexpected effect of Q641X AR variant on tumor stroma corruption that facilitates the generation of CAFs.

Methods

Cell lines

The human prostate cancer cell line LNCaP, clone FGC was obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). LNCaP cells were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2

mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich), and 1 mM pyruvate (Invitrogen).

Human mesenchymal stem cells (hMSCs, Lonza, Walkersville, MD) were cultured in mesenchymal stem cell growth medium bulletKit (MSCGM™) according to the supplier's recommendations (Lonza, Walkersville, MD). hMSCs were not used after passage 5.

Plasmids, lentiviral transduction and inducible system

LNCaP cells were transduced with lentivirus as previously described [17]. Briefly, lentiviral particles carrying expression plasmids for GFP alone, AR wild type (WT), Q641X AR or AR-V7 fused to GFP were used to infect LNCaP cells. Stable cell lines were then obtained under antibiotic pressure and AR expression was induced with 100 ng/mL doxycycline (Life Technologies).

Exposure of MSCs to tumor cells conditioned medium

Transduced LNCaP cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% heat inactivated and tetracycline free fetal bovine serum (Clontech), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10 nM dihydrotestosterone (Sigma-Aldrich), and 100 ng/mL doxycycline (Life Technologies). Conditioned medium of these tumor cells was harvested after 48 h and centrifuged at 516 g for 7 min. MSCs were then exposed to this fresh tumor conditioned medium for 48 h.

QRT-PCR

After exposure to conditioned medium, total cellular RNA was extracted from the cell lines using NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. The concentration and purity of the RNA were quantified through absorbance at 260 nm and 280 nm (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific).

Reverse transcription was performed using Iscript™ Supermix (Bio-Rad) with 50 ng or 500 ng total RNA isolated from MSCs and LNCaP cells respectively, according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time PCR was conducted using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) and the *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche Life Science). All primers and probes for the PBGD housekeeping gene, used as endogenous control, were purchased (QuantiTect Primer Assays, Qiagen).

Levels of target gene expression are reported as a ratio Δ CT of target gene to *PBGD*.

RNA levels were determined for each condition in three independent experiments and each quantitative RT-PCR was carried out in triplicate.

Fluorescence in situ hybridization

Before exposure to the tumor conditioned medium, MSCs were stained with 5 μ M CellTracker™ Green CMFDA Dye (Thermo Fisher Scientific) for 30 min, enabling cytoplasmic localization of the MSCs during subsequent data analysis. After 48 h exposure to tumor conditioned medium, MSCs were then fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h. The distribution of FSP-1/S100A4 transcripts was then investigated by FISH analysis according to manufacturer's protocol (Invitrogen™ *ViewRNA™ ISH Cell Assays*, Thermo Fisher Scientific). Briefly, MSCs were first permeabilized for 5 min at RT with the provided detergent solution QC, and mRNA were unmasked following digestion with a 1:4000 dilution of the provided protease for 10 min at RT. Hybridization was then carried out with type 1 probe set specific to FSP-1/S100A4 for 3 h at 40 °C. Branched DNA signal amplification was then performed following successive incubation with pre-amplifier and amplifier mix solutions at 40 °C for 30 min. Finally, for signal detection, cells were incubated with the corresponding label probe mix (LP-550 nm, Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 40 °C., Following DAPI staining, high-throughput analysis of FISH staining was performed allowing visualization of FSP-1/S100A4 transcripts and single cell analysis. Images were acquired using the ArrayScan Cellular Imaging System (64 fields per well at 20x magnification) (Thermo Fisher Scientific) followed by analysis of each cell individually using Cellomics HCS Studio software (Morphology Bio Application, Thermo Fisher Scientific). First, the cytoplasmic area of the cells was detected through CMFDA staining and the nucleus was identified through DAPI staining. After all the cytoplasm that touched the border of the picture was rejected, only cytoplasm with only one nucleus was used for analysis of FISH staining. Fluorescence spots for FSP-1/S100A4 probes were then detected within the cytoplasm and number of spots per cell was counted. FSP-1/S100A4 transcripts levels were determined for each condition in three independent experiments and each FISH assay was carried out in triplicate.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with a Student's t-test or ANOVA using GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, La Jolla California USA) with significance at $P < 0.05$.

Results

Effects of AR variants on CAF differentiation factors

We reasoned that AR variants involved in PCa progression could enhance CAF differentiation by stimulating differentiation factors. We hypothesized that prostatic tumor cells expressing AR variant upregulate the levels of differentiation factors. Therefore, expression of several CAF differentiation factors was evaluated in conditioned medium (CM) of LNCaP cells transduced with AR variants or controls. The PCa LNCaP cell line expressed significant levels of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). This factor has been reported to be involved in the generation of CAFs [30–32]. Moreover, significantly greater VEGF-A expression was observed in LNCaP cells expressing Q641X AR variant (Fig 1). Interestingly, VEGF-A expression was also enhanced in LNCaP cells transduced with AR wild type (WT) or AR-V7 variant compared to negative controls of LNCaP cells expressing empty plasmids. Surprisingly, there was no difference in VEGF-A levels between LNCaP cells transduced with AR WT and AR-V7 variant. Still, the 2.2 fold increase in both conditions was much lower than the 3.1 fold increase with Q641X AR variant, compared to the empty plasmid condition. This increase in VEGF-A mRNA levels in the Q641X AR condition was correlated with upregulation of protein secretion (S1 Fig). Taken together, these findings suggest a key role for the Q641X AR variant in expressing VEGF-A, a CAF differentiation factor.

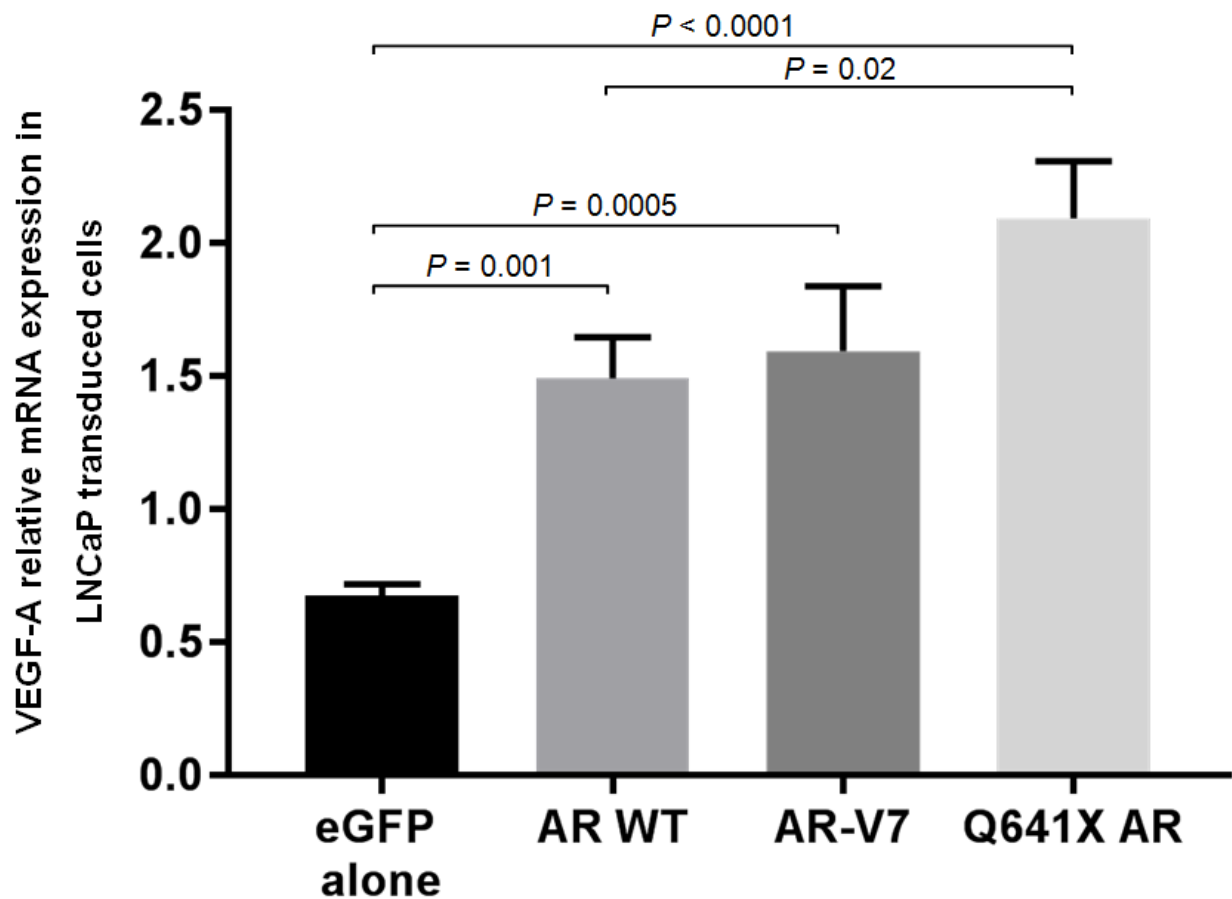


Fig 1. Quantitative expression of VEGF-A in LNCaP transduced cells. Expression of CAF differentiation factor VEGF-A increased in LNCaP cells transduced with AR WT, Q641X AR or AR-V7 variant compared to LNCaP cells transduced with eGFP alone. The increase was significantly higher in the Q641X AR condition.

Q641X AR variant promotes expression of CAF differentiation markers

To further explore the extent to which the Q641X AR variant influences CAF differentiation, we investigated whether this variant activates expression of several CAF differentiation markers in MSCs. In this context, FSP-1 (also known as S100A4), PDGFR- β , SDF-1 (also known as CXCL12) and VEGF-A [22,33] were quantitatively analyzed in MSCs incubated in conditioned medium (CM) obtained from LNCaP cells expressing the wild-type AR (AR WT CM), the constitutively active Q641X AR (Q641X AR CM) or AR-V7 variant (AR-V7 CM), or from eGFP (control CM) and fresh DMEM as controls.

As predicted, all these markers were more significantly upregulated in MSCs with Q641X AR CM. However, the expression pattern of these markers was unexpectedly different.

FSP-1, PDGFR- β and VEGF-A expression patterns were very similar. FSP-1 expression was upregulated in MSCs with Q641X AR CM compared to negative controls of MSCs in presence of DMEM culture medium, MSCs with control CM and MSCs with AR WT CM (Fig 2a). Compared with the DMEM control, upregulation of PDGFR- β and VEGF-A was observed whatever the CM analyzed (Fig 2b-c). This suggests that LNCaP cells CM can induce the expression of both markers in MSCs. However, a clearly higher level of expression was observed in the presence of Q641X AR CM compared with the controls (Fig 2a-b-c). We also observed an increase in FSP-1, PDGFR- β and VEGF-A expression in MSCs with AR-V7 CM, but the difference was not significant compared with the control CM and AR WT CM.

Conversely, SDF-1 expression was upregulated only in MSCs with Q641X AR CM, unlike all the other conditions (Fig 2d). Unexpectedly, there was no difference in SDF-1 expression between MSCs with DMEM, control CM, AR WT CM or AR-V7 CM.

Taken together, these data suggest that Q641X AR variant plays a critical role in stimulating the expression of CAF differentiation markers in MSCs.

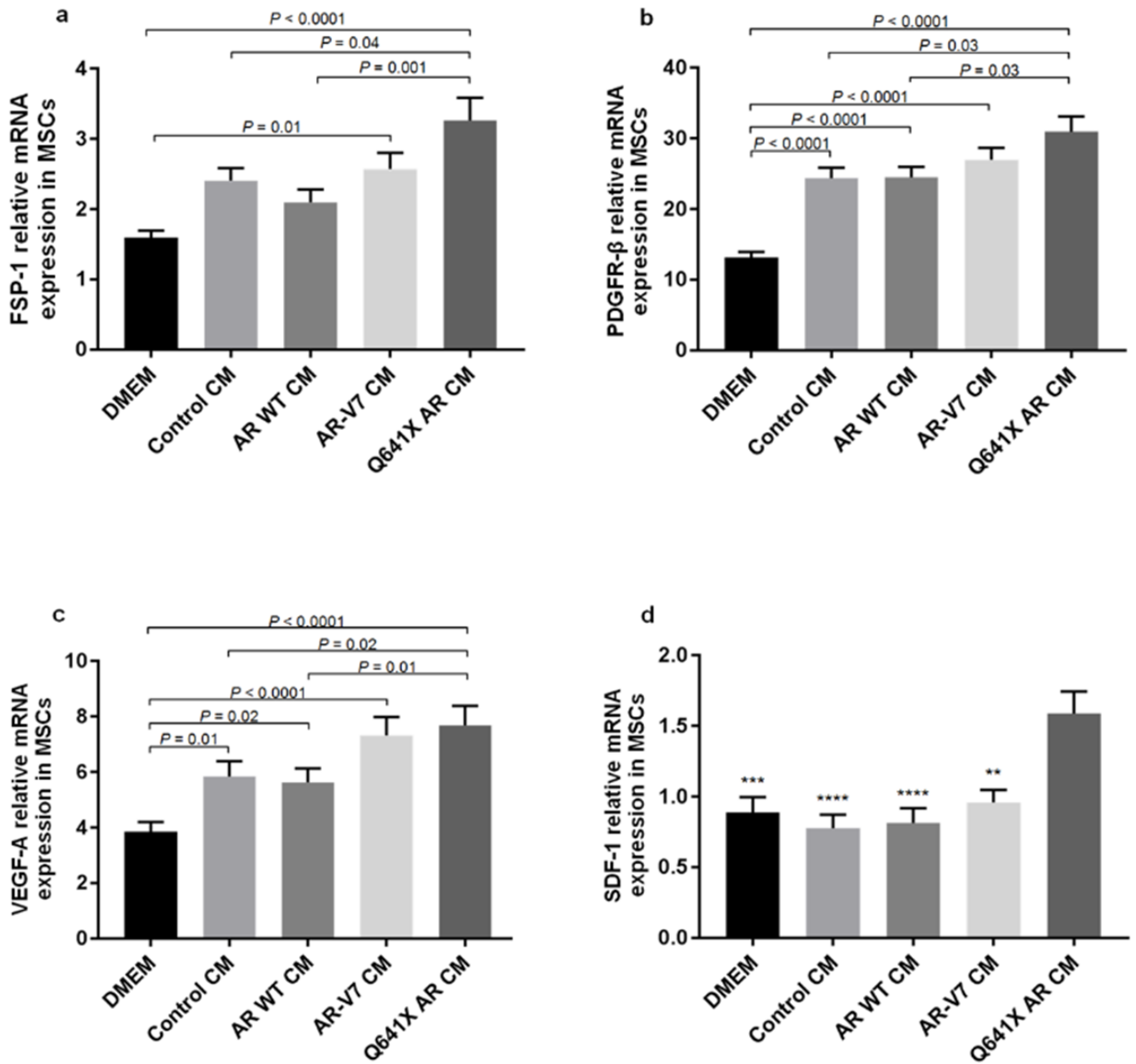


Fig 2. Quantitative expression of CAF differentiation markers in MSCs after 48 h exposure to tumor conditioned medium (CM). FSP-1 (a), PDGFR-β (b), VEGF-A (c) and SDF-1 (d) mRNA were analyzed by qPCR in MSCs. As a negative control, MSCs were in presence of DMEM culture medium only. Quantitative analyses were carried out after 48 h exposure to CM of LNCaP cells transduced with eGFP alone (control CM), with AR WT (AR WT CM), with AR-V7 variant (AR-V7 CM) or with Q641X AR variant (Q641X AR CM).

Insight into mechanisms underlying CAF differentiation

FSP-1 is a widely studied marker of CAFs and is one of the most ubiquitous markers expressed during CAF generation [24]. Consequently, in order to confirm and validate previous results, the expression of FSP-1 transcripts was analyzed using a FISH approach to allow visualization at the scale of a single cell.

As previously, MSCs were incubated in the presence of conditioned medium of LNCaP transduced cells for 48 h. FSP-1 transcripts were then analyzed in MSCs through fluorescent spots. Each cell was analyzed individually, allowing us to extract population densities in every condition. Population densities represent the percentage of cells according to the number of fluorescent spots. The higher the curve, the higher the percentage of cells. Similarly, the more the curve tends to the right, the bigger the increase in the number of fluorescent spots.

In the presence of DMEM culture medium, MSCs displayed the highest curve tending to the left (Fig 3a), meaning that the majority of cells in this condition expressed a low number of fluorescent spots for FSP-1. Curves corresponding to MSCs in presence of control CM and AR-V7 CM were lower, meaning that fewer cells in those conditions express very small numbers of fluorescence spots for FSP-1. Likewise, the curves corresponding to MSCs with AR WT and Q641X AR CM were even lower. MSCs with AR Q461X CM showed the lowest curve tending to the right. Hence, in this condition, more MSCs express an increased number of FSP-1 fluorescent spots. We nevertheless noticed that curves corresponding to MSCs with AR WT CM and Q641X AR CM did not display significant differences compared to other conditions. Therefore, FSP-1 transcripts were analyzed in each individual cell. Unexpectedly, with Q641X AR CM, there was only one peak, which mainly shifted to the right side of the graph, compared to the other conditions (Fig 3b). This result indicates that in this condition, only few MSCs express a very high number of spots. This approach also allowed us to visualize the phenomenon more precisely (Fig 3c). In fact, a small number of MSCs showed increased expression of FSP-1 transcripts among the total cell population. Importantly, this increase was significant, since we could see that majority of MSCs did not display fluorescent spots for FSP-1, or very few, while a small number of cells displayed a very large number of FSP-1 fluorescent spots. This phenomenon was observed only in MSCs in presence of Q641X AR CM.

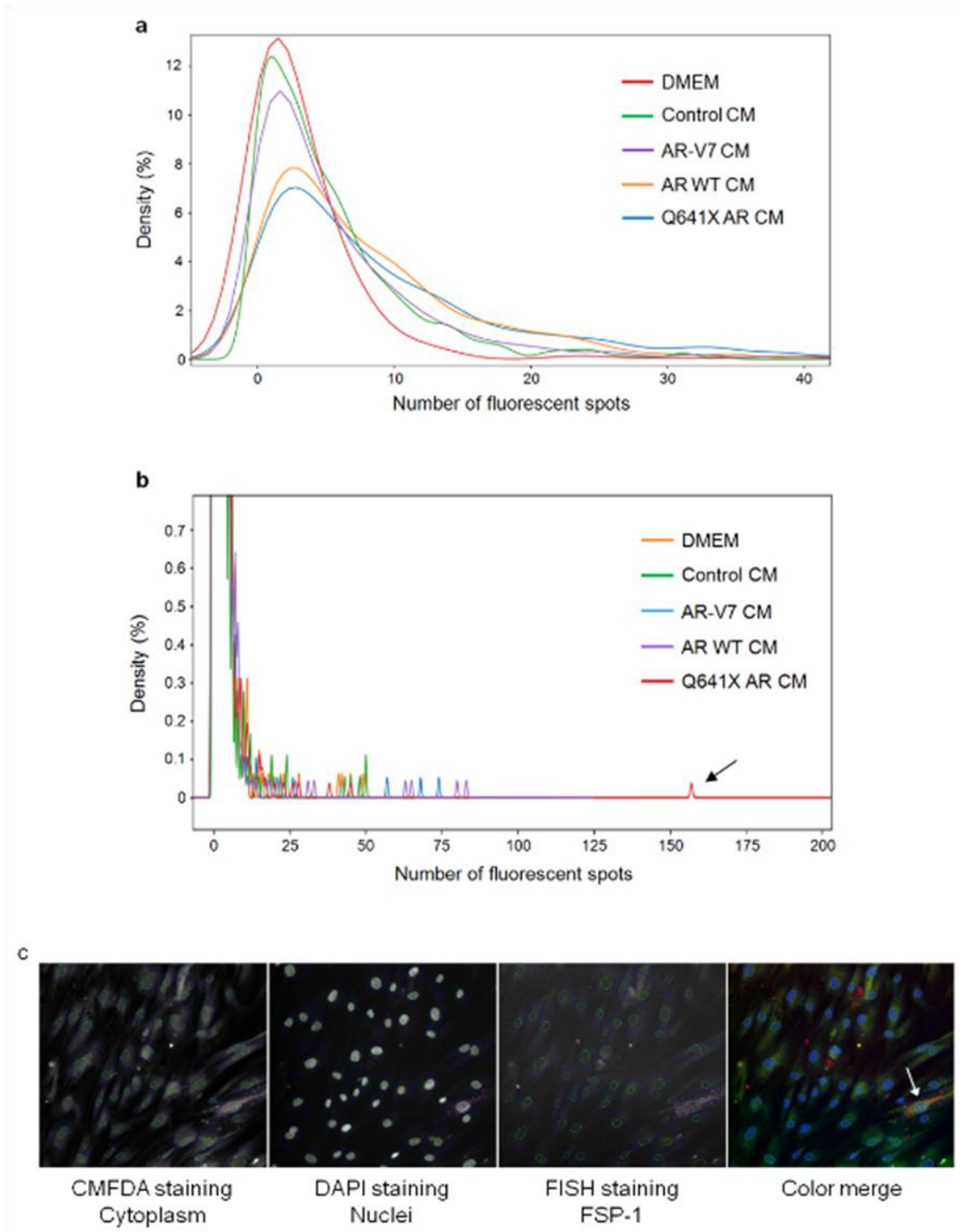


Fig 3. Visualization of FSP-1 expression, a CAF differentiation marker, in MSCs. Expression of FSP-1 transcripts was analyzed using a FISH approach in MSCs. As a negative control, MSCs were in presence of DMEM culture medium only. The FISH assay was carried out after 48 h exposure to CM of LNCaP cells transduced with eGFP alone (control CM), with AR WT (AR WT CM), with AR-V7 variant (AR-V7 CM) or with Q641X AR variant (Q641X AR CM). High throughput cell screening analysis allowed us to determine cell population densities (a-b), representing the percentage of cells expressing a given number of fluorescent spots. Single cell images were acquired (c) in order to localize and visualize MSCs with enhanced FSP-1 expression.

Discussion

Over 100 years ago, Paget et al. already underlined the importance of the tumor microenvironment with the theory of “seed & soil” [34]. More recently, a pioneering study using a PCa murine xenograft model showed that human prostate CAFs promote tumor growth by secreting factors that enhance epithelial tumor cell proliferation and mutagenesis as well as angiogenesis [35]. In fact, these secreted factors not only facilitate tumor progression of an immortalized but nontumorigenic cell, but also initiate malignant phenotypes in morphologically and genotypically normal surrounding prostatic epithelial cells. These data underline the absolute need for tumor cells to interact with the tumor microenvironment in order to progress. Interactions between the epithelium and stroma are not only mandatory for tumor progression but also for normal prostate development. Indeed, AR in the stroma plays a key role in modulating epithelial cell proliferation, survival, and differentiation in the normal developing prostate. Stromal AR is also widely involved in tumor progression by promoting growth of PCa cells [8,28,29,36]. The AR signaling pathway is essential for prostate tumor progression. The AR axis is particularly involved in castration-resistant PCa through the generation of constitutively active AR variants [5–11]. In this study we demonstrate that constitutively active AR variants, expressed by PCa cells, can have an impact on the tumor microenvironment. Our conclusions are based on the observations that Q641X AR variant increases VEGF-A expression in PCa cells. VEGF-A is a CAF differentiation factor. Its secretion by tumor cells generates CAFs [30–33].

In addition, Q641X AR variant is able to enhance expression of several CAF differentiation markers in MSCs. As CAFs derive from MSCs, these results suggest that AR Q641X stimulates the generation of CAFs. Finally, we demonstrated that CAF differentiation induced by Q641X AR variant results in a very large increase in FSP-1 expression, but only in a limited number of MSCs.

These findings are similar to previous observations showing that MSCs represent a very low percentage of the total cells present at the prostate tumor site [37]. The exact proportion of MSCs undergoing CAF differentiation remains unclear. Indeed, the status of CAFs is still the subject of debate. There is currently no specific marker that completely and exclusively defines CAFs. A precise molecular definition of CAF does not yet exist. Instead, CAFs are defined operationally, by their ability to promote tumor progression. CAFs may thus be a state rather than a cell. Nevertheless, a combination of some markers has been reported to be

specific to the acquisition of a CAF phenotype [21–27,30]. Among these, we analyzed the markers shown to increase in MSCs with Q641X AR variant. However, other characteristic markers of CAFs, for instance the α -SMA, were not expressed in our model (data not shown). These results could be explained by the emerging significant heterogeneity of CAFs. Several recent studies have provided increasing evidence for distinct subpopulations of CAFs with specific characteristics. Molecular markers of CAFs are hypothesized to be expressed differentially by these subtypes in the tumor microenvironment. Moreover, in addition to differential expression with spatial distribution, the expression of CAF markers seems to be disease stage specific [38–40]. All these recently discovered features could be explained by the fact that CAFs are derived from different types of cells, and are consequently extremely heterogeneous.

SDF-1, also known as CXCL12, is one of the CAF differentiation markers we analyzed in this study. CXCL12 is a chemokine that signals via the chemokine receptor CXCR4. The CXCL12/CXCR4 subsequent signaling axis contributes to the proliferation, survival, and invasion of cancer cells. This axis is particularly involved in the metastatic process by directing migration of cancer cells to metastasis sites [41]. Here, we showed that Q641X AR variant, expressed by PCa cells, upregulates CXCL12 expression in MSCs. Consequently, this variant is not only able to stimulate the generation of CAFs but also to promote tumor progression by favoring the CXCL12 axis.

Strikingly, the AR-V7 variant had no effect on the expression of CAF differentiation factors in PCa cells compared to AR WT condition. Neither did it have any effect on the expression of CAF differentiation markers in MSCs, compared to empty plasmid and AR WT conditions. These results suggest that this variant has no impact on the generation of CAFs. Q641X AR and AR-V7 variants are both constitutively active but do not originate from the same mutation. Hence, they do not share the same amino acid sequence at the C terminal domain. This could lead to different protein interactions and explain these differences in tumor microenvironment composition.

The present study revealed an unexpected effect of Q641X AR variant on the microenvironment. By demonstrating that this variant promotes the generation of CAFs, our results show that AR variants not only act on PCa cells (EMT), but also on the surrounding stroma. The fact that AR variants are involved in stroma corruption adds to the complexity of

castration-resistant PCa. This underlines the urgent need to take these AR variants into account in the development of novel strategies to improve tumor therapy.

Acknowledgements

Our thanks to the High Throughput Cell-based Screening Facility of IGBMC (Illkirch, France) for significant help with FISH assays.

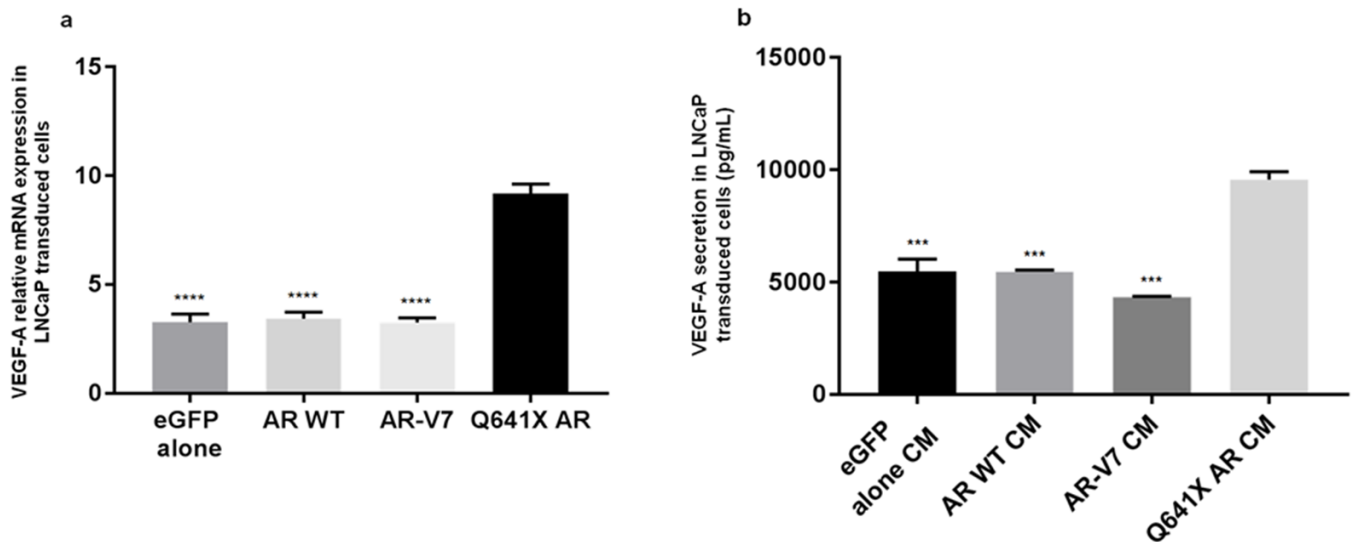
References

1. Ferlay Jacques, Soerjomataram Isabelle, Dikshit Rajesh, Eser Sultan, Mathers Colin, Rebelo Marise, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2014 Sep 13;136(5):E359–E386.
2. Wong MCS, Goggins WB, Wang HHX, Fung FDH, Leung C, Wong SYS, et al. Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. *Eur Urol*. 2016 Nov 1;70(5):862–74.
3. Wadosky KM, Koochekpour S. Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016 Sep 27;7(39):64447–70.
4. Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging Mechanisms of Resistance to Androgen Receptor Inhibitors in Prostate Cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Dec;15(12):701–11.
5. Antonarakis E, Armstrong A, Dehm S, Luo J. Androgen receptor variant-driven prostate cancer: clinical implications and therapeutic targeting. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2016 Sep;19(3):231–41.
6. Sprenger CCT, Plymate SR. The link between androgen receptor splice variants and castration resistant prostate cancer. *Horm Cancer*. 2014 Aug;5(4):207–17.
7. Cao S, Zhan Y, Dong Y. Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Dec;23(12):T199–T210.
8. Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Ther*. 2013 Dec 1;140(3):223–38.
9. Luo J, Attard G, Balk SP, Bevan C, Burnstein K, Cato L, et al. Role of Androgen Receptor Variants in Prostate Cancer: Report from the 2017 Mission Androgen Receptor Variants Meeting. *Eur Urol*. 2018 May 1;73(5):715–23.
10. Ware KE, Garcia-Blanco MA, Armstrong AJ, Dehm SM. Biologic and Clinical Significance of Androgen Receptor Variants in Castration Resistant Prostate Cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014 Aug;21(4):T87–T103.
11. Lu C, Luo J. Decoding the androgen receptor splice variants. *Transl Androl Urol*. 2013 Sep;2(3):178–86.

12. Karantanos T, Evans C, Tombal B, Thompson TC, Montironi R, Isaacs WB. Understanding the mechanisms of androgen deprivation resistance in prostate cancer at the molecular level. *Eur Urol.* 2015 Mar;67(3):470–9.
13. Luo J. Development of AR-V7 as a putative treatment selection marker for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Asian J Androl.* 2016;18(4):580–5.
14. Ciccicarese C, Santoni M, Brunelli M, Buti S, Modena A, Nabissi M, et al. AR-V7 and prostate cancer: The watershed for treatment selection? *Cancer Treat Rev.* 2016 Feb 1;43:27–35.
15. Ceraline J, Erdmann E, Erbs P, Deslandres-Cruchant M, Jacqmin D, Duclos B, et al. A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer. *Eur J Endocrinol.* 2003 Jan 1;148(1):99–110.
16. Cottard F, Asmane I, Erdmann E, Bergerat J-P, Kurtz J-E, Céraline J. Constitutively Active Androgen Receptor Variants Upregulate Expression of Mesenchymal Markers in Prostate Cancer Cells. *Culig Z, editor. PLoS ONE.* 2013;8(5):e63466.
17. Cottard F, Madi-Berthélémy PO, Erdmann E, Schaff-Wendling F, Keime C, Ye T, et al. Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer. *Oncotarget.* 2017 Sep;8(42):72008–20.
18. Sun F, Chen H, Li W, Yang X, Wang X, Jiang R, et al. Androgen Receptor Splice Variant AR3 Promotes Prostate Cancer via Modulating Expression of Autocrine/Paracrine Factors. *J Biol Chem.* 2014 Jan 17;289(3):1529–39.
19. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013 Nov 7;19:1423.
20. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 2015 Nov 1;368(1):7–13.
21. Han Y, Zhang Y, Jia T, Sun Y. Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts. *Tumor Biol.* 2015 Mar 1;36(3):1385–94.
22. LeBleu VS, Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech.* 2018 Apr 1;11(4):dmm029447.
23. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016 Aug 23;16:582.
24. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med.* 2014 Jul 28;211(8):1503–23.
25. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Lin H-J, editor. Cancers.* 2015 Dec;7(4):2443–58.
26. Jung Y, Kim JK, Shiozawa Y, Wang J, Mishra A, Joseph J, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat Commun.* 2013 Apr 30;4:1795.
27. Tao L, Huang G, Song H, Chen Y, Chen L. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. *Oncol Lett.* 2017 Sep;14(3):2611–20.
28. Wen S, Chang H-C, Tian J, Shang Z, Niu Y, Chang C. Stromal Androgen Receptor Roles in the Development of Normal Prostate, Benign Prostate Hyperplasia, and Prostate Cancer. *Am J Pathol.* 2015 Feb 1;185(2):293–301.

29. Singh M, Jha R, Melamed J, Shapiro E, Hayward SW, Lee P. Stromal Androgen Receptor in Prostate Development and Cancer. *Am J Pathol*. 2014 Oct 1;184(10):2598–607.
30. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res*. 2011;1(4):482–97.
31. Takebe Naoko, Ivy Percy, Timmer William, Khan Nadia, Schulz Timothy, Harris Pamela Jo. Review of Cancer – Associated Fibroblasts and Therapies that Interfere with Their Activity. *Tumor Microenviron Ther*. 2013;1:19.
32. Shen H, Yu X, Yang F, Zhang Z, Shen J, Sun J, et al. Reprogramming of Normal Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts by miRNAs-Mediated CCL2/VEGFA Signaling. Augsten M, editor. *PLoS Genet*. 2016 Aug;12(8):e1006244.
33. Arena S, Salati M, Sorgentoni G, Barbisan F, Orciani M. Characterization of tumor-derived mesenchymal stem cells potentially differentiating into cancer-associated fibroblasts in lung cancer. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2018 May 23; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1894-4>
34. Paget S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *Orig Publ Vol 1 Issue 3421*. 1889 Mar 23;133(3421):571–3.
35. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium. *Cancer Res*. 1999 Oct 1;59(19):5002.
36. Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol*. 2004;67(5):417–34.
37. Brennen WN, Chen S, Denmeade SR, Isaacs JT. Quantification of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) at Sites of Human Prostate Cancer. *Oncotarget*. 2013 Jan;4(1):106–17.
38. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvise M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med* [Internet]. 2017 Feb 23; Available from: <http://jem.rupress.org/content/early/2017/02/23/jem.20162024.abstract>
39. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013 Sep 18;501:346.
40. Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2018 Mar 12;33(3):463–479.e10.
41. Sun Y, Mao X, Fan C, Liu C, Guo A, Guan S, et al. CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumour Biol*. 2014 Aug;35(8):7765–73.

Supporting information



S1 Fig. VEGF-A expression in LNCaP transduced cells. (a) Quantitative expression of VEGF-A in LNCaP cells transduced with AR-WT, Q641X AR or AR-V7 variant compared to LNCaP cells transduced with eGFP alone showed a significant increase in Q641X AR condition. LNCaP transduced cells were placed in serum free medium (without red phenol) with 10 nM DHT and 20 ng/mL Doxycycline, for 72 h.

These results were confirmed at protein level through analysis of VEGF-A secretion by ELISA (Human VEGF Quantikine, ELISA Kit, R&D Systems) in conditioned medium (CM) of these LNCaP transduced cells. (b). CM was harvested from LNCaP transduced cells in presence of serum free medium (without red phenol) with 10 nM DHT and 20 ng/mL Doxycycline, for 72 h.

Ces résultats ont permis de démontrer un impact positif du variant RA Q641X sur la corruption du stroma tumoral à travers la différenciation des MSCs en CAFs, du fait de l'augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation en CAFs au niveau de MSCs mises en présence de ce variant. Confirmant ces résultats, le variant RA Q641X a été démontré comme étant capable d'induire une sécrétion plus importante du facteur de différenciation VEGF, impliqué dans la différenciation des MSCs en CAFs, au niveau des cellules tumorales. De façon surprenante, le variant RA-V7 n'a démontré aucun impact sur l'expression de tous les marqueurs de différenciation étudiés, ainsi que sur le facteur de différenciation VEGF, suggérant une spécificité d'action des différents variants du RA. Enfin, nous avons pu mettre en évidence le fait que les MSCs subissant une différenciation en CAFs ne représentent qu'un nombre restreint de cellules.

Au vue du faible pourcentage de MSCs différenciées en CAFs, tout en sachant que le microenvironnement tumoral est un compartiment très hétérogène et dynamique, il semblerait que les études réalisées *in vitro* ne permettent pas de modéliser totalement et de façon adéquate ce stroma tumoral. De ce fait, un modèle murin a été mis au point et constitue la 2^{ème} partie de mon projet de thèse.

PARTIE II : MODÈLE MURIN

Afin de développer les résultats précédemment obtenus, un modèle murin a été mis au point, permettant ainsi d'étendre l'étude dans un contexte plus large et plus approprié aux interactions cellulaires ayant lieu entre les cellules tumorales et le microenvironnement avoisinant. Pour ce faire, l'expression de la protéine FAP a été analysée *in vivo* chez des souris exprimant, ou non, un variant du RA de façon orthotopique. L'expression de la protéine FAP a été démontrée comme étant spécifique d'un contexte inflammatoire chronique. En effet, 90 % des CAFs des tumeurs épithéliales surexpriment cette protéine, alors que les cellules tumorales épithéliales quant à elles ne semblent pas exprimer FAP. Son expression est donc fortement augmentée et restreinte au site tumoral, en particulier au niveau du stroma tumoral (302–305).

L'étude de FAP a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal couplé au technétium, permettant ainsi une visualisation de l'expression de la protéine par tomographie par émission monophotonique (SPECT). La production de l'anticorps monoclonal a été supervisée par Mustapha Oulad-Abdelghani, dans le cadre d'une collaboration établie avec le service de production d'anticorps monoclonaux de l'IGBMC. De même, les expériences *in vivo* ont pu être effectuées grâce à une collaboration mise en place avec l'équipe Imagerie Moléculaire du Département Radiobiologie, Hadronthérapie et Imagerie Moléculaire de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, CNRS UMR 7178.

1) Production de l'anticorps

L'anticorps monoclonal ciblant la protéine FAP a été produit à partir d'un peptide synthétique dont la séquence contient 17 acides aminés, à savoir ¹⁶⁸NNIYLKQRPGDPPFQIT¹⁸⁴ ([NM_004460.4](#)). Ce peptide synthétique correspondant à une partie du domaine extracellulaire de la protéine FAP a été injecté à la souris. La production sous-jacente d'anticorps par l'animal a conduit à la production d'hybridomes. Plusieurs clones d'hybridomes ont ainsi été testés par ELISA afin de sélectionner les clones présentant une grande affinité contre l'antigène.

Par la suite, les clones présentant une grande affinité ont été analysés par immunofluorescence de manière à distinguer le clone possédant la plus haute affinité. Ce dernier ayant ensuite été purifié puis concentré, l'anticorps final a été obtenu à une concentration de 10 mg/mL.

- Immunofluorescence

La protéine FAP n'est pas exprimée par les tissus sains. Son expression est restreinte aux sites subissant un remodelage cellulaire suite à une blessure notamment. Ainsi, les MSCs étant impliquées dans la régénération de plusieurs tissus dans un contexte physiologique, celles-ci expriment FAP (306). Afin de tester l'anticorps par immunofluorescence sur les MSCs exprimant FAP, des MSCs en labteks ont été fixées pendant 20 min avec du paraformaldéhyde à 2 %. Elles ont ensuite été perméabilisées et bloquées dans une solution de PBS/BSA 1 %/TritonX100 0,1 % 30 min à température ambiante. Les MSCs ont par la suite été incubées toute une nuit à 4°C avec les surnageants de 7 clones d'hybridomes de FAP, ou avec un isotype de souris (IgG1 κ , clone MOPC 21, Sigma-Aldrich). Les surnageants et l'isotype ont été préalablement dilués au 1/500^{ème} dans du tampon de blocage. Le lendemain, les MSCs ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488 à 2 $\mu\text{g/mL}$ (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Life Technologies). Après 1 h d'incubation à température ambiante et dans l'obscurité, les MSCs ont été incubées avec 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de solution DAPI pendant 20 min à 30°C. Après montage, les observations ont été faites au microscope à fluorescence Leica DM5500 B à l'aide d'une caméra Leica DFC365FX. Les images ont été acquises grâce au logiciel Leica LAS AF, au grossissement x 10, et ont permis d'opter pour le clone n°7 (Fig. 42).

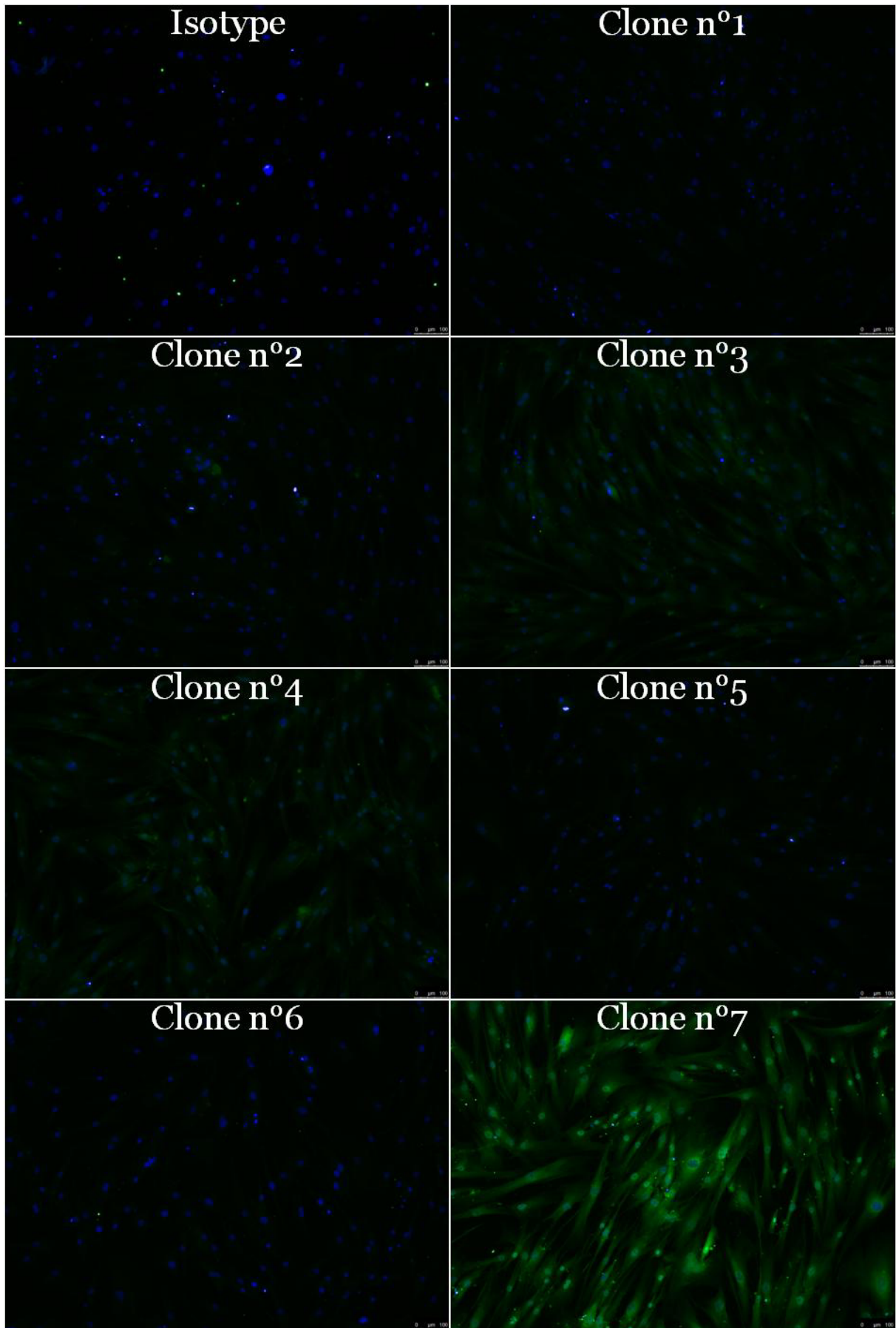


Figure 42 : Immunofluorescence de MSCs ayant été mises en présence de 7 surnageants de clones d'hybridome pour FAP, ou d'un isotype.

2) Couplage de l'anticorps

L'anticorps monoclonal ciblant la protéine FAP ayant ainsi été produit, il a par la suite été couplé à des molécules S-HYNIC (succinimidyl-hydrazinonicotinamide), permettant la fixation du technétium, et *in fine* la réalisation d'imagerie SPECT.

Le technétium est un élément radioactif de numéro atomique 43 ne possédant pas d'isotope stable. L'isotope correspondant, le technétium métastable 99 (^{99m}Tc), est l'isotope le plus utilisé en médecine nucléaire du fait de ses propriétés idéales pour la réalisation de diagnostics par imagerie SPECT, permettant ainsi une haute sensibilité de détection. La désintégration du technétium métastable 99 en technétium 99 émet un rayonnement γ par l'émission d'un photon γ . Sa période de demi-vie étant de 6 h, il est produit à l'aide d'un générateur de technétium par désintégration β du molybdène 99 (307–309). Les expériences de couplage ont été réalisées par Ali Ouadi, chimiste à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, selon la méthode d'Abrams et al. (310). Les molécules S-HYNIC réagissent avec les groupements amines libres des résidus lysines des anticorps et peuvent donc former des liaisons hydraziniques stables. De ce fait, un mix de molécules S-HYNIC et d'anticorps a subi un temps d'agitation de 2 h à température ambiante dans un tampon borate à pH 8,5. Le couplage se faisant généralement par méthode indirecte, l'anticorps ainsi lié aux molécules S-HYNIC a par la suite été purifié par centrifugation (seuil de coupure de 30 kDa). Dans un deuxième temps, le couplage au technétium a été réalisé en utilisant les propriétés chimiques selon lesquelles le technétium est chélaté en présence d'un agent réducteur, comme le chlorure d'étain, par un ligand faible, à savoir la tricine, qui constitue donc le co-ligand. Par conséquent, le technétium et la tricine sont mélangés et ajoutés aux anticorps couplés aux molécules S-HYNIC, puis le technétium se lie par transmétallation aux molécules S-HYNIC et à la tricine, permettant ainsi la liaison des anticorps au technétium (Fig. 43).

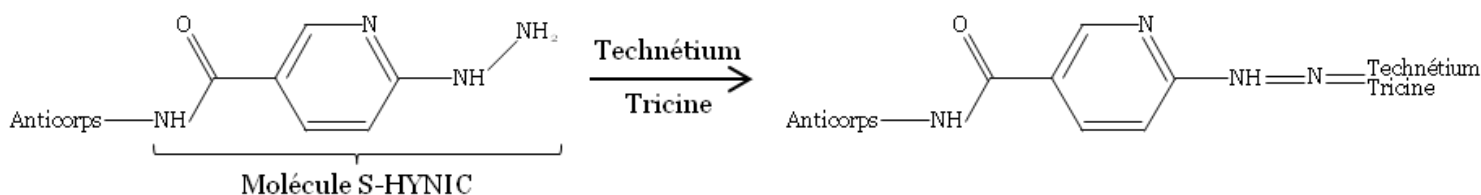


Figure 43 : Structure du complexe Anticorps / S-HYNIC / Technétium.

Afin de vérifier l'efficacité du couplage aux molécules S-HYNIC, l'anticorps couplé a été analysé par spectrométrie de masse à la Plateforme de Protéomique de l'IGBMC. Les résultats ont permis de mettre en évidence un bon rendement de couplage avec une approximation d'environ 7 à 8 molécules S-HYNIC couplées par anticorps, et ce essentiellement sur les chaînes lourdes.

De manière à contrôler que le couplage n'ait pas affecté l'immunoréactivité de l'anticorps, les mêmes expériences d'immunofluorescence que lors de la production de l'anticorps ont été réalisées sur les MSCs. Les MSCs ont été mises en présence d'un isotype ou de l'anticorps couplé, dilués au 1/1000^{ème} dans du tampon de blocage. Après révélation à l'aide de l'anticorps secondaire, les cellules ont été observées et les images prises au grossissement x 20. Les résultats ont permis de confirmer que l'immunoréactivité de l'anticorps ciblant FAP n'a pas été modifiée par l'ajout de molécules S-HYNIC (Fig. 44).

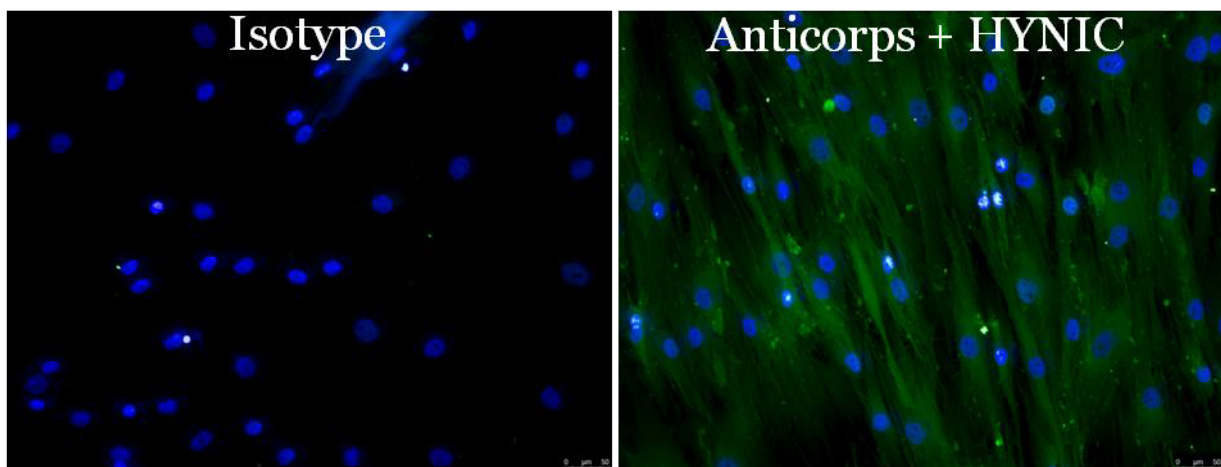


Figure 44 : Immunofluorescence de MSCs incubées avec un isotype ou avec de l'anticorps anti-FAP couplé à des molécules S-HYNIC.

3) Expérimentations animales

Préalablement aux expériences impliquant l'anticorps couplé au technetium ainsi que l'imagerie SPECT, des expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer la cinétique de pousse tumorale. Pour ce faire, des xénogreffes de cellules LNCaP exprimant un plasmide vide ont été réalisées de façon orthotopique, dans la prostate de souris *Swiss Nude* (311). Le geste chirurgical a été effectué selon les instructions transmises par le Pr. Bernard Malavaud, chirurgien onco-urologue à l'IUCT Oncopole de Toulouse. Le suivi du poids des souris, associé à une surveillance régulière de leur état général, et à une palpation abdominale, ont permis de déterminer que la croissance tumorale était optimale en moyenne à 7 semaines suivant l'injection. Ces données ont été confirmées par la prélèvement des tumeurs chez les souris ayant atteint un point limite, à la fin de l'expérience.

Une fois l'anticorps mis au point et couplé aux molécules S-HYNIC, 1 million de cellules LNCaP transduites avec le RA sauvage, le variant RA Q641X, ou le variant RA-V7, ont été injectées dans chaque lobe dorsal de la prostate des souris. Les souris ont donc été injectées avec un total de 2 millions de cellules LNCaP transduites. Afin de déterminer la dose optimale de doxycycline, plusieurs doses ont été testées, par administration 2 fois par semaine dans l'eau de boisson des souris, selon le protocole suivant (Fig. 45).

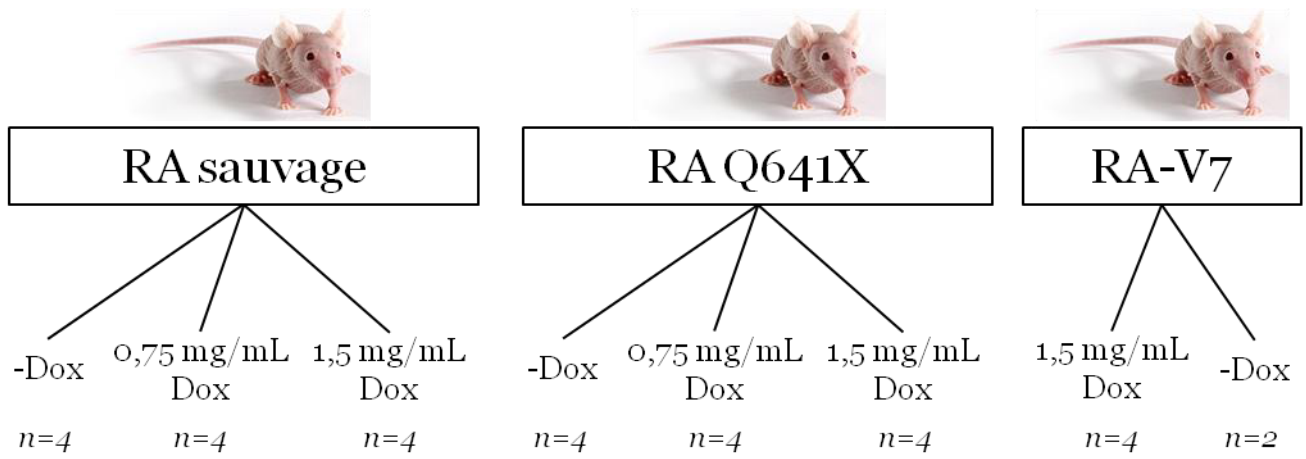


Figure 45 : Représentation schématique du protocole expérimental *in vivo*.

Trois groupes ont été constitués correspondant à des souris injectées avec des cellules LNCaP exprimant le RA sauvage, le variant RA Q641X, ou le variant RA-V7. Dans ces 3 groupes, différents sous-groupes ont été constitués correspondant à différentes doses de doxycycline (Dox). Pour les groupes RA sauvage et RA Q641X, 3 sous-groupes ont été établis, à savoir un sous-groupe sans traitement à la dox, un sous-groupe traité avec 1,5 mg/mL de dox, et un sous-groupe traité avec 0,75 mg/mL de dox. Le groupe RA-V7 ne contient que 2 sous-groupes, un sous-groupe sans traitement à la dox, et un sous-groupe traité avec 1,5 mg/mL de dox. Tous les sous-groupes contiennent un nombre d'individus $n = 4$, sauf le sous-groupe RA-V7 sans traitement qui ne contient que $n = 2$ individus.

Sept semaines suivant l'injection de cellules LNCaP transduites, pendant lesquelles les traitements \pm dox ont été appliqués, les souris ont été imagées par SPECT. Pour ce faire, l'anticorps couplé aux molécules S-HYNIC a été couplé au technétium puis 10 MBq de celui-ci ont été directement injectés dans la veine de la queue des souris. Le volume injecté a été ajusté (50 μ L à 120 μ L) afin de maintenir constante la quantité de radioactivité. Les souris ont ensuite été imagées par SPECT 2 h après l'injection. Les acquisitions d'images ont été effectuées en utilisant le système d'imagerie multimodal développé à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (312). Les images obtenues ont par la suite été traitées et analysées à l'aide du logiciel BrainVISA / Anatomist 4.5.0. À la fin des acquisitions d'images, les souris ont été sacrifiées afin de récupérer les tumeurs. Lors de la présence d'une tumeur, celle-ci a été scindée en 2, et une moitié a été immergée dans du paraformaldéhyde 4 %, à des fins d'analyses immunohistologiques, tandis que l'autre moitié a été immédiatement congelée dans de l'azote liquide, dans le but d'extraire des ARNs et de les analyser par

RT-PCR quantitative. En absence de tumeur, la prostate a tout de même été récupérée et séparée en 2 échantillons traités comme précédemment.

Plusieurs souris sont décédées dans différents groupes avant d'avoir pu être analysées par imagerie SPECT. En effet, antérieurement à l'imagerie, 3 souris sont décédées dans le groupe RA Q641X 1,5 mg/mL Dox, 2 souris sont décédées dans le groupe RA Q641X -Dox, 1 souris dans le groupe RA Q641X 0,75 mg/mL Dox, et 1 souris dans le groupe RA-V7 -Dox. Le groupe de souris injecté avec des cellules LNCaP exprimant le RA sauvage n'a subi aucune perte. De façon surprenante, 2 souris ont présenté des tumeurs dans le sous-groupe non traité à la Dox, alors qu'une seule souris présentait une tumeur dans le sous-groupe 0,75 mg/mL, ainsi que dans le sous-groupe 1,5 mg/mL (Tableau 5). Ainsi, les différents groupes ne comprenant plus le même nombre d'individus, les données obtenues n'ont donc pas pu être interprétées totalement.

	Pas de tumeur	Petite tumeur ($\varnothing < 0,3\text{mm}$)	Tumeur moyenne ($0,3\text{mm} < \varnothing < 0,8\text{mm}$)	Grosse tumeur ($\varnothing > 0,8\text{mm}$)	
1	●				RA sauvage -Dox
2				●●●	
3		●			
4	●				
5			●●		RA sauvage 0,75 mg/mL Dox
6	●				
7	●				
8	●				
9	●				RA sauvage 1,5 mg/mL Dox
10		●			
11	●				
12	●				
13				●●●	RA Q641X -Dox
14	●				
15	●				RA Q641X 0,75 mg/mL Dox
16			●●		
17		●			
18			●●		RA Q641X 1,5 mg/mL Dox
19	●				RA-V7 -Dox
20	●				RA-V7 1,5 mg/mL Dox
21	●				
22				●●●	
23			●●		

Tableau 5 : Récapitulatif des tumeurs trouvées ou non, suite à l'euthanasie, dans les différents sous-groupes de souris.

Concernant les résultats d'imagerie SPECT, ceux-ci sont nuancés. Il s'avère que l'anticorps marqué au technétium a été fortement retenu dans la vessie des souris, induisant une difficulté de visualisation du fait de la localisation de la prostate, en arrière de la vessie (Fig. 46).

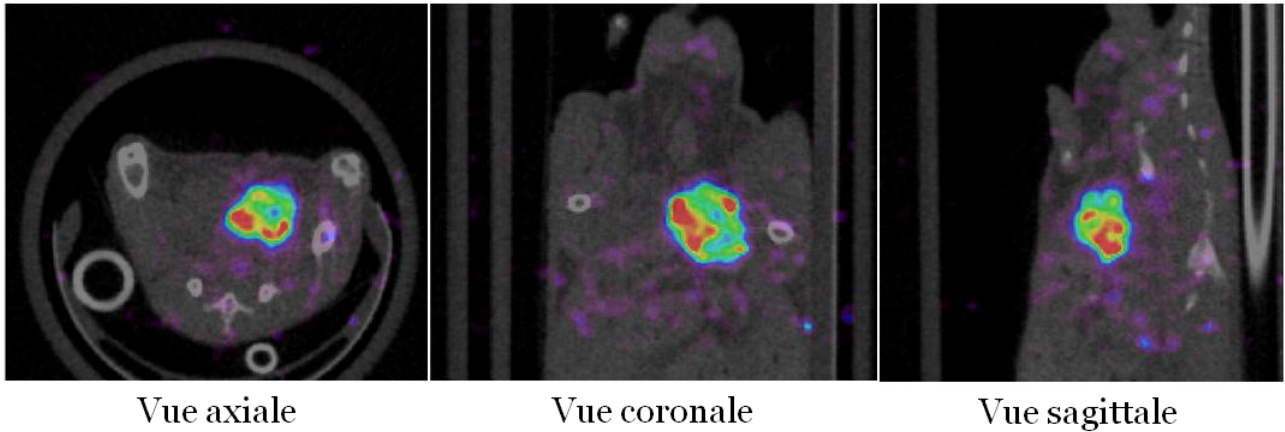


Figure 46 : Exemple d'images représentant un piégeage de l'anticorps par la vessie dans une souris n'ayant aucune tumeur mais dont la vessie est pleine (souris n°11).

De plus, plusieurs souris présentant une tumeur de diamètre élevé, mais très nécrotique, n'ont pas présenté de signal strictement significatif à l'imagerie. Pour exemple, la souris n°2 présentant une tumeur fortement nécrotique de plus de 1 cm de diamètre n'a montré qu'un signal faible en imagerie SPECT, par rapport à la taille de la tumeur (Fig. 47).

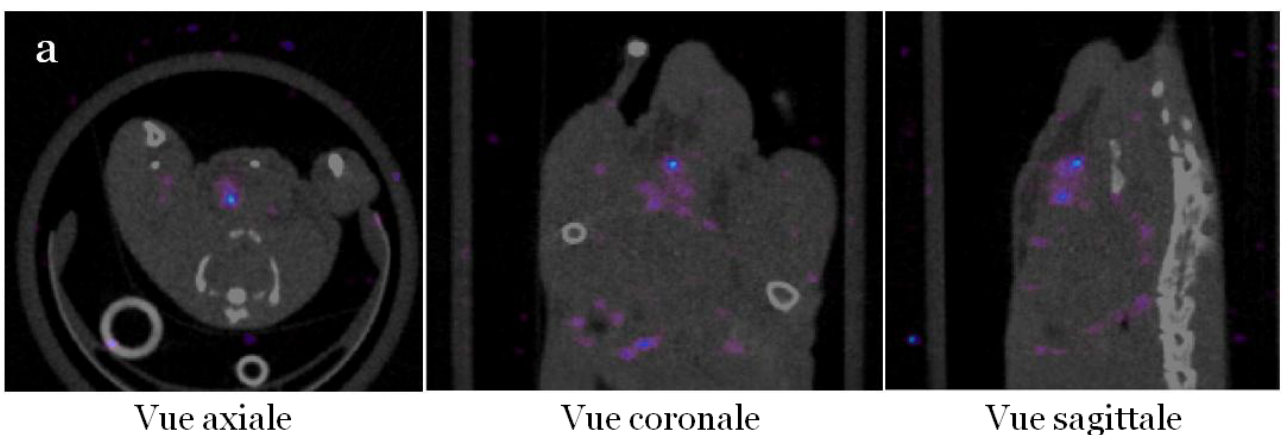


Figure 47 : Imagerie SPECT (a) et macroscopique (b) de la souris n°2 présentant une large tumeur nécrotique.



De même, la souris n°13 a présenté une tumeur très nécrotique de plus de 8 mm de diamètre et le signal mis en évidence à l'imagerie SPECT est très faible (Fig. 48).

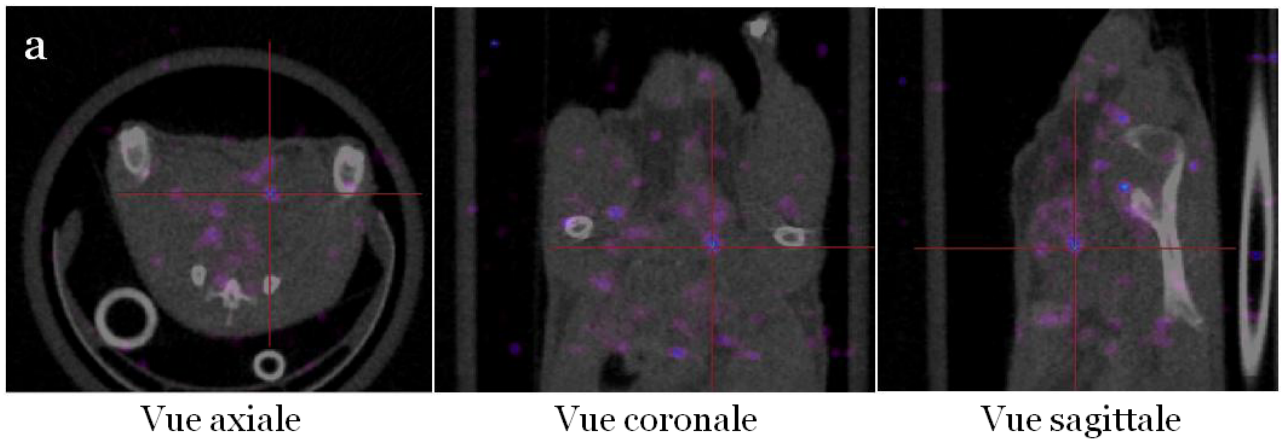
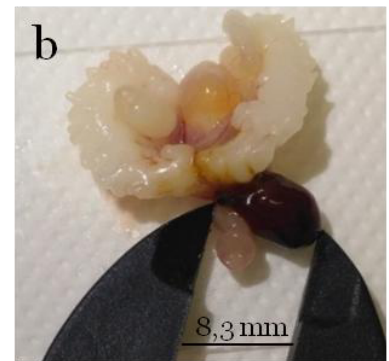
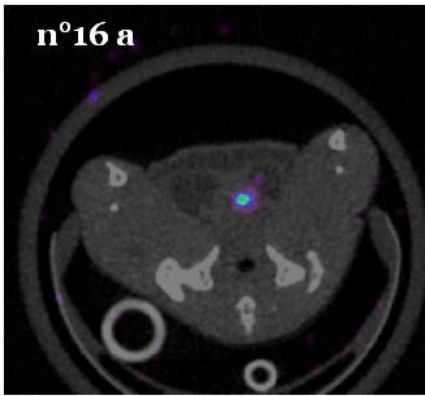


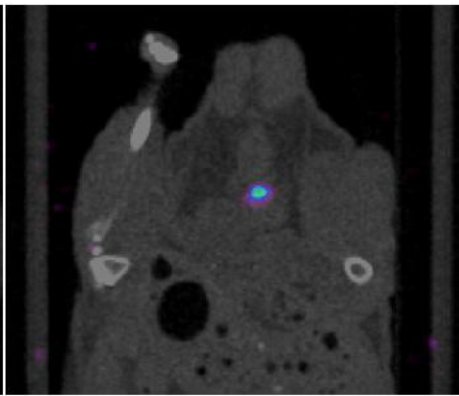
Figure 48 : Imagerie SPECT (a) et macroscopique (b) de la souris n°13 portant une large tumeur nécrotique.



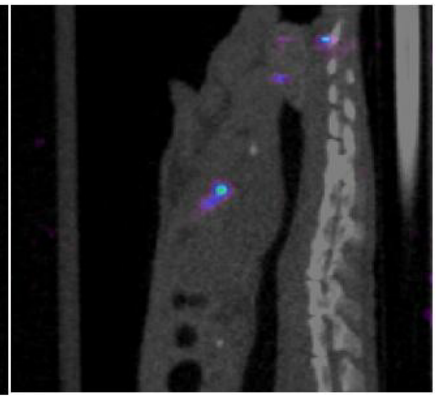
À l'inverse, les souris ayant une tumeur peu nécrosée ont présenté un signal en imagerie SPECT semblant être représentatif de la tumeur observée post-euthanasie. C'est le cas des souris n° 16, 18, et 22. Ces souris correspondent respectivement aux conditions RA Q641X 0,75 mg/mL, RA Q641X 1,5 mg/mL, et RA-V7 1,5 mg/mL (Fig. 49).



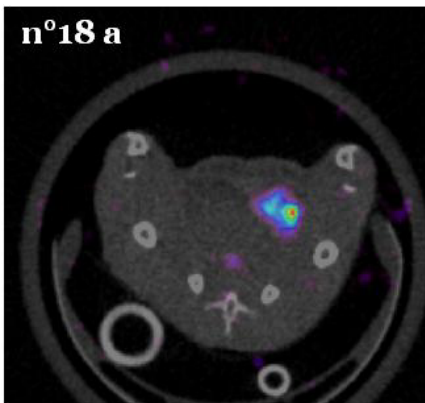
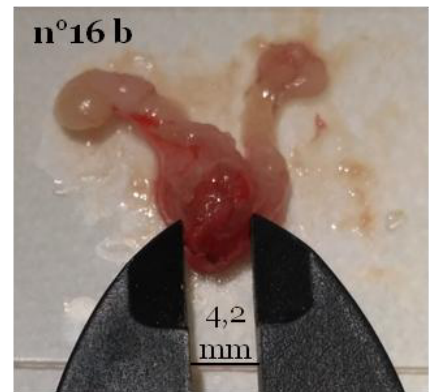
Vue axiale



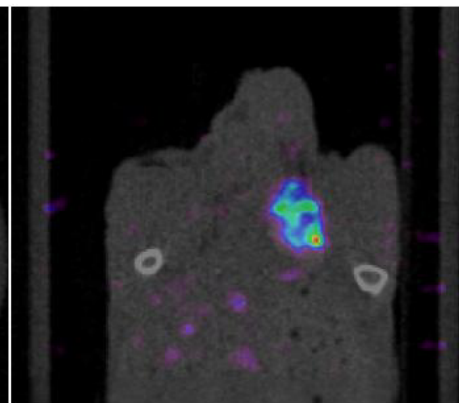
Vue coronale



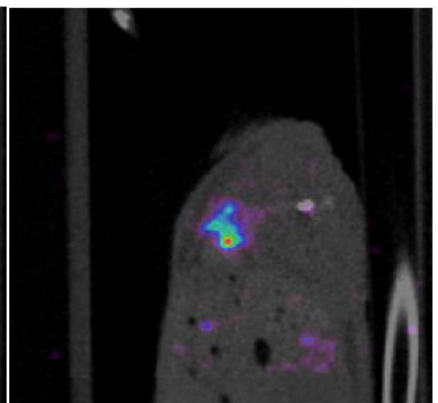
Vue sagittale



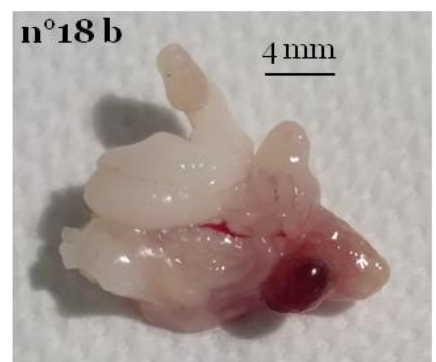
Vue axiale



Vue coronale



Vue sagittale



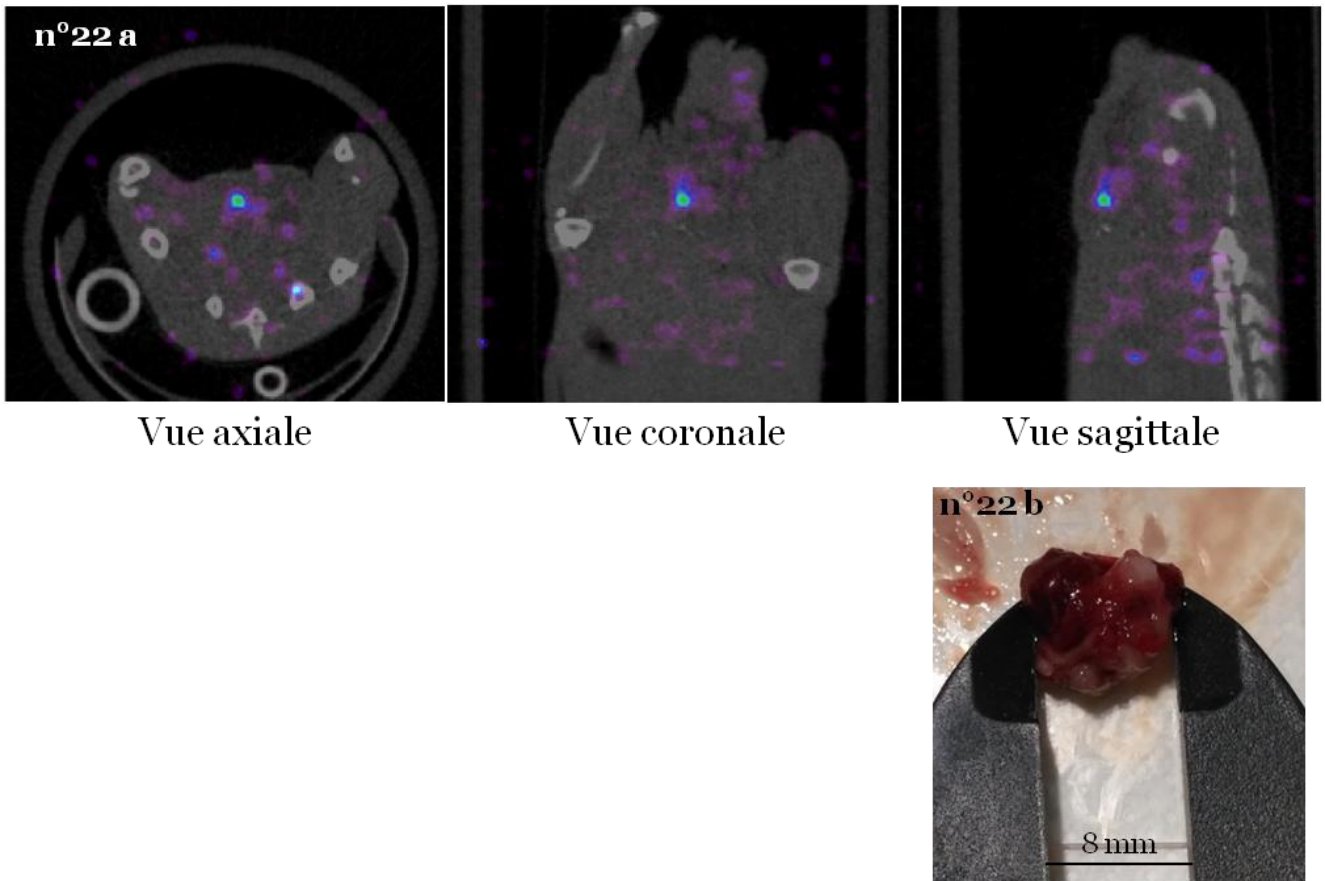


Figure 49 : Imagerie SPECT (a) et macroscopique (b) des souris n°16, 18, et 22. Ces souris ont présenté une tumeur peu nécrotique.

Suite à ces études d'imagerie par SPECT, des analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur les tumeurs extraites afin d'y étudier l'expression de la GFP ainsi que de la protéine FAP. De façon surprenante, aucun résultat n'a été obtenu malgré l'application de plusieurs protocoles différents. De même, aucun signal n'a été visible lors de l'analyse de l'expression du Ki67. Au vue de ces résultats, un marquage hématoxyline-éosine a été réalisé et a permis de mettre à jour un fort pourcentage de nécrose dans la quasi-totalité des échantillons. En effet, les tissus présentent entre 50 et 90 % de nécrose en fonction des échantillons (Fig. 50).

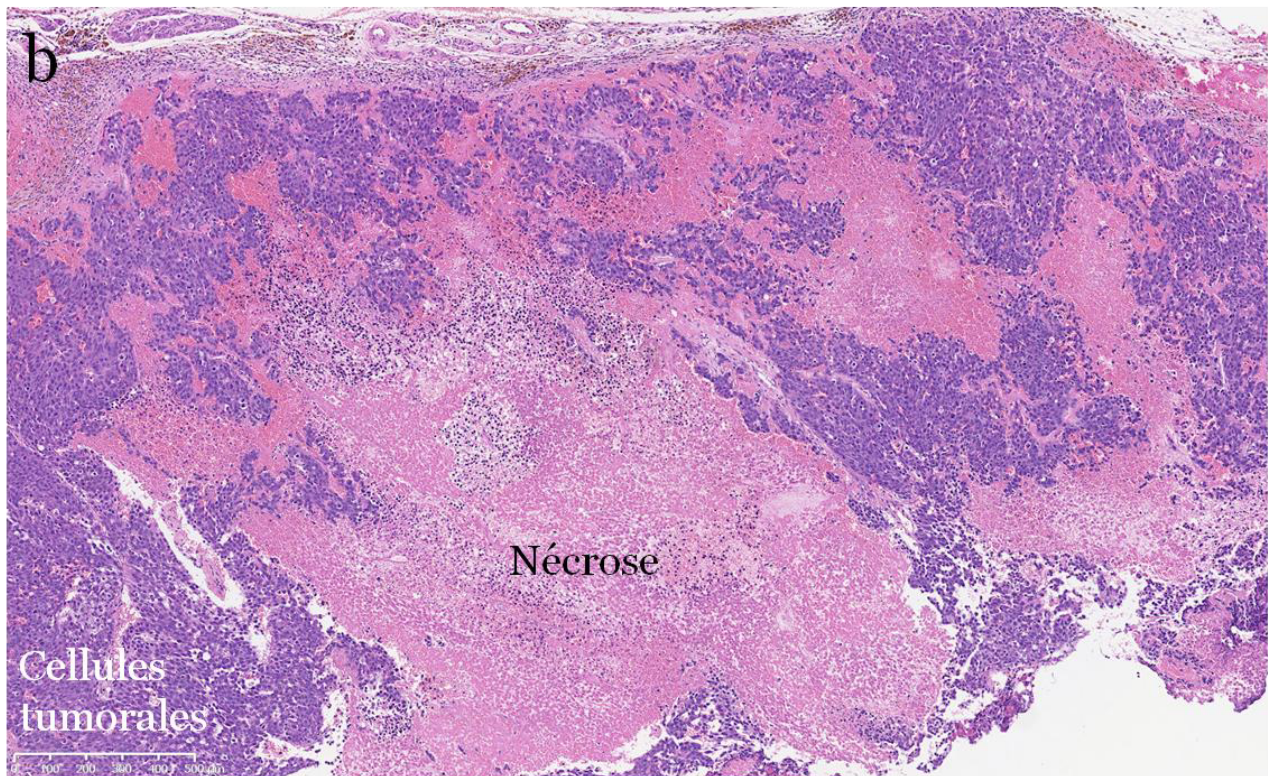
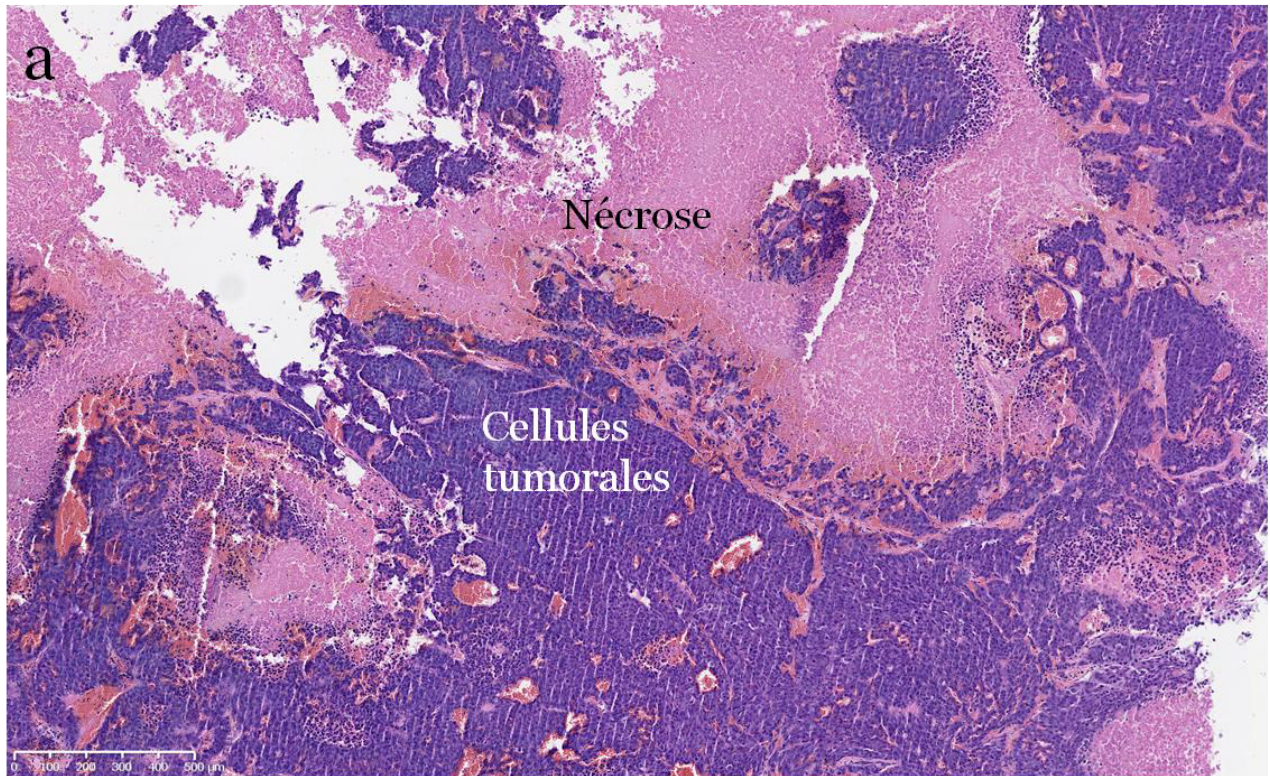


Figure 50: Analyse hématoxyline éosine des souris n° 2 (a) et 13 (b) (grossissement x5). La nécrose est représentée par le tissu rose, les cellules tumorales sont colorées en violet foncé.

La nécrose tissulaire est donc un biais ayant fortement entravé cette étude. De plus, les analyses hématoxyline éosine nous ont tout de même permis de visualiser des champs contenant de fortes concentrations de cellules tumorales (Fig. 50). Aucun immunomarquage n'ayant fonctionné malgré cela, il est fort probable que le protocole de fixation tissulaire utilisé n'ait pas été suffisant. Par conséquent, les analyses devront être poursuivies à partir des échantillons congelés.

Pour conclure, bien que les résultats de cette étude soient préliminaires, ils permettent néanmoins de valider la mise au point d'une nouvelle approche d'étude du microenvironnement tumoral *in vivo*. En effet, les données issues des images des souris dont les tumeurs ne sont qu'en partie nécrosées sont encourageantes et laissent à penser que le marquage ciblant la protéine FAP, et plus largement le stroma tumoral, est spécifique. Pour autant, il n'a pas été possible de déterminer les effets des variants du RA sur l'expression de FAP et le microenvironnement tumoral *in vivo*. Les analyses immunohistologiques ayant révélé une forte nécrose dans un certain nombre de tumeurs, il semblerait que la cinétique tumorale utilisée pour cette étude soit trop longue. De même, le mode d'administration de la doxycycline, dans l'eau de boisson des souris, utilisée pour induire l'expression des transgènes dans les cellules LNCaP greffées, paraît induire un biais. Qui plus est, au vue du nombre de souris perdues en amont des analyses d'imagerie, la quantité d'individus utilisée dans chaque sous-groupe lors des expériences semble clairement insuffisante. Enfin, la demi-vie du technétium étant faible, il n'a pas été possible de laisser l'anticorps couplé opérer sur une période assez longue afin d'éliminer le bruit de fond observé dans la vessie, empêchant la visualisation pertinente de la prostate située juste derrière.

Il serait donc judicieux de reproduire ces expériences en changeant un certain nombre de paramètres afin d'améliorer le modèle. L'utilisation d'une plus large cohorte d'animaux, associée à une technique de gavage pour l'administration de la doxycycline, seraient sans doute plus appropriées. De même, l'utilisation d'un élément radioactif présentant une demi-vie plus longue, combinée à une cinétique tumorale plus courte, ainsi que l'utilisation d'un protocole de fixation tissulaire plus adéquat, aboutiraient probablement à une amélioration des résultats.

In fine, ce modèle permettra d'étudier les effets des variants du RA sur le microenvironnement tumoral à travers l'étude de l'expression de la protéine FAP.

DISCUSSION

À l'heure actuelle, le CaP à un stade localement avancé ou métastatique reste une maladie à l'issue invariablement létale du fait de la résistance aux hormonothérapies. De fait, la compréhension des mécanismes impliqués dans cette résistance à la castration constitue un enjeu majeur afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'un CaP à un stade avancé. L'axe de signalisation du RA étant fortement impliqué dans ce phénomène de résistance à la castration, la découverte et la caractérisation de variants constitutivement actifs du RA a constitué une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes sous-jacents. En conséquence, le variant constitutivement actif RA Q641X, mis en évidence et caractérisé au laboratoire, a été démontré comme étant responsable de la résistance à la castration et grandement impliqué dans la progression tumorale, à travers l'induction de l'EMT notamment. De plus, il a été clairement démontré ces dernières années que le processus tumoral ne concerne plus que les cellules tumorales uniquement mais englobe aussi le microenvironnement tumoral avoisinant. Un nouveau concept a donc émergé bannissant la vision traditionnelle simpliste d'une tumeur constituée uniquement de cellules tumorales, et laissant la place à un nouveau paradigme de l'évolution tumorale. Ainsi, la tumeur est à présent considérée comme une entité complexe, dynamique, et hétérogène, comprenant plusieurs compartiments ainsi qu'un grand nombre de types cellulaires différents. Les interactions ayant lieu entre les cellules tumorales et le stroma aboutissent à la corruption de ce stroma, en particulier à travers l'induction et l'activation de CAFs, favorisant par la suite toutes les étapes du processus tumoral jusqu'à l'établissement de métastases à distance. De plus, il a été démontré que la sécrétion de TGF- β par les cellules stromales induit l'activation de l'axe de signalisation du RA dans les cellules tumorales prostatiques à travers l'activation de l'IL-6 et la BMP-6 (protéine morphogénique osseuse), 2 facteurs impliqués dans la résistance à la castration et souvent surexprimés dans les CPRC (313). De façon similaire, l'expression du RA dans les CAFs stimule la croissance et l'invasion des cellules tumorales prostatiques (314). De même, l'expression du RA au niveau des CAFs prostatiques module la réponse cellulaire à la castration et favorise l'apparition d'une résistance (315). Le microenvironnement tumoral prostatique a donc une part de responsabilité non négligeable dans l'apparition du processus de résistance à la castration.

Bien que plusieurs études aient analysé les effets du RA sauvage au niveau du microenvironnement tumoral prostatique, aucune donnée n'est disponible à ce jour

sur les effets des variants constitutivement actifs du RA sur le stroma réactif prostatique. Les études réalisées dans ce projet de thèse ont répondu à cette interrogation en analysant les effets des variants du RA sur l'origine des CAFs à travers leur différenciation à partir de MSCs.

I. Co-cultures in vitro

A. Co-cultures indirectes en inserts

Dans un premier temps, j'ai pu mettre en évidence une augmentation de l'expression du marqueur de différenciation en CAFs FSP-1 dans des MSCs mises en présence de cellules LNCaP transduites avec le variant RA Q641X, à l'aide d'un modèle de co-culture indirecte. Ce modèle n'a malheureusement pas permis de démontrer une augmentation de l'expression d'autres marqueurs de différenciation au niveau des MSCs mises en présence de ce variant. Le modèle pourrait être en cause puisque les MSCs étant situées au niveau des inserts au-dessus des cellules LNCaP transduites, elles n'étaient donc pas au contact direct des facteurs sécrétés par les cellules tumorales. De plus, la co-culture ayant duré 7 jours, le milieu de culture des inserts de MSCs et des puits de cellules LNCaP sous-jacents a été changé une fois lors de l'expérience. Il est possible que ce changement de milieu ait induit un biais vis-à-vis des facteurs sécrétés par les cellules tumorales, aboutissant à une rupture des échanges entre les deux types cellulaires. Le marqueur de différenciation en CAFs FSP-1 étant le marqueur le plus représentatif d'une différenciation en CAFs (270,277), l'augmentation de son expression suggère tout de même une différenciation en CAFs. Comme il a été précisé dans l'introduction, les CAFs représentent plus un état phénotypique qu'un type cellulaire en tant que tel. Ainsi, il est probable que les MSCs ayant été mises en présence de cellules LNCaP exprimant le variant RA Q641X n'aient qu'entamé un processus de différenciation en CAFs, et de ce fait ne présentent une augmentation de l'expression que d'un seul marqueur de différenciation en CAFs. Cette hypothèse est en adéquation avec la théorie récemment émise par Raghu Kalluri selon laquelle l'activation en CAFs est un processus se déroulant en plusieurs étapes. En réponse aux facteurs sécrétés par la tumeur, les cellules passeraient d'abord par un stade de fibroblastes associés normaux, semblables aux fibroblastes activés lors du processus de cicatrisation. Au

fur et à mesure de la progression tumorale, associée à une blessure chronique, ne guérissant jamais, le processus de cicatrisation devient constitutivement actif du fait des facteurs continuellement sécrétés par la tumeur. Par conséquent, le phénotype des fibroblastes associés normaux évolue en CAFs exprimant plus de marqueurs et sécrétant un plus grand nombre de facteurs, tout en ayant des capacités prolifératives plus élevées (271).

B. Milieux conditionnés et système inductible

La deuxième partie de mon projet de thèse a consisté à confirmer la différenciation des MSCs en CAFs en présence du variant RA Q641X à l'aide d'une approche plus robuste. Pour ce faire, l'expression des transgènes a été induite à la doxycycline dans les cellules LNCaP transduites, et une approche de milieu conditionné a été utilisée. Les résultats m'ont permis de retrouver l'augmentation de l'expression du marqueur de différenciation FSP-1 dans les MSCs mises en présence du variant RA Q641X, mais aussi de mettre en évidence une augmentation de l'expression d'autres marqueurs de différenciation en présence de ce variant, à savoir PDGFR- β , VEGF, ainsi que CXCL12 (ou SDF-1). Ces données confirment bel et bien la différenciation des MSCs en CAFs en présence du variant RA Q641X. En plus d'être un marqueur de différenciation en CAFS, CXCL12 est une cytokine impliquée dans d'autres processus tumoraux dont l'établissement du processus métastatique à travers l'induction de l'EMT (300). Ces résultats confirment donc les données préalablement mises en évidence au laboratoire montrant un impact positif du variant RA Q641X sur l'induction de l'EMT (139). Par ailleurs, la cytokine CXCL12 est notamment impliquée dans l'angiogenèse tumorale (316). De façon intéressante, ce modèle m'a permis de démontrer une augmentation de l'expression du facteur de différenciation VEGF par les cellules LNCaP exprimant le variant RA Q641X. Le facteur VEGF ayant été démontré comme étant capable d'induire la différenciation en CAFs, il représente aussi le facteur majoritaire de l'angiogenèse tumorale (249). Le variant RA Q641X est donc capable d'induire la différenciation des MSCs en CAFs, de stimuler l'EMT mais aussi de faciliter l'angiogenèse tumorale (Fig. 51).

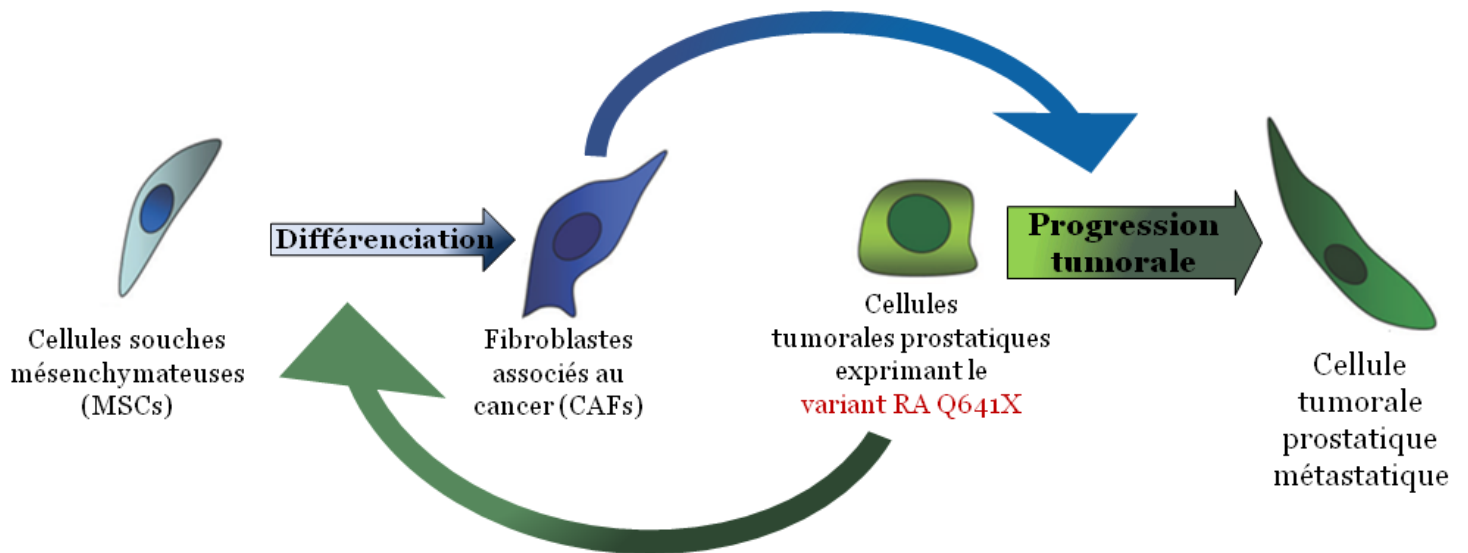


Figure 51 : Le variant RA Q641X faciliterait l'EMT et l'angiogenèse, tout en induisant la différenciation des MSCs en CAFs favorisant la progression tumorale.

De façon surprenante, l'expression du marqueur de différenciation en CAFs α -SMA n'a présenté aucune augmentation significative peu importe la condition (données non représentées). Ce marqueur est pourtant considéré comme un des marqueurs clé dont l'augmentation de l'expression témoigne d'une différenciation en CAFs (317). Ces données pourraient être expliquées par le caractère très hétérogène des CAFs. Comme nous l'avons dit précédemment, les CAFs correspondent à un état cellulaire et de ce fait ne peuvent être définis de façon précise et spécifique. De façon intéressante, il a été démontré que l'expression des marqueurs de CAFs peut varier entre les différents types de tumeurs (277,318). Ainsi, l'expression du marqueur α -SMA, de même que l'expression de la vimentine, ont été mises en évidence comme étant diminuées dans des MSCs mises en présence de milieu conditionné de cellules tumorales prostatiques provenant de métastases osseuses. Ces MSCs ont pourtant un phénotype de CAFs puisqu'elles favorisent l'invasion des cellules tumorales prostatiques (319).

De plus, il a été démontré que plusieurs sous-types de CAFs pouvaient coexister au sein du même microenvironnement tumoral. Costa et al. ont pu identifier pas moins de 4 sous-types différents de CAFs au niveau du microenvironnement tumoral mammaire (320). Ces 4 sous-types de CAFs ont des propriétés distinctes ainsi que des niveaux d'activation différents. Les auteurs se sont focalisés sur les capacités immunosuppressives des CAFs et ont pu démontrer que le sous-type CAF-S1 favorise l'immunosuppression en sécrétant la chimiokine CXCL12, recrutant ainsi des lymphocytes T CD4+, et en favorisant par la suite leur

différenciation en lymphocytes T régulateurs. Qui plus est, les sous-types CAF-S1 et CAF-S2 présentent une accumulation différentielle en fonction du sous-type de cancer mammaire (320).

Les marqueurs de différenciation de CAFs sont donc exprimés de façon différentielle entre les différentes tumeurs, mais aussi à l'intérieur même de la tumeur, et ce en fonction du stade de la progression tumorale. L'augmentation de l'expression des marqueurs FSP-1, CXCL12, PGFR- β , et VEGF, observée dans les MSCs en présence du variant RA Q641X, pourrait donc correspondre à un sous-type spécifique de CAFs.

Enfin, il est important de souligner que la différenciation en CAFs ne représente pas littéralement une différenciation au sens strict, mais plutôt une transition de la cellule vers un état pro-tumorigénique. Dans cette optique, il a été démontré que les MSCs présentent plus de similarités que de différences avec les CAFs. En effet, les MSCs et les CAFs partagent une morphologie cellulaire ainsi qu'un immunophénotype similaires. De plus, les marqueurs caractéristiques d'une différenciation ne sont pas exprimés *de novo* dans les CAFs, et sont exprimés à un niveau basal dans les MSCs naïves. Par conséquent, lors de l'activation en CAFs, les MSCs présentent une augmentation de l'expression de ces marqueurs de différenciation. Il en va de même pour les facteurs de croissance et cytokines favorisant la progression tumorale. Ces derniers sont exprimés dans les MSCs et leur expression est fortement augmentée lors de l'activation en CAFs. Les CAFs dérivant des MSCs représenteraient donc un sous-type de MSCs spécialisées, recrutées au site tumoral et ayant acquis des propriétés pro-tumorigéniques (321).

Sachant cela, plusieurs études se sont intéressées aux effets des MSCs naïves sur la progression tumorale et ont pu mettre en évidence un effet suppresseur de tumeur de ces dernières. Les MSCs naïves peuvent inhiber la prolifération des cellules tumorales à travers la sécrétion du facteur Dickkopf, un inhibiteur de la voie Wnt. Elles inhibent notamment l'angiogenèse en induisant l'apoptose des cellules endothéliales. Enfin, elles peuvent favoriser l'apoptose des cellules tumorales en stimulant l'expression de la caspase 3, une protéase pro-apoptotique. Les MSCs recrutées au site tumoral auraient donc en premier lieu un effet anti-tumoral puis, au fur et à mesure de la sécrétion de facteurs par les cellules tumorales, subiraient un 'switch' suite à cette exposition aux facteurs tumoraux, aboutissant à une spécialisation en CAFs pro-tumorigéniques (322,323).

Le switch correspondant à l'activation des CAFs se caractérise par l'augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation, mais pourrait aussi se caractériser par les modifications épigénétiques retrouvées au niveau des CAFs. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une dérégulation de la méthylation de l'ADN au niveau des CAFs. La voie de signalisation du TGF- β étant fortement impliquée dans la différenciation en CAFs, l'effecteur du TGF- β Smad3 a été identifié comme étant hyperméthylé dans des CAFs de cancer du poumon. En conséquence, l'inhibition de cet effecteur entraîne une hypersensibilité des CAFs au TGF- β favorisant ainsi leur activation (324). De même, l'expression du facteur suppresseur de signalisation cytokinique 1 (SOCS1) est inhibée suite à une hyperméthylation au niveau des CAFs, aboutissant à une activation du facteur de transcription STAT3 (transducteur de signal et activateur de la transcription) puis à une expression de l'IGF-1, fortement impliqué dans la progression tumorale (325). À l'inverse, une hypométhylation de la désintégrine et métalloprotéase ADAM12 (protéine contenant un domaine métalloprotéinase et désintégrine) a été démontrée dans des CAFs pancréatiques (326). Les conséquences de la surexpression de cette protéine au niveau des CAFs sont peu claires. Toutefois, cette protéine a été étudiée au niveau tumoral et son expression stimule l'axe de signalisation du TGF- β tout en favorisant l'induction de l'EMT à travers l'expression de marqueurs mésenchymateux dans des cellules tumorales mammaires. En plus de faciliter l'EMT des cellules tumorales, l'expression d'ADAM12 est associée à une chimiorésistance (327).

Par ailleurs, d'autres modifications épigénétiques ont pu être observées dans les CAFs au niveau des histones. Tyan et al. ont mis en évidence une diminution de la méthylation de la lysine K27 de l'histone H3 du gène de la métallopeptidase ADAMTS1 (désintégrine et métalloprotéinase contenant des motifs thrombospondines), impliquée dans l'invasion tumorale, dans des fibroblastes en coculture avec des cellules tumorales mammaires. Les auteurs ont notamment pu observer une diminution de la méthyltransférase EZH2, responsable de la méthylation de cette lysine K27 de l'histone H3 (328). Mis à part cette étude, très peu de données sont actuellement disponibles sur le statut des histones au niveau des CAFs.

Les modifications épigénétiques subies par les CAFs pourraient donc constituer un critère de différenciation supplémentaire, permettant ainsi de caractériser de façon

plus précise les changements ayant lieu entre le stade de cellule saine et l'activation en CAFs.

Afin d'analyser plus en détail ce 'switch' ayant lieu lors de la différenciation en CAFs, j'ai cherché à visualiser à l'échelle de la cellule l'expression du marqueur de différenciation FSP-1 dans les MSCs. Pour cela, j'ai utilisé une approche de FISH au niveau de MSCs ayant été traitées avec du milieu conditionné de cellules LNCaP transduites. Les images obtenues par cette technique ont par la suite été analysées par une approche à haut débit et ont permis l'étude de l'expression de FSP-1 dans chaque cellule individuellement. Les résultats de ces analyses ont permis la détection et la visualisation des MSCs ayant subi une augmentation de l'expression de FSP-1 suggérant une différenciation en CAFs. Il s'est avéré que ces cellules représentent un faible pourcentage du nombre total de cellules. Pourtant, l'augmentation de l'expression de FSP-1 dans ces MSCs est très significative. Il serait donc intéressant d'isoler ces cellules ayant une forte expression de FSP-1 par tri cellulaire en cytométrie en flux pour ensuite réaliser un séquençage sur cellule unique des ARNs afin de mettre à jour les axes de signalisation impliqués dans la différenciation en CAFs (329).

De façon inattendue, les données obtenues à l'aide de ces deux modèles *in vitro* ne m'ont pas permis de mettre en évidence un impact positif du variant RA-V7 sur l'expression du VEGF par les cellules LNCaP, ou sur l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation en CAFs au niveau des MSCs, augmentées en présence du variant RA Q641X. Le variant RA-V7 est pourtant tout autant impliqué que le variant RA Q641X dans la progression du CaP et joue un rôle prédominant dans la résistance à la castration (330). Il semblerait donc que ces 2 variants possèdent des modes d'action différents au niveau du microenvironnement tumoral. Le variant RA Q641X et le variant RA-V7 sont tous deux des variants constitutivement actifs, tronqués de leur partie C-terminale. Toutefois, ils possèdent des séquences différentes à leur extrémité C-terminale, à savoir ⁶²⁹EKFRVGNCKHLKMTRP⁶⁴⁴ pour le variant RA-V7, et ⁶²⁹ARKLKKLGNLKL⁶⁴⁰ pour le variant RA Q641X (134). Ces deux séquences n'ont d'une part pas la même longueur, et d'autre part ne présentent aucune similitude. Ces divergences pourraient expliquer les différences observées au niveau de l'impact sur le microenvironnement tumoral. Il serait judicieux d'étudier de

façon précise les protéines interagissant avec ces 2 variants en réalisant un interactome afin de décrypter les effecteurs cibles spécifiques de ces variants.

Par ailleurs, les CAFs représentant une population cellulaire extrêmement hétérogène, il est possible que les variants RA Q641X et RA-V7 n'induisent pas le même sous-type de CAFs. Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de montrer que le variant RA Q641X induit un sous-type de CAFs surexprimant les marqueurs FSP-1, PDGFR- β , VEGF, et CXCL12, et ce en surexprimant le facteur de différenciation VEGF. Le variant RA-V7 pourrait éventuellement induire l'expression d'un sous-type de CAFs surexprimant des marqueurs de différenciation différents, et ce à travers la sécrétion d'autres facteurs de différenciation que le VEGF. Afin de valider cette théorie, il serait utile de réaliser un dosage multiplexe de plusieurs cytokines et facteurs de croissance de façon simultanée au niveau de milieux conditionnés de cellules LNCaP exprimant le variant RA Q641X ou le variant RA-V7 (331). Il serait aussi envisageable d'étudier les facteurs sécrétés par les cellules LNCaP en réalisant une approche de spectrométrie de masse afin de détecter les facteurs présents dans différents milieux conditionnés de cellules LNCaP (332). D'autres marqueurs de différenciation en CAFs pourraient par la suite être étudiés au niveau des MSCs, comme la ténascine-C, le PDGFR- α ou encore le TGF- β (270).

Une approche alternative serait de reproduire ces expériences en utilisant un modèle de co-culture en 3 dimensions comme les sphéroïdes. Une telle approche permettrait de modéliser de façon plus adéquate les interactions ayant lieu entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, représentant ainsi plus conformément l'hétérogénéité cellulaire complexe de la tumeur (333,334).

Qui plus est, les CAFs dérivent des MSCs mais peuvent aussi dériver de plusieurs autres types cellulaires différents. Dans cette optique, il serait intéressant d'étudier les effets des variants RA Q641X et RA-V7 sur la différenciation en CAFs à partir d'autres cellules que les MSCs comme les fibroblastes normaux, les cellules endothéliales, ou les cellules tumorales prostatiques elles-mêmes.

Enfin, le rôle des CAFs étant de favoriser la progression tumorale, des études ultérieures pourraient analyser les effets des variants du RA sur la prolifération, l'EMT, ou encore sur les capacités invasives des cellules LNCaP exprimant ces variants et mises en présence de CAFs.

II. Modèle murin

La 2^{ème} partie de mon projet de thèse a consisté à étendre les résultats obtenus *in vitro* à un contexte *in vivo* en mettant au point un modèle murin. Pour ce faire, des cellules LNCaP transduites avec le RA sauvage ou les variants du RA ont été injectées dans la prostate de souris *Swiss Nude* et l'expression de la protéine FAP, marqueur de différenciation en CAFs spécifique du microenvironnement tumoral, a été étudiée par imagerie SPECT. Bien que les résultats préliminaires de cette étude n'aient pas permis de déterminer les effets des variants du RA sur l'expression de FAP *in vivo*, la mise au point du modèle murin a tout de même été concluante. Une optimisation de certains paramètres dont le nombre d'invidus par groupe, la cinétique de croissance tumorale, le mode d'administration de la doxycycline, ainsi que le protocole de fixation des tissus, permettra probablement d'obtenir des résultats probants quant aux effets des variants du RA sur l'expression de FAP *in vivo*. De plus, un nouvel élément radioactif, le zirconium 89, est actuellement en cours de caractérisation par nos collaborateurs à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien. Un projet de thèse est en cours pour permettre le développement de cet élément radioactif à des fins de radiomarquage d'anticorps monoclonaux pour la tomographie par émission de positons. Le zirconium 89 est un isotope faiblement radioactif du zirconium obtenu par double désintégration β du molybdène 94. Sa période de demi-vie de 78 h est particulièrement adaptée à l'étude de molécules dont la cinétique s'étend sur plusieurs jours (335). De ce fait, le couplage de l'anticorps monoclonal ciblant FAP au zirconium 89 permettrait de laisser agir l'anticorps plusieurs jours avant de réaliser les expériences d'imageries des souris. Les anticorps auraient donc plus de temps pour se fixer à leur cible de façon spécifique et l'accumulation de l'anticorps dans la vessie serait supprimée.

De façon globale, il serait judicieux de reproduire toutes ces expériences en utilisant une autre lignée cellulaire tumorale prostatique. En effet, les tumeurs prostatiques à un stade avancé ne contiennent pas uniquement les variants RA Q641X et RA-V7 et expriment un nombre considérable de variants. De ce fait, l'utilisation de la lignée cellulaire tumorale prostatique C4-2B représenterait un bon compromis. La lignée C4-2B dérive d'une métastase osseuse obtenue après transplantation orthotopique dans une souris *Nude* d'une tumeur initialement

développée à partir d'une injection de cellules LNCaP dans une souris *Nude* castrée. Cette lignée représente donc en quelque sorte une version métastatique des cellules LNCaP (336).

La réalisation de ce projet de thèse m'a permis de mettre en évidence le fait que le variant RA Q641X est fortement impliqué dans la progression tumorale du CaP à travers la corruption du stroma environnant, et ce en induisant la différenciation des MSCs en CAFs. Les données obtenues laissent à penser que le variant RA-V7 agit différemment vis-à-vis du microenvironnement tumoral, ajoutant ainsi un degré de complexité supplémentaire à l'hétérogénéité tumorale. Des études complémentaires devront être réalisées afin de comprendre pourquoi le variant RA-V7 n'a pas les mêmes effets que le variant RA Q641X au niveau de l'activation des CAFs.

L'ensemble des études réalisées sur les variants du RA démontrent qu'ils contribuent grandement à l'agressivité tumorale, tout comme le microenvironnement tumoral du fait des CAFs. L'idéal serait donc de trouver une molécule capable de cibler les cellules tumorales prostatiques et les CAFs prostatiques de façon concomitante. Étonnamment, le curcuma semble avoir ces propriétés. Le principe actif de cette épice, la curcumine, a été démontré comme étant capable d'inhiber l'EMT induite par les CAFs dans des cellules tumorales prostatiques, ainsi que l'expression du récepteur à la chimiokine CXCL12 CXCR4, et du récepteur à l'IL-6, et ce en inhibant la voie de signalisation MAOA (monoamine oxydase A)/mTOR/HIF-1 α . Les cytokines CXCL12 et IL-6 étant sécrétées par les CAFs et favorisant la progression tumorale, la curcumine aurait donc un effet protecteur vis-à-vis des CAFs (337). De plus, la curcumine diminue la prolifération ainsi que l'angiogenèse des cellules tumorales prostatiques, inhibe l'expression du RA, et favorise l'apoptose des cellules cancéreuses dans des modèles cellulaires de CPRC. Qui plus est, la curcumine induit une diminution du volume tumoral prostatique *in vivo* (338–340). Le développement d'analogues synthétiques de la curcumine représente donc un axe thérapeutique encourageant pour le traitement du CaP à des stades avancés.

Pour conclure, mes données de thèse contribuent à la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus de résistance à la castration à travers l'étude des effets de variants du RA sur le microenvironnement tumoral. Ces données fournissent des notions supplémentaires sur les modes d'action des variants du RA, ce qui permettra à terme d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques en vue d'une prise en charge personnalisée des patients atteints d'un CPRC.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. McKinley M, O'Loughlin V, Bidle T. *Anatomy & Physiology: An Integrative Approach*. 2nd Edition. McGraw-Hill Education; 2015.
2. McNeal JE. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol*. 1968 Mar;49(3):347–57.
3. Wadhera P. An introduction to acinar pressures in BPH and prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2013 May 14;10:358.
4. Siegel Rebecca L., Miller Kimberly D., Jemal Ahmedin. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan 4;68(1):7–30.
5. Wong MCS, Goggins WB, Wang HHX, Fung FDH, Leung C, Wong SYS, et al. Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. *Eur Urol*. 2016 Nov 1;70(5):862–74.
6. Grosclaude P, Belot A, Daubisse Marliac L, Remontet L, Leone N, Bossard N, et al. Le cancer de la prostate, évolution de l'incidence et de la mortalité en France entre 1980 et 2011. *Progrès En Urol*. 2015 Jul 1;25(9):536–42.
7. Catalona WJ. Prostate Cancer Screening. *Medical Clinics of North America*. 2018 Mar 1;102(2):199–214.
8. Daniyal M, Siddiqui ZA, Akram M, Asif HM, Sultana S, Khan A. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014;15(22):9575–8.
9. Powell IJ, Vigneau FD, Bock CH, Ruterbusch J, Heilbrun LK. Reducing Prostate Cancer Racial Disparity: Evidence for Aggressive Early Prostate Cancer PSA Testing of African American Men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Amp Prev*. 2014 Aug 1;23(8):1505.
10. Terrier M, Terrier JE, Paparel P, Morel-Journel N, Baldini A, Ruffion A. Epidémiologie, diagnostic et pronostic du cancer de la prostate. *Médecine Nucléaire*. 2017 Sep 1;41(5):329–34.
11. Gleason DF, Mellinger GT, Arduino LJ, Bailar JC, Becker LE, Berman HI, et al. Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging. *J Urol*. 1974 Jan 1;111(1):58–64.
12. Gordetsky J, Epstein J. Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications. *Diagn Pathol*. 2016;11:25.
13. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul 1;70(1):106–19.
14. Rozet F, Hennequin C, Beauval J-B, Beuzeboc P, Cormier L, Fromont G, et al. Recommandations en onco-urologie 2016-2018 du CCAFU: Cancer de la prostate. *Recommandations 2016-2018 En Onco-Urol*. 2016 Nov 1;27:S95–S143.
15. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference

- on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(2):244–52.
16. Beahrs O, Henson D, Hutter R, Kennedy B. American Joint Committee on Cancer Staging Manual for Staging of Cancer. 4th edition. J. B. LIPPINCOTT COMPANY Philadelphia; 1992.
 17. Buyyounouski Mark K., Choyke Peter L., McKenney Jesse K., Sartor Oliver, Sandler Howard M., Amin Mahul B., et al. Prostate cancer – major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 Feb 21;67(3):245–53.
 18. D’Amico AV, Whittington R, Malkowicz S, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA.* 1998 Sep 16;280(11):969–74.
 19. Milonas D, Kinčius M, Skulčius G, Matjošaitis AJ, Gudiniavičienė I, Jievaltas M. Evaluation of D’Amico criteria for low-risk prostate cancer. *Scand J Urol.* 2014 Aug 1;48(4):344–9.
 20. Albertsen PC, Moore DF, Shih W, Lin Y, Li H, Lu-Yao GL. Impact of Comorbidity on Survival Among Men With Localized Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 1;29(10):1335–41.
 21. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2016 Sep 14;375(15):1415–24.
 22. Akand Murat, Erdogru Tibet, Avci Egemen, Ates Mutlu. Transperitoneal versus extraperitoneal robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy: A prospective single surgeon randomized comparative study. *Int J Urol.* 2015 Jul 26;22(10):916–21.
 23. Haglind E, Carlsson S, Stranne J, Wallerstedt A, Wilderäng U, Thorsteinsdóttir T, et al. Urinary Incontinence and Erectile Dysfunction After Robotic Versus Open Radical Prostatectomy: A Prospective, Controlled, Nonrandomised Trial. *Eur Urol.* 2015 Aug 1;68(2):216–25.
 24. Sherer BA, Levine LA. Current management of erectile dysfunction in prostate cancer survivors. *Curr Opin Urol.* 2014 Jul;24(4):401–6.
 25. Cosset J-M, Hannoun-Lévi J-M, Peiffert D, Delannes M, Pommier P, Pierrat N, et al. Curiethérapie du cancer prostatique par implants permanents : le point en 2013. *Curiethérapie Coordonné Par Jean-Michel Hannoun-Lévi.* 2013 Apr 1;17(2):111–7.
 26. Morris WJ, Tyldesley S, Rodda S, Halperin R, Pai H, McKenzie M, et al. Androgen Suppression Combined with Elective Nodal and Dose Escalated Radiation Therapy (the ASCENDE-RT Trial): An Analysis of Survival Endpoints for a Randomized Trial Comparing a Low-Dose-Rate Brachytherapy Boost to a Dose-

- Escalated External Beam Boost for High- and Intermediate-risk Prostate Cancer. *Int J Radiat Oncol.* 2017 Jun 1;98(2):275–85.
27. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2017 Apr 1;71(4):618–29.
 28. Heemsbergen WD, Al-Mamgani A, Slot A, Dielwart MFH, Lebesque JV. Long-term results of the Dutch randomized prostate cancer trial: Impact of dose-escalation on local, biochemical, clinical failure, and survival. *Radiother Oncol.* 2014 Jan 1;110(1):104–9.
 29. Bolla M, Maingon P, Carrie C, Villa S, Kitsios P, Poortmans PMP, et al. Short Androgen Suppression and Radiation Dose Escalation for Intermediate- and High-Risk Localized Prostate Cancer: Results of EORTC Trial 22991. *J Clin Oncol.* 2016 May 20;34(15):1748–56.
 30. Dearnaley D, Syndikus I, Mossop H, Khoo V, Birtle A, Bloomfield D, et al. Conventional versus hypofractionated high-dose intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer: 5-year outcomes of the randomised, non-inferiority, phase 3 CHHiP trial. *Lancet Oncol.* 2016 Aug 1;17(8):1047–60.
 31. HUGGINS C, STEVENS RE, Jr., HODGES CV. Studies on prostatic cancer: II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch Surg.* 1941 Aug 1;43(2):209–23.
 32. Moul JW. Prostate cancer: making the switch from LHRH antagonist to LHRH agonist. *Nat Rev Urol.* 2012 Jan 31;9(3):125–6.
 33. Vis AN, van der Sluis TM, Al-Itejawi HHM, van Moorselaar RJA, Meuleman EJH. Risk of disease flare with LHRH agonist therapy in men with prostate cancer: myth or fact? *Urol Oncol.* 2015 Jan;33(1):7–15.
 34. Agarwal N, Di Lorenzo G, Sonpavde G, Bellmunt J. New agents for prostate cancer. *Ann Oncol.* 2014 Sep 1;25(9):1700–9.
 35. Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging Mechanisms of Resistance to Androgen Receptor Inhibitors in Prostate Cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015 Dec;15(12):701–11.
 36. Rita Assi, Sally Temraz, Ali Shamseddine and Deborah Mukherji. New Compounds Targeting the Androgen Receptor for Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Curr Drug Targets.* 2016;17(3):290–302.
 37. Prekovic S, Van den Broeck T, Linder S, van Royen ME, Houtsmuller A, Handle F, et al. Molecular underpinnings of enzalutamide resistance. *Endocr Relat Cancer.* 2018 Jul 5;
 38. Helsen C, Van den Broeck T, Voet A, Prekovic S, Van Poppel H, Joniau S, et al. Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. *Endocr Relat Cancer.* 2014 Aug 1;21(4):T105–T118.

39. Claessens F, Helsen C, Prekovic S, Van den Broeck T, Spans L, Van Poppel H, et al. Emerging mechanisms of enzalutamide resistance in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2014 Sep 16;11:712.
40. Francesco Massari, Francesca Maines, Alessandra Modena, Matteo Brunelli, Emilio Bria, Walter Artibani, et al. Castration Resistant Prostate Cancer (CRPC): State of the Art, Perspectives and New Challenges. *Former Curr Med Chem - Anti-Cancer Agents.* 2013;13(6):872–86.
41. Zhang T, Zhu J, George DJ, Armstrong AJ. Enzalutamide versus abiraterone acetate for the treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2015 Mar;16(4):473–85.
42. Claessens F, Moris L. The influence of steroid metabolism on CYP17A1 inhibitor activity. *Nat Rev Urol.* 2017 Aug 8;14:590.
43. Thakur A, Roy A, Ghosh A, Chhabra M, Banerjee S. Abiraterone acetate in the treatment of prostate cancer. *Biomed Pharmacother.* 2018 May 1;101:211–8.
44. Harshman LC, Taplin M-E. Abiraterone Acetate: Targeting Persistent Androgen Dependence in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Adv Ther.* 2013;30(8):727–47.
45. Kobayashi T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O. Experimental Evidence of Persistent Androgen-Receptor-Dependency in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2013 Aug;14(8):15615–35.
46. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995 Dec 15;83(6):835–9.
47. Helsen C, Claessens F. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 Jan 25;382(1):97–106.
48. Lorente D, Mateo J, Zafeiriou Z, Smith AD, Sandhu S, Ferraldeschi R, et al. Switching and withdrawing hormonal agents for castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2015 Jan;12(1):37–47.
49. McEwan IJ. Intrinsic disorder in the androgen receptor: identification, characterisation and drugability. *Mol Biosyst.* 2012;8(1):82–90.
50. Monaghan AE, McEwan IJ. A sting in the tail: the N-terminal domain of the androgen receptor as a drug target. *Asian J Androl.* 2016;18(5):687–94.
51. Rinaldi C, Bott LC, Fischbeck KH. Muscle matters in Kennedy's disease. *Neuron.* 2014 Apr 16;82(2):251–3.
52. Querin G, Soraru G, Pradat P-F. Kennedy disease (X-linked recessive bulbospinal neuronopathy): A comprehensive review from pathophysiology to therapy. *Rev Neurol (Paris).* 2017 May;173(5):326–37.
53. Yoo S, Pettersson A, Jordahl KM, Lis RT, Lindstrom S, Meisner A, et al. Androgen receptor CAG repeat polymorphism and risk of TMPRSS2:ERG-positive prostate

- cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2014 Oct;23(10):2027–31.
54. Zhai X-L, Qu X-W, Guo L, Ha Q-H. Correlation study between the polymorphism of repetitive sequence in gene CAG of androgen receptor and the occurrence and progression of prostate cancer. *Asian Pac J Trop Med.* 2014 Apr;7(4):301–4.
 55. Asencio-Hernández Julia, Ruhlmann Christine, McEwen Alastair, Eberling Pascal, Nominé Yves, Céraline Jocelyn, et al. Reversible Amyloid Fiber Formation in the N Terminus of Androgen Receptor. *ChemBioChem.* 2014 Sep 11;15(16):2370–3.
 56. Oppong E, Stier G, Gaal M, Seeger R, Stoeck M, Delsuc M-A, et al. An Amyloidogenic Sequence at the N-Terminus of the Androgen Receptor Impacts Polyglutamine Aggregation. Bähler J, editor. *Biomolecules.* 2017 Jun;7(2):44.
 57. McEwan IJ, Gustafsson J-Å. Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci.* 1997 Aug 5;94(16):8485.
 58. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015 Jan;36(1):3–23.
 59. Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev.* 2016 Feb;37(1):3–15.
 60. Tanner T, Claessens F, Haelens A. The hinge region of the androgen receptor plays a role in proteasome-mediated transcriptional activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1030:587–92.
 61. Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F. The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res.* 2007 May 1;67(9):4514–23.
 62. Clinckemalie L, Vanderschueren D, Boonen S, Claessens F. The hinge region in androgen receptor control. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Jul 6;358(1):1–8.
 63. Nadal M, Prekovic S, Gallastegui N, Helsen C, Abella M, Zielinska K, et al. Structure of the homodimeric androgen receptor ligand-binding domain. *Nat Commun.* 2017;8:14388.
 64. Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chem Rev.* 2005 Sep;105(9):3352–70.
 65. Van Royen ME, Cunha SM, Brink MC, Mattern KA, Nigg AL, Dubbink HJ, et al. Compartmentalization of androgen receptor protein–protein interactions in living cells. *J Cell Biol.* 2007 Apr 9;177(1):63–72.
 66. Claessens F, Denayer S, Van Tilborgh N, Kerkhofs S, Helsen C, Haelens A. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal.* 2008;6:e008.

67. Dehm SM, Tindall DJ. Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. *Mol Endocrinol.* 2007 Dec 1;21(12):2855–63.
68. Wilson JD. The Critical Role of Androgens in Prostate Development. *Horm Cancer Breast Prostate.* 2011 Sep 1;40(3):577–90.
69. Hiort O. The differential role of androgens in early human sex development. *BMC Med.* 2013;11:152–152.
70. Cooper LA, Page ST. Androgens and prostate disease. *Asian J Androl.* 2014;16(2):248–55.
71. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Jun 1;42(6):813–27.
72. Lonergan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog.* 2011;10:20.
73. Pietri E, Conteduca V, Andreis D, Massa I, Melegari E, Sarti S, et al. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocr Relat Cancer.* 2016 Oct 1;23(10):R485–R498.
74. Baron S, Manin M, Beaudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veyssiere G, et al. Androgen Receptor Mediates Non-genomic Activation of Phosphatidylinositol 3-OH Kinase in Androgen-sensitive Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 2004 Apr 9;279(15):14579–86.
75. Zarif JC, Miranti CK. The Importance of Non-Nuclear AR Signaling in Prostate Cancer Progression and Therapeutic Resistance. *Cell Signal.* 2016 May;28(5):348–56.
76. Rahman F, Christian HC. Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2007 Dec;18(10):371–8.
77. Hammes SR, Davis PJ. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015 Aug;29(4):581–93.
78. Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS, et al. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4315–9.
79. Obinata D, Takayama K, Takahashi S, Inoue S. Crosstalk of the Androgen Receptor with Transcriptional Collaborators: Potential Therapeutic Targets for Castration-Resistant Prostate Cancer. Antonarakis ES, editor. *Cancers.* 2017 Mar;9(3):22.
80. Gelman IH. Androgen Receptor Activation in Castration-Recurrent Prostate Cancer: The Role of Src-Family and Ack1 Tyrosine Kinases. *Int J Biol Sci.* 2014;10(6):620–6.

81. Wang Q, Wang H, Ju Q, Ding Z, Ge X, Shi Q-M, et al. The co-regulators SRC-1 and SMRT are involved in interleukin-6-induced androgen receptor activation. *Eur Cytokine Netw.* 2016 Nov 1;27(4):108–13.
82. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jul;6(7):542–54.
83. Lopez SM, Agoulnik AI, Zhang M, Peterson LE, Suarez E, Gandarillas GA, et al. Nuclear Receptor Corepressor 1 Expression and Output Declines with Prostate Cancer Progression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2016 Aug 1;22(15):3937–49.
84. Wong MM, Guo C, Zhang J. Nuclear receptor corepressor complexes in cancer: mechanism, function and regulation. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2(3):169–87.
85. Riegman PHJ, Vlietstra RJ, van der Korput JAGM, Romijn JC, Trapman J. Characterization of the Prostate-specific Antigen gene: A novel human kallikrein-like gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Feb 28;159(1):95–102.
86. Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO, Trapman J. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem.* 1996 Mar 15;271(11):6379–88.
87. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev.* 2004 Apr;25(2):276–308.
88. Yousef GM, Diamandis EP. The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function, and Association to Disease. *Endocr Rev.* 2001 Apr 1;22(2):184–204.
89. Vaisanen V, Eriksson S, Ivaska KK, Lilja H, Nurmi M, Pettersson K. Development of sensitive immunoassays for free and total human glandular kallikrein 2. *Clin Chem.* 2004 Sep;50(9):1607–17.
90. Lee SW, Hosokawa K, Kim S, Jeong OC, Lilja H, Laurell T, et al. A Highly Sensitive Porous Silicon (P-Si)-Based Human Kallikrein 2 (hK2) Immunoassay Platform toward Accurate Diagnosis of Prostate Cancer. *Star A, editor. Sensors.* 2015 May;15(5):11972–87.
91. Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S, Vessella R, True LD, et al. Prostate-localized and Androgen-regulated Expression of the Membrane-bound Serine Protease TMPRSS2. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4180.
92. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, et al. Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science.* 2005 Oct 28;310(5748):644.
93. Burdova A, Bouchal J, Tavandzis S, Kolar Z. TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Biomed Pap.* 2014;158(4):502–10.

94. Sanguedolce F, Cormio A, Brunelli M, D'Amuri A, Carrieri G, Bufo P, et al. Urine TMPRSS2: ERG Fusion Transcript as a Biomarker for Prostate Cancer: Literature Review. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Apr;14(2):117–21.
95. Lam DK, Dang D, Flynn AN, Hardt M, Schmidt BL. TMPRSS2, a novel membrane-anchored mediator in cancer pain. *Pain*. 2015 May;156(5):923–30.
96. Hussein S, Satturwar S, Van der Kwast T. Young-age prostate cancer. *J Clin Pathol*. 2015 Jul;68(7):511–5.
97. Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, Park K, Downing SR, MacDonald TY, et al. Targeted Next-generation Sequencing of Advanced Prostate Cancer Identifies Potential Therapeutic Targets and Disease Heterogeneity. *Eur Urol*. 2013 May 1;63(5):920–6.
98. Robinson D, Van Allen EM, Wu Y-M, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera J-M, et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell*. 2015 May 21;161(5):1215–28.
99. Kumar A, Coleman I, Morrissey C, Zhang X, True LD, Gulati R, et al. Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nat Med*. 2016 Feb 29;22:369.
100. Carreira S, Romanel A, Goodall J, Grist E, Ferraldeschi R, Miranda S, et al. Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2014 Sep 17;6(254):254ra125.
101. Sahu B, Laakso M, Pihlajamaa P, Ovaska K, Sinielnikov I, Hautaniemi S, et al. FoxA1 specifies unique androgen and glucocorticoid receptor binding events in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2013 Mar 1;73(5):1570–80.
102. Arora VK, Schenkein E, Murali R, Subudhi SK, Wongvipat J, Balbas MD, et al. Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell*. 2013 Dec 5;155(6):1309–22.
103. Montgomery B, Cheng HH, Drechsler J, Mostaghel EA. Glucocorticoids and prostate cancer treatment: friend or foe? *Asian J Androl*. 2014 Jun;16(3):354–8.
104. Edlind MP, Hsieh AC. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian J Androl*. 2014 Jun;16(3):378–86.
105. Bilir B, Osunkoya AO, Wiles WG 4th, Sannigrahi S, Lefebvre V, Metzger D, et al. SOX4 Is Essential for Prostate Tumorigenesis Initiated by PTEN Ablation. *Cancer Res*. 2016 Mar 1;76(5):1112–21.
106. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, et al. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer Cell*. 2011 May 17;19(5):575–86.

107. Foley C, Mitsiades N. Moving Beyond the Androgen Receptor (AR): Targeting AR-Interacting Proteins to Treat Prostate Cancer. *Horm Cancer*. 2016 Apr 1;7(2):84–103.
108. Qin J, Lee H-J, Wu S-P, Lin S-C, Lanz RB, Creighton CJ, et al. Androgen deprivation-induced NCoA2 promotes metastatic and castration-resistant prostate cancer. *J Clin Invest*. 2014 Nov;124(11):5013–26.
109. Geng C, Rajapakshe K, Shah SS, Shou J, Eedunuri VK, Foley C, et al. Androgen Receptor Is the Key Transcriptional Mediator of the Tumor Suppressor SPOP in Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2014 Oct 1;74(19):5631.
110. Lallous N, Volik SV, Awrey S, Leblanc E, Tse R, Murillo J, et al. Functional analysis of androgen receptor mutations that confer anti-androgen resistance identified in circulating cell-free DNA from prostate cancer patients. *Genome Biol*. 2016 Jan 26;17(1):10.
111. Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, et al. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Dec 14;173(2):534–40.
112. Ris-Stalpers C, Verleun-Mooijman MC, Trapman J, Brinkmann AO. Threonine on amino acid position 868 in the human androgen receptor is essential for androgen binding specificity and functional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Oct 15;196(1):173–80.
113. BERREVOETS CA, UMAR A, TRAPMAN J, BRINKMANN AO. Differential modulation of androgen receptor transcriptional activity by the nuclear receptor co-repressor (N-CoR). *Biochem J*. 2004 May 1;379(3):731.
114. Joseph JD, Lu N, Qian J, Sensintaffar J, Shao G, Brigham D, et al. A Clinically Relevant Androgen Receptor Mutation Confers Resistance to Second-Generation Antiandrogens Enzalutamide and ARN-509. *Cancer Discov*. 2013 Sep 1;3(9):1020.
115. Balbas MD, Evans MJ, Hosfield DJ, Wongvipat J, Arora VK, Watson PA, et al. Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with rational drug design. *Elife*. 2013 Apr 9;2:e00499.
116. Azad AA, Volik SV, Wyatt AW, Haegert A, Le Bihan S, Bell RH, et al. Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015 May 15;21(10):2315.
117. Prekovic S, van Royen ME, Voet ARD, Geverts B, Houtman R, Melchers D, et al. The Effect of F877L and T878A Mutations on Androgen Receptor Response to Enzalutamide. *Mol Cancer Ther*. 2016 Jul 1;15(7):1702.
118. Shi X-B, Ma A-H, Xia L, Kung H-J, de Vere White RW. Functional Analysis of 44 Mutant Androgen Receptors from Human Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2002 Mar 1;62(5):1496.

119. Maity SN, Titus MA, Gyftaki R, Wu G, Lu J-F, Ramachandran S, et al. Targeting of CYP17A1 Lyase by VT-464 Inhibits Adrenal and Intratumoral Androgen Biosynthesis and Tumor Growth of Castration Resistant Prostate Cancer. *Sci Reports*. 2016;6:35354.
120. Vasudevamurthy AK, Ledet E, Garvey C, Lewis BE, Sartor O. Estrogen-Mediated Activation of H875Y Androgen Receptor Mutation in a Prostate Cancer Patient. *Clin Genitourin Cancer*. 2017 Feb 1;15(1):e111–e113.
121. Zhao XY, Malloy PJ, Krishnan AV, Swami S, Navone NM, Peehl DM, et al. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat Med*. 2000 Jun;6(6):703–6.
122. Romanel A, Gasi Tandefelt D, Conteduca V, Jayaram A, Casiraghi N, Wetterskog D, et al. Plasma AR and abiraterone-resistant prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2015 Nov 4;7(312):312re10.
123. Wyatt AW, Azad AA, Volik SV, Annala M, Beja K, McConeghy B, et al. Genomic alterations in cell-free DNA and enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncol*. 2016 Dec 1;2(12):1598–606.
124. Hara T, Miyazaki J, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, et al. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res*. 2003 Jan 1;63(1):149–53.
125. Liu H, An X, Li S, Wang Y, Li J, Liu H. Interaction mechanism exploration of R-bicalutamide/S-1 with WT/W741L AR using molecular dynamics simulations. *Mol Biosyst*. 2015 Dec;11(12):3347–54.
126. Liu H, Han R, Li J, Liu H, Zheng L. Molecular mechanism of R-bicalutamide switching from androgen receptor antagonist to agonist induced by amino acid mutations using molecular dynamics simulations and free energy calculation. *J Comput Aided Mol Des*. 2016 Dec;30(12):1189–200.
127. Chen Guangchun, Wang Xiaohui, Zhang Shimin, Lu Ying, Sun Yinghao, Zhang Jinshan, et al. Androgen receptor mutants detected in recurrent prostate cancer exhibit diverse functional characteristics. *The Prostate*. 2004 Dec 22;63(4):395–406.
128. Steinkamp MP, O'Mahony OA, Brogley M, Rehman H, LaPensee EW, Dhanasekaran S, et al. Treatment-Dependent Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancer Exploit Multiple Mechanisms to Evade Therapy. *Cancer Res*. 2009 May 15;69(10):4434.
129. Chan SC, Dehm SM. Constitutive activity of the androgen receptor. *Adv Pharmacol San Diego Calif*. 2014;70:327–66.
130. Tadokoro-Cuccaro R, Davies J, Mongan NP, Bunch T, Brown RS, Audi L, et al. Promoter-dependent activity on androgen receptor N-terminal domain mutations in androgen insensitivity syndrome. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol Sex Determ Differ*. 2014;8(6):339–49.

131. Bergerat J-P, Céraline J. Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum Mutat.* 2008 Sep 17;30(2):145–57.
132. Jenster G, van der Korput JA, Trapman J, Brinkmann AO. Functional domains of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992 Mar;41(3-8):671–5.
133. Ceraline J, Cruchant MD, Erdmann E, Erbs P, Kurtz J-E, Duclos B, et al. 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.* 2004 Jan 1;108(1):152–7.
134. Cao S, Zhan Y, Dong Y. Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2016 Dec;23(12):T199–T210.
135. Ceraline J, Erdmann E, Erbs P, Deslandres-Cruchant M, Jacqmin D, Duclos B, et al. A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer. *Eur J Endocrinol.* 2003 Jan 1;148(1):99–110.
136. Lapouge G, Marcias G, Erdmann E, Kessler P, Cruchant M, Serra S, et al. Specific properties of a C-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2008;617:529–34.
137. Lapouge G, Erdmann E, Marcias G, Jagla M, Monge A, Kessler P, et al. 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.* 2007 Sep 15;121(6):1238–44.
138. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2015 Nov;25(11):675–86.
139. Cottard F, Asmane I, Erdmann E, Bergerat J-P, Kurtz J-E, Ceraline J. Constitutively Active Androgen Receptor Variants Upregulate Expression of Mesenchymal Markers in Prostate Cancer Cells. *PLoS One* [Internet]. 2013 May 2 [cited 2014 May 31];8(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3642121/>
140. Cottard F, Madi-Berthélémy PO, Erdmann E, Schaff-Wendling F, Keime C, Ye T, et al. Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer. *Oncotarget.* 2017 Sep;8(42):72008–20.
141. Streicher W, Zengerling F, Laschak M, Weidemann W, Hopfner M, Schrader AJ, et al. AR-Q640X, a model to study the effects of constitutively active C-terminally truncated AR variants in prostate cancer cells. *World J Urol.* 2012 Jun;30(3):333–9.
142. Xu D, Zhan Y, Qi Y, Cao B, Bai S, Xu W, et al. Androgen Receptor Splice Variants Dimerize to Transactivate Target Genes. *Cancer Res.* 2015 Sep 1;75(17):3663.

143. Streicher W, Luedeke M, Azoitei A, Zengerling F, Herweg A, Genze F, et al. Stilbene Induced Inhibition of Androgen Receptor Dimerization: Implications for AR and AR Δ LBD-Signalling in Human Prostate Cancer Cells. *PLOS ONE*. 2014 Jun 2;9(6):e98566.
144. Yang L, Lin C, Jin C, Yang JC, Tanasa B, Li W, et al. LncRNA-Dependent Mechanisms of Androgen Receptor-regulated Gene Activation Programs. *Nature*. 2013 Aug 29;500(7464):598–602.
145. Zengerling F, Azoitei A, Herweg A, Jentzmik F, Cronauer MV. Inhibition of IGF-1R diminishes transcriptional activity of the androgen receptor and its constitutively active, C-terminally truncated counterparts Q640X and. *World J Urol*. 2016 May;34(5):633–9.
146. Regufe da Mota S, Bailey S, Strivens RA, Hayden AL, Douglas LR, Duriez PJ, et al. LSD1 inhibition attenuates androgen receptor V7 splice variant activation in castration resistant prostate cancer models. *Cancer Cell Int*. 2018 May 9;18(1):71.
147. Hupe MC, Hoda MR, Zengerling F, Perner S, Merseburger AS, Cronauer MV. The BET-inhibitor PFI-1 diminishes AR/AR-V7 signaling in prostate cancer cells. *World J Urol*. 2018 Jun 22;
148. Han D, Gao S, Valencia K, Owiredo J, Han W, de Waal E, et al. A novel nonsense mutation in androgen receptor confers resistance to CYP17 inhibitor treatment in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 24;8(4):6796–808.
149. Le K, Prabhakar BS, Hong W, Li L. Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 2015 Oct;36(10):1212–8.
150. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res*. 2008 Jul 1;68(13):5469–77.
151. Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, et al. A Novel Androgen Receptor Splice Variant Is Upregulated during Prostate Cancer Progression and Promotes Androgen-depletion-resistant Growth. *Cancer Res*. 2009 Mar 15;69(6):2305–13.
152. Nakazawa M, Antonarakis ES, Luo J. Androgen Receptor Splice Variants in the Era of Enzalutamide and Abiraterone. *Horm Cancer*. 2014 Oct;5(5):265–73.
153. Li Y, Chan SC, Brand LJ, Hwang TH, Silverstein KAT, Dehm SM. Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 2013 Jan 15;73(2):483–9.
154. Yu Z, Chen S, Sowalsky AG, Voznesensky OS, Mostaghel EA, Nelson PS, et al. Rapid Induction of Androgen Receptor Splice Variants by Androgen Deprivation in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Mar 15;20(6):1590–600.

155. Hörnberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, Widmark A, et al. Expression of Androgen Receptor Splice Variants in Prostate Cancer Bone Metastases is Associated with Castration-Resistance and Short Survival. Dent P, editor. PLoS ONE. 2011;6(4):e19059.
156. Qu Y, Dai B, Ye D, Kong Y, Chang K, Jia Z, et al. Constitutively Active AR-V7 Plays an Essential Role in the Development and Progression of Castration-Resistant Prostate Cancer. Sci Reports. 2015;5:7654.
157. Jernberg E, Thysell E, Bovinder Ylitalo E, Rudolfsson S, Crnalic S, Widmark A, et al. Characterization of Prostate Cancer Bone Metastases According to Expression Levels of Steroidogenic Enzymes and Androgen Receptor Splice Variants. Datta K, editor. PLoS ONE. 2013;8(11):e77407.
158. Chan SC, Li Y, Dehm SM. Androgen Receptor Splice Variants Activate Androgen Receptor Target Genes and Support Aberrant Prostate Cancer Cell Growth Independent of Canonical Androgen Receptor Nuclear Localization Signal. J Biol Chem. 2012 Jun 1;287(23):19736–49.
159. Hu R, Lu C, Mostaghel EA, Yegnasubramanian S, Gurel M, Tannahill C, et al. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. Cancer Res. 2012 Jul 15;72(14):3457–62.
160. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, et al. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Sep 28;107(39):16759–65.
161. Nakazawa M, Lu C, Chen Y, Paller CJ, Carducci MA, Eisenberger MA, et al. Serial blood-based analysis of AR-V7 in men with advanced prostate cancer. Ann Oncol. 2015 Sep;26(9):1859–65.
162. Luo J. Development of AR-V7 as a putative treatment selection marker for metastatic castration-resistant prostate cancer. Asian J Androl. 2016;18(4):580–5.
163. Andersen RJ, Mawji NR, Wang J, Wang G, Haile S, Myung J-K, et al. Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. Cancer Cell. 2010 Jun 15;17(6):535–46.
164. Myung J-K, Banuelos CA, Fernandez JG, Mawji NR, Wang J, Tien AH, et al. An androgen receptor N-terminal domain antagonist for treating prostate cancer. J Clin Invest. 2013 Jul 1;123(7):2948–60.
165. Yang YC, Banuelos CA, Mawji NR, Wang J, Kato M, Haile S, et al. Targeting androgen receptor activation function-1 with EPI to overcome resistance mechanisms in castration-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2016 Sep 1;22(17):4466–77.

166. Brand LJ, Olson ME, Ravindranathan P, Guo H, Kempema AM, Andrews TE, et al. EPI-001 is a selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulator with inhibitory effects on androgen receptor expression and activity in prostate cancer. *Oncotarget*. 2015 Feb 28;6(6):3811–24.
167. De Mol E, Fenwick RB, Phang CTW, Buzón V, Szulc E, de la Fuente A, et al. EPI-001, a compound active against castration-resistant prostate cancer, targets transactivation unit 5 of the androgen receptor. *ACS Chem Biol*. 2016 Sep 16;11(9):2499–505.
168. Sun F, Chen H, Li W, Yang X, Wang X, Jiang R, et al. Androgen receptor splice variant AR3 promotes prostate cancer via modulating expression of autocrine/paracrine factors. *J Biol Chem*. 2014 Jan 17;289(3):1529–39.
169. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013 Nov 7;19:1423.
170. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
171. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013 Sep 18;501:346.
172. Hynes RO. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009 Nov 27;326(5957):1216–9.
173. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Dec;15(12):786–801.
174. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*. 2014 Dec;15(12):1243–53.
175. Friedl P, Alexander S. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell*. 2011 Nov 23;147(5):992–1009.
176. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol*. 2008 Feb;214(3):357–67.
177. Rupp T, Langlois B, Koczorowska MM, Radwanska A, Sun Z, Hussenet T, et al. Tenascin-C Orchestrates Glioblastoma Angiogenesis by Modulation of Pro- and Anti-angiogenic Signaling. *Cell Reports*. 2016 Dec 6;17(10):2607–19.
178. Semenza GL. Cancer-Stromal Cell Interactions Mediated by Hypoxia-Inducible Factors Promote Angiogenesis, Lymphangiogenesis, and Metastasis. *Oncogene*. 2013 Aug 29;32(35):4057–63.
179. Xiong J, Yang Q, Li J, Zhou S. Effects of MDM2 inhibitors on vascular endothelial growth factor-mediated tumor angiogenesis in human breast cancer. *Angiogenesis*. 2014 Jan 1;17(1):37–50.
180. Zhao Y, Adjei AA. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *The Oncologist*. 2015 Jun;20(6):660–73.

181. Tredan O, Lacroix-Triki M, Guiu S, Mouret-Reynier M-A, Barriere J, Bidard F-C, et al. Angiogenesis and tumor microenvironment: bevacizumab in the breast cancer model. *Target Oncol.* 2015 Jun;10(2):189–98.
182. Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene.* 2011 Dec 19;31:4499.
183. Hunter KE, Palermo C, Kester JC, Simpson K, Li J-P, Tang LH, et al. Heparanase promotes lymphangiogenesis and tumor invasion in pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncogene.* 2014 Apr 3;33(14):1799–808.
184. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science.* 2015 Apr 3;348(6230):74–80.
185. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, et al. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol.* 2014;122:91–128.
186. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 2015 Nov 1;368(1):7–13.
187. Virchow R. *Die Cellularpathologie in Ihrer Begründung auf Physiologische und Pathologische Gewebelehre.* Berlin; 1859.
188. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N Engl J Med.* 1986 Dec 25;315(26):1650–9.
189. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol.* 2015 Aug;173(2):370–8.
190. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833(12):3481–98.
191. Byun JS, Gardner K. Wounds That Will Not Heal: Pervasive Cellular Reprogramming in Cancer. *Am J Pathol.* 2013 Apr;182(4):1055–64.
192. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 May;6(5):392–401.
193. Ryan GB, Cliff WJ, Gabbiani G, Irle C, Statkov PR, Majno G. Myofibroblasts in an avascular fibrous tissue. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 1973 Aug;29(2):197–206.
194. Ryan GB, Cliff WJ, Gabbiani G, Irle C, Montandon D, Statkov PR, et al. Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum Pathol.* 1974 Jan;5(1):55–67.
195. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci Landmark Ed.* 2010;15:166–79.
196. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011 Mar 12;1(4):482–97.

197. Stanisavljevic J, Loubat-Casanovas J, Herrera M, Luque T, Peña R, Lluch A, et al. Snail1-Expressing Fibroblasts in the Tumor Microenvironment Display Mechanical Properties That Support Metastasis. *Cancer Res.* 2015 Jan 15;75(2):284.
198. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. Lin H-J, editor. *Cancers.* 2015 Dec;7(4):2443–58.
199. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour–stroma interaction. *Br J Cancer.* 2014 Jan 21;110(2):469–78.
200. Pan B, Liao Q, Niu Z, Zhou L, Zhao Y. Cancer-associated fibroblasts in pancreatic adenocarcinoma. *Future Oncol Lond Engl.* 2015 Sep;11(18):2603–10.
201. Bai Y-P, Shang K, Chen H, Ding F, Wang Z, Liang C, et al. FGF-1/-3/FGFR4 signaling in cancer-associated fibroblasts promotes tumor progression in colon cancer through Erk and MMP-7. *Cancer Sci.* 2015 Oct;106(10):1278–87.
202. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 2005 May 6;121(3):335–48.
203. Papatheodorou H, Papanastasiou AD, Sirinian C, Scopa C, Kalofonos HP, Leotsinidis M, et al. Expression patterns of SDF1/CXCR4 in human invasive breast carcinoma and adjacent normal stroma: Correlation with tumor clinicopathological parameters and patient survival. *Pathol - Res Pr.* 2014 Oct 1;210(10):662–7.
204. Herrera M, Herrera A, Domínguez G, Silva J, García V, García JM, et al. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci.* 2013 Jan 9;104(4):437–44.
205. Harper J, Sainson RCA. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Cancer-Assoc Fibroblasts.* 2014 Apr 1;25:69–77.
206. Takahashi H, Sakakura K, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Toyoda M, Nishiyama M, et al. Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 Nov 1;64(11):1407–17.
207. Erez N, Glanz S, Raz Y, Avivi C, Barshack I. Cancer Associated Fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Aug 2;437(3):397–402.
208. Servais C, Erez N. From sentinel cells to inflammatory culprits: cancer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation. *J Pathol.* 2013 Jan;229(2):198–207.

209. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncol Williston Park N.* 2014 Dec;28(12):1101–7, 1110.
210. Lotti F, Jarrar AM, Pai RK, Hitomi M, Lathia J, Mace A, et al. Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J Exp Med.* 2013 Dec 16;210(13):2851–72.
211. Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 Expressed on Cancer-Associated Fibroblasts Is a Functional Molecule Supporting the Stemness and Drug Resistance of Malignant Cancer Cells in the Tumor Microenvironment. *STEM CELLS.* 2013 Oct 1;32(1):145–56.
212. Matsuda Y, Kure S, Ishiwata T. Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer. *Med Mol Morphol.* 2012 Jun;45(2):59–65.
213. Tsuyada A, Chow A, Wu J, Somlo G, Chu P, Loera S, et al. CCL2 mediates crosstalk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Res.* 2012 Jun 1;72(11):2768–79.
214. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science.* 1956 Feb 24;123(3191):309.
215. Gonzalez CD, Alvarez S, Ropolo A, Rosenzvit C, Gonzalez Bagnes MF, Vaccaro MI. Autophagy, Warburg, and Warburg Reverse Effects in Human Cancer. *BioMed Res Int.* 2014;2014:926729.
216. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle Georget Tex.* 2009 Dec;8(23):3984–4001.
217. Paolicchi E, Gemignani F, Krstic-Demonacos M, Dedhar S, Mutti L, Landi S. Targeting hypoxic response for cancer therapy. *Oncotarget.* 2016 Mar 22;7(12):13464–78.
218. Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Daumer KM, Milliman JN, Chiavarina B, et al. Tumor cells induce the cancer associated fibroblast phenotype via caveolin-1 degradation: implications for breast cancer and DCIS therapy with autophagy inhibitors. *Cell Cycle Georget Tex.* 2010 Jun 15;9(12):2423–33.
219. CHEN D, CHE G. Value of caveolin-1 in cancer progression and prognosis: Emphasis on cancer-associated fibroblasts, human cancer cells and mechanism of caveolin-1 expression (Review). *Oncol Lett.* 2014 Oct;8(4):1409–21.
220. Bovenzi CD, Hamilton J, Tassone P, Johnson J, Cognetti DM, Luginbuhl A, et al. Prognostic Indications of Elevated MCT4 and CD147 across Cancer Types: A Meta-Analysis. *BioMed Res Int.* 2015;2015:242437.
221. Drebert Z, De Vlieghere E, Bridelance J, De Wever O, De Bosscher K, Bracke M, et al. Glucocorticoids indirectly decrease colon cancer cell proliferation and invasion via effects on cancer-associated fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2018 Jan 15;362(2):332–42.

222. Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, De Wever O. Cancer-Associated Fibroblasts Connect Metastasis-Promoting Communication in Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2015;5:63.
223. Li W, Zhang X, Wang J, Li M, Cao C, Tan J, et al. TGF β 1 in fibroblasts-derived exosomes promotes epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Nov 10;8(56):96035–47.
224. Jahangiri B, Khalaj-kondori M, Asadollahi E, Sadeghizadeh M. Cancer-associated fibroblasts enhance cell proliferation and metastasis of colorectal cancer SW480 cells by provoking long noncoding RNA UCA1. *J Cell Commun Signal* [Internet]. 2018 Jun 11; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0471-5>
225. Meng W, Xue S, Chen Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. *Gene*. 2018 Jan 30;641:105–10.
226. Fidler IJ, Kripke ML. The challenge of targeting metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2015 Dec;34(4):635–41.
227. Guan J, Zhang H, Wen Z, Gu Y, Cheng Y, Sun Y, et al. Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells. *Cancer Lett*. 2014 Apr 1;345(1):132–9.
228. Yu Y, Xiao C-H, Tan L-D, Wang Q-S, Li X-Q, Feng Y-M. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *Br J Cancer*. 2014 Feb 4;110(3):724–32.
229. Alba-Castellón L, Olivera-Salguero R, Mestre-Farrera A, Peña R, Herrera M, Bonilla F, et al. Snail1-Dependent Activation of Cancer-Associated Fibroblast Controls Epithelial Tumor Cell Invasion and Metastasis. *Cancer Res*. 2016 Nov 1;76(21):6205.
230. Schmitz S, Bindea G, Albu RI, Mlecnik B, Machiels J-P. Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer. *Oncotarget*. 2015 Oct 27;6(33):34288–99.
231. Hassona Y, Cirillo N, Heesom K, Parkinson EK, Prime SS. Senescent cancer-associated fibroblasts secrete active MMP-2 that promotes keratinocyte dis-cohesion and invasion. *Br J Cancer*. 2014 Sep 9;111(6):1230–7.
232. Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of. *J Cell Sci*. 2005 May 15;118(Pt 10):2143–53.
233. Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, Nagasaka K, et al. Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 in Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) Is Suppressed by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids In Vitro and In Vivo. Zhou Z, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89605.
234. Hastie EL, Sherwood DR. A new front in cell invasion: The invadopodial membrane. *Integr Mechano-Chem Signals Invasion*. 2016 Nov 1;95(11):441–8.

235. Goicoechea S, García-Mata R, Staub J, Valdivia A, Sharek L, McCulloch C, et al. Palladin promotes invasion of pancreatic cancer cells by enhancing invadopodia formation in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*. 2014 Mar 6;33(10):1265–73.
236. Glentis A, Oertle P, Mariani P, Chikina A, El Marjou F, Attieh Y, et al. Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nat Commun*. 2017;8:924.
237. Gonzalez-Zubeldia I, Dotor J, Redrado M, Bleau A-M, Manrique I, de Aberasturi AL, et al. Co-migration of colon cancer cells and CAFs induced by TGF β 1 enhances liver metastasis. *Cell Tissue Res*. 2015 Mar 1;359(3):829–39.
238. Ao Z, Shah SH, Machlin LM, Parajuli R, Miller PC, Rawal S, et al. Identification of Cancer-Associated Fibroblasts in Circulating Blood from Patients with Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res*. 2015 Nov 15;75(22):4681.
239. Choi YP, Lee JH, Gao M-Q, Kim BG, Kang S, Kim SH, et al. Cancer-associated fibroblast promote transmigration through endothelial brain cells in three-dimensional in vitro models. *Int J Cancer*. 2014 Mar 18;135(9):2024–33.
240. McCarthy JB, El-Ashry D, Turley EA. Hyaluronan, Cancer-Associated Fibroblasts and the Tumor Microenvironment in Malignant Progression. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6:48.
241. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014 Jul 28;211(8):1503–23.
242. Berdiel-Acer M, Sanz-Pamplona R, Calon A, Cuadras D, Berenguer A, Sanjuan X, et al. Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol*. 2014 Oct;8(7):1290–305.
243. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Nov 16;107(46):20009.
244. Cadamuro M, Nardo G, Indraccolo S, Dall’Olmo L, Sambado L, Moserle L, et al. Platelet-derived growth factor-D and Rho GTPases regulate recruitment of cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2013;58(3):1042–53.
245. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Onoyama M, Ohnishi M, et al. Stroma-directed imatinib therapy impairs the tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an orthotopic transplantation model of colon cancer. *Int J Cancer*. 2013;132(4):813–23.
246. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo TK, et al. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1999 May;5(5):1041–56.

247. Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, Sattler B, Hummel K, Becker V, et al. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int.* 2000 Apr 1;57(4):1521–38.
248. Shimoda M, Principe S, Jackson HW, Luga V, Fang H, Molyneux SD, et al. Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state. *Nat Cell Biol.* 2014 Aug 24;16:889.
249. Shen H, Yu X, Yang F, Zhang Z, Shen J, Sun J, et al. Reprogramming of Normal Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts by miRNAs-Mediated CCL2/VEGFA Signaling. Augsten M, editor. *PLoS Genet.* 2016 Aug;12(8):e1006244.
250. Takebe N, Ivy P, Timmer W, Khan N, Schulz T, Harris PJ. Review of Cancer – Associated Fibroblasts and Therapies that Interfere with Their Activity. *Tumor Microenviron Ther.* 2013 Jan 13;1:19–36.
251. Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Jun;31(1-2):195–208.
252. Madar S, Goldstein I, Rotter V. “Cancer associated fibroblasts” – more than meets the eye. *Trends Mol Med.* 2013 Aug 1;19(8):447–53.
253. Gascard P, Tlsty TD. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* 2016 May 1;30(9):1002–19.
254. Elkabets M, Gifford AM, Scheel C, Nilsson B, Reinhardt F, Bray M-A, et al. Human tumors instigate granulysin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *J Clin Invest.* 2011 Feb 1;121(2):784–99.
255. Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. Fibrosis and Cancer: Do Myofibroblasts Come Also From Epithelial Cells Via EMT? *J Cell Biochem.* 2007 Jul 1;101(4):830–9.
256. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10123.
257. Nuschke A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. *Organogenesis.* 2014 Jan 1;10(1):29–37.
258. Zhu W, Sun H, Lyu G. Advances in the mechanism of mesenchymal stem cells in promoting wound healing. *Chin J Burns.* 2015 Dec;31(6):476–8.
259. Barcellos-de-Souza P, Gori V, Bambi F, Chiarugi P. Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1836(2):321–35.

260. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, et al. Carcinoma Associated Fibroblast Like Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res.* 2008 Jun 1;68(11):4331–9.
261. Direkze NC, HodiVala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, et al. Bone Marrow Contribution to Tumor-Associated Myofibroblasts and Fibroblasts. *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8492–5.
262. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell.* 2011 Feb 15;19(2):257–72.
263. Peng Y, Li Z, Li Z. GRP78 secreted by tumor cells stimulates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to cancer-associated fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 1;440(4):558–63.
264. Peng Y, Li Z, Yang P, Newton IP, Ren H, Zhang L, et al. Direct contacts with colon cancer cells regulate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into tumor associated fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Aug 15;451(1):68–73.
265. Shanguan L, Li X, Wang Z, Luo Z. Transforming growth factor-beta1 induces bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into cancer-associated fibroblasts. *Chin J Oncol.* 2015 Nov;37(11):804–9.
266. Yang X, Hao J, Mao Y, Jin Z-Q, Cao R, Zhu C-H, et al. bFGF Promotes Migration and Induces Cancer-Associated Fibroblast Differentiation of Mouse Bone Mesenchymal Stem Cells to Promote Tumor Growth. *Stem Cells Dev.* 2016 Sep 12;
267. Mi Z, Bhattacharya SD, Kim VM, Guo H, Talbot LJ, Kuo PC. Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. *Carcinogenesis.* 2011 Jan 20;32(4):477–87.
268. Weber CE, Kothari AN, Wai PY, Li NY, Driver J, Zapf MA, et al. Osteopontin Mediates an MZF1-TGF- β 1-Dependent Transformation of Mesenchymal Stem Cells into Cancer Associated Fibroblasts in Breast Cancer. *Oncogene.* 2015 Sep 10;34(37):4821–33.
269. Luo H, Tu G, Liu Z, Liu M. Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Lett.* 2015 Jun 1;361(2):155–63.
270. LeBleu VS, Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech.* 2018 Apr 1;11(4):dmm029447.
271. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016 Aug 23;16:582.
272. De Wever O, Van Bockstal M, Mareel M, Hendrix A, Bracke M. Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. *Cancer-Assoc Fibroblasts.* 2014 Apr 1;25:33–46.

273. Buchsbaum RJ, Oh SY. Breast Cancer-Associated Fibroblasts: Where We Are and Where We Need to Go. Lin H-J, editor. *Cancers*. 2016 Feb;8(2):19.
274. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*. 2017;8(5):761–73.
275. Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*. 2009 Feb;19(1):67–73.
276. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2014;4:62.
277. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*. 2006 Dec;5(12):1640–6.
278. Attieh Y, Vignjevic DM. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *Integr Mechano-Chem Signals Invasion*. 2016 Nov 1;95(11):493–502.
279. Kuzet S-E, Gaggioli C. Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res*. 2016 Sep;365(3):607–19.
280. Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Dec;19(6):R187–204.
281. Krušlin B, Ulamec M, Tomas D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn J Basic Med Sci*. 2015 May;15(2):1–8.
282. Liu Z-Q, Fang J-M, Xiao Y-Y, Zhao Y, Cui R, Hu F, et al. Prognostic role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(2):2289–98.
283. Antonarakis ES, Carducci MA. Targeting angiogenesis for the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Apr 1;16(4):365–76.
284. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 Jun;15(6):385–403.
285. Hussein M-RA, Al-Assiri M, Musalam AO. Phenotypic characterization of the infiltrating immune cells in normal prostate, benign nodular prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2009 Apr;86(2):108–13.
286. Gurel B, Lucia MS, Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Kristal AR, et al. Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the Prostate Cancer Prevention Trial(). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2014 May;23(5):847–56.
287. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, et al. The Controversial Relationship Between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: The Role of Inflammation. *Eur Urol*. 2011 Jul 1;60(1):106–17.

288. Davidsson S, Ohlson A-L, Andersson S-O, Fall K, Meisner A, Fiorentino M, et al. CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3⁺ regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer. *Mod Pathol*. 2012 Oct 5;26:448.
289. Woo JR, Liss MA, Muldong MT, Palazzi K, Strasner A, Ammirante M, et al. Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. *J Transl Med*. 2014;12:30–30.
290. Lanciotti M, Masieri L, Raspollini MR, Minervini A, Mari A, Comito G, et al. The Role of M1 and M2 Macrophages in Prostate Cancer in relation to Extracapsular Tumor Extension and Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. *BioMed Res Int*. 2014;2014:486798.
291. Comito G, Giannoni E, Segura CP, Barcellos-de-Souza P, Raspollini MR, Baroni G, et al. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene*. 2014 May 8;33(19):2423–31.
292. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium. *Cancer Res*. 1999 Oct 1;59(19):5002–11.
293. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, et al. Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness. *Cancer Res*. 2010 Sep 1;70(17):6945.
294. Liao C-P, Adisetiyo H, Liang M, Roy-Burman P. Cancer-Associated Fibroblasts Enhance the Gland-Forming Capability of Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Res*. 2010 Sep 15;70(18):7294–303.
295. Geary LA, Nash KA, Adisetiyo H, Liang M, Liao C-P, Jeong JH, et al. CAF-secreted Annexin A1 Induces Prostate Cancer Cells to Gain Stem Cell-like Features. *Mol Cancer Res MCR*. 2014 Apr;12(4):607–21.
296. Adisetiyo H, Liang M, Liao C-P, Jeong JH, Cohen MB, Roy-Burman P, et al. Dependence of Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC) Stem Cells on CRPC-Associated Fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2014 Sep;229(9):1170–6.
297. Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Chiarugi P. Cancer Associated Fibroblasts Exploit Reactive Oxygen Species Through a Proinflammatory Signature Leading to Epithelial Mesenchymal Transition and Stemness. *Antioxidants Redox Signal*. 2011 Jan 14;14(12):2361–71.
298. Jones ML, Siddiqui J, Pienta KJ, Getzenberg RH. Circulating fibroblast-like cells in men with metastatic prostate cancer. *The Prostate*. 2013 Jan;73(2):176–81.
299. Doldi V, Callari M, Giannoni E, D’Aiuto F, Maffezzini M, Valdagni R, et al. Integrated gene and miRNA expression analysis of prostate cancer associated fibroblasts supports a prominent role for interleukin-6 in fibroblast activation. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):31441–60.

300. Jung Y, Kim JK, Shiozawa Y, Wang J, Mishra A, Joseph J, et al. Recruitment of Mesenchymal Stem Cells Into Prostate Tumors Promotes Metastasis. *Nat Commun.* 2013;4:1795–1795.
301. Castanares MA, Copeland BT, Chowdhury WH, Liu MM, Rodriguez R, Pomper MG, et al. Characterization of a Novel Metastatic Prostate Cancer Cell Line of LNCaP Origin. *The Prostate.* 2016 Feb;76(2):215–25.
302. Laverman P, van der Geest T, Terry SYA, Gerrits D, Walgreen B, Helsen MM, et al. Immuno-PET and Immuno-SPECT of Rheumatoid Arthritis with Radiolabeled Anti-Fibroblast Activation Protein Antibody Correlates with Severity of Arthritis. *J Nucl Med.* 2015 May 1;56(5):778–83.
303. Hamson EJ, Keane FM, Tholen S, Schilling O, Gorrell MD. Understanding fibroblast activation protein (FAP): Substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *PROTEOMICS – Clin Appl.* 2014 Jan 28;8(5-6):454–63.
304. Dong R, Guo J, Zhang Z, Zhou Y, Hua Y. Polyphyllin I inhibits gastric cancer cell proliferation by downregulating the expression of fibroblast activation protein alpha (FAP) and hepatocyte growth factor (HGF) in cancer-associated fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Mar 18;497(4):1129–34.
305. Wikberg ML, Edin S, Lundberg IV, Van Guelpen B, Dahlin AM, Rutegård J, et al. High intratumoral expression of fibroblast activation protein (FAP) in colon cancer is associated with poorer patient prognosis. *Tumour Biol.* 2013 Apr;34(2):1013–20.
306. Tran E, Chinnasamy D, Yu Z, Morgan RA, Lee C-CR, Restifo NP, et al. Immune targeting of fibroblast activation protein triggers recognition of multipotent bone marrow stromal cells and cachexia. *J Exp Med.* 2013 Jun 3;210(6):1125–35.
307. Maria F. Garcia, Victoria Calzada, Ximena Camacho, Enzo Goicochea, Juan Pablo Gambini, Thomas P. Quinn, et al. Microwave-assisted Synthesis of HYNIC Protected Analogue for ^{99m}Tc Labeled Antibody. *Curr Radiopharm.* 2014;7(2):84–90.
308. Khalil MM, Tremoleda JL, Bayomy TB, Gsell W. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int J Mol Imaging.* 2011;2011:796025.
309. Francesconi L. *Technetium: Chemistry and Radiopharmaceutical Applications* By K. Schwochau (Forschungszentrum Jülich, Germany). Wiley-VCH: Weinheim. 2000. xii + 446 pp. DM 348. ISBN: 3-527-29496-1. *J Am Chem Soc.* 2001 Dec 1;123(48):12126–12126.
310. Abrams MJ, Juweid M, tenKate CI, Schwartz DA, Hauser MM, Gaul FE, et al. Technetium-99m-Human Polyclonal IgG Radiolabeled via the Hydrazino Nicotinamide Derivative for Imaging Focal Sites of Infection in Rats. *J Nucl Med.* 1990 Dec 1;31(12):2022–8.

311. Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K, Ordonez NG, Killion JJ, Fidler IJ. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1992 Jun 17;84(12):951–7.
312. El Bitar Z, Huesman RH, Buchko R, Bekaert V, Brasse D, Gullberg GT. A detector response function design in pinhole SPECT including geometrical calibration. *Phys Med Biol.* 2013 Apr 7;58(7):2395–411.
313. Yang F, Chen Y, Shen T, Guo D, Dakhova O, Ittmann MM, et al. Stromal TGF- β signaling induces AR activation in prostate cancer. *Oncotarget.* 2014 Nov;5(21):10854–69.
314. Yu S, Xia S, Yang D, Wang K, Yeh S, Gao Z, et al. Androgen receptor in human prostate cancer-associated fibroblasts promotes prostate cancer epithelial cell growth and invasion. *Med Oncol.* 2013 Aug 8;30(3):674.
315. Leach DA, Need EF, Toivanen R, Trotta AP, Palenthorpe HM, Tamblyn DJ, et al. Stromal androgen receptor regulates the composition of the microenvironment to influence prostate cancer outcome. *Oncotarget.* 2015 Jun 30;6(18):16135–50.
316. Tamamis P, Floudas CA. Elucidating a Key Component of Cancer Metastasis: CXCL12 (SDF-1 α) Binding to CXCR4. *J Chem Inf Model.* 2014 Apr 28;54(4):1174–88.
317. Yamaguchi H, Sakai R. Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion. Lin H-J, editor. *Cancers.* 2015 Dec;7(4):2054–62.
318. Cortez E, Roswall P, Pietras K. Functional subsets of mesenchymal cell types in the tumor microenvironment. *Cancer-Assoc Fibroblasts.* 2014 Apr 1;25:3–9.
319. Ridge SM, Bhattacharyya D, Dervan E, Naicker SD, Burke AJ, Murphy JM, et al. Secreted factors from metastatic prostate cancer cells stimulate mesenchymal stem cell transition to a pro-tumourigenic “activated” state that enhances prostate cancer cell migration. *Int J Cancer.* 2018 May 15;142(10):2056–67.
320. Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell.* 2018 Mar 12;33(3):463–479.e10.
321. Paunescu V, Bojin FM, Tatu CA, Gavriiliuc OI, Rosca A, Gruia AT, et al. Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J Cell Mol Med.* 2011 Mar;15(3):635–46.
322. Johann PD, Müller I. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: Possible Culprits in Solid Tumors? *Stem Cells Int.* 2015;2015:914632.
323. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer.* 2017 Feb 1;16(1):31.

324. Vizoso M, Puig M, Carmona Fj, Maqueda M, Velásquez A, Gómez A, et al. Aberrant DNA methylation in non-small cell lung cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis*. 2015 Dec;36(12):1453–63.
325. Xiao Q, Zhou D, Rucki AA, Williams J, Zhou J, Mo G, et al. Cancer associated fibroblasts in pancreatic cancer are reprogrammed by tumor-induced alterations in genomic DNA methylation. *Cancer Res*. 2016 Sep 15;76(18):5395–404.
326. Yu J, Walter K, Omura N, Hong S-M, Young A, Li A, et al. Unlike Pancreatic Cancer Cells Pancreatic Cancer Associated Fibroblasts Display Minimal Gene Induction after 5-Aza-2'-Deoxycytidine. Christensen BC, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e43456.
327. Ruff M, Leyme A, Le Cann F, Bonnier D, Le Seyec J, Chesnel F, et al. The Disintegrin and Metalloprotease ADAM12 Is Associated with TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. Katoh M, editor. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0139179.
328. Tyan S-W, Hsu C-H, Peng K-L, Chen C-C, Kuo W-H, Lee EY-HP, et al. Breast Cancer Cells Induce Stromal Fibroblasts to Secrete ADAMTS1 for Cancer Invasion through an Epigenetic Change. Futscher BW, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35128.
329. Hedlund E, Deng Q. Single-cell RNA sequencing: Technical advancements and biological applications. *Emerg Field Single-Cell Anal*. 2018 Feb 1;59:36–46.
330. Van Soest RJ, Efstathiou JA, Sternberg CN, Tombal B. The Natural History and Outcome Predictors of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol Focus*. 2016 Dec 1;2(5):480–7.
331. Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC. ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls. *PROTEOMICS – Clin Appl*. 2015 Jan 23;9(3-4):406–22.
332. Riis S, Stensballe A, Emmersen J, Pennisi CP, Birkelund S, Zachar V, et al. Mass spectrometry analysis of adipose-derived stem cells reveals a significant effect of hypoxia on pathways regulating extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:52.
333. Nath S, Devi GR. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacol Ther*. 2016 Jul;163:94–108.
334. Eder T, Weber A, Neuwirt H, Grünbacher G, Ploner C, Klocker H, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Modify the Response of Prostate Cancer Cells to Androgen and Anti-Androgens in Three-Dimensional Spheroid Culture. Cho WC, editor. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep;17(9):1458.
335. Zhang Y, Hong H, Cai W. PET Tracers Based on Zirconium-89. *Curr Radiopharm*. 2011 Apr 1;4(2):131–9.
336. Spans L, Helsen C, Clinckemalie L, Van den Broeck T, Prekovic S, Joniau S, et al. Comparative Genomic and Transcriptomic Analyses of LNCaP and C4-2B Prostate Cancer Cell Lines. Agoulnik IU, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e90002.

337. DU Y, LONG Q, ZHANG L, SHI Y, LIU X, LI X, et al. Curcumin inhibits cancer-associated fibroblast-driven prostate cancer invasion through MAOA/mTOR/HIF-1 α signaling. *Int J Oncol*. 2015 Dec;47(6):2064–72.
338. Pavan AR, da Silva GDB, Jornada DH, Chiba DE, Fernandes GF dos S, Man Chin C, et al. Unraveling the Anticancer Effect of Curcumin and Resveratrol. *Nutrients*. 2016 Nov;8(11):628.
339. Jordan BC, Mock CD, Thilagavathi R, Selvam C. Molecular Mechanisms of Curcumin and Its Semisynthetic Analogues in Prostate Cancer Prevention and Treatment. *Life Sci*. 2016 May 1;152:135–44.
340. Qiao-Hong Chen. Curcumin-Based Anti-Prostate Cancer Agents. *Former Curr Med Chem - Anti-Cancer Agents*. 2015;15(2):138–56.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

1 revue acceptée :

Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate

Edwige Schreyer, Philippe Barthélémy, Félicie Cottard, Pauline Ould Madi-Berthélémy, Frédérique Schaff-Wendling, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline
Med Sci (Paris) 33 (8-9) 758-764 (2017)

DOI: 10.1051/medsci/20173308021

Détail ci-après

1 publication soumise :

Constitutively active androgen receptor variant enhances mesenchymal stem cells differentiation into cancer associated fibroblasts

Edwige Schreyer, Eva Erdmann, Anne Maglott-Roth, Pauline Ould-Madi Berthélémy, Jocelyn Céraline

Publication soumise au journal scientifique PLOS ONE

1 publication en cours d'écriture :

Étude réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Emyr Bakker

Modelling the androgen receptor network as a fast track to drug repositioning for prostate cancer

Edwige Schreyer, Firozeh Ashtiani, Constantinos Demonacos, Luciano Mutti, Jocelyn Céraline, Marija Krstic-Demonacos, Emyr Bakker

Soumission prévue prochainement au journal scientifique PeerJ

Détail ci-après

► Le cancer de la prostate constitue un problème sanitaire majeur puisqu'il représente le cancer le plus fréquent chez l'homme de plus de 50 ans et la troisième cause de décès par cancer chez l'homme. Le traitement des patients atteints d'un cancer de la prostate avancé repose sur une castration médicale ayant pour conséquence une déprivation androgénique. L'émergence de mutations, ou de variants d'épissage, du récepteur des androgènes est cependant une caractéristique de l'histoire naturelle du cancer de la prostate. Cette revue se focalise sur les variants constitutivement actifs du récepteur des androgènes, responsables de la résistance de la tumeur à la castration médicale. ◀

Signalisation des androgènes et cancer de la prostate

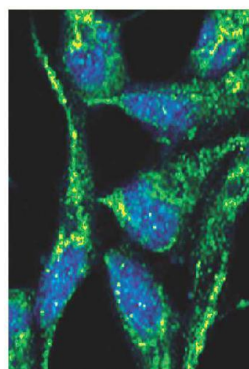
Le cancer de la prostate est le cancer masculin le plus fréquent en Europe et aux États-Unis. Il se situe au 1^{er} rang des cancers incidents chez l'homme de plus de 50 ans, loin devant les cancers du poumon et du côlon-rectum. Le taux d'incidence, standardisé en France en 2011, était équivalent à 97,7 pour 100 000 hommes, situant la France parmi les pays à fort taux d'incidence. Le taux de mortalité était de 10,5 pour 100 000 hommes, illustrant le fait que le cancer de la prostate représente la 3^e cause de décès par cancer chez l'homme, ce qui en fait actuellement un problème de santé publique majeur [1].

D'un point de vue physiologique, le développement, la croissance et la fonction de la prostate reposent sur la voie de signalisation des androgènes, dont fait partie la testostérone. La testostérone d'origine testiculaire, ou issue de la conversion de précurseurs surrenaux tels que la déhydroépiandrosterone (DHEA) et l'androstènedione, est convertie en 5 α -dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme 5 α -réductase, au niveau des tissus

Vignette (Photo © Inserm-Morad Roudbraraki).

Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate

Edwige Schreyer¹, Philippe Barthélémy^{1,3},
Félicie Cottard², Pauline Ould Madi-Berthélémy¹,
Frédérique Schaff-Wendling^{1,3},
Jean-Emmanuel Kurtz^{1,3}, Jocelyn Céraline^{1,3}



¹ Université de Strasbourg, Inserm, VSDSC UMR-S 1113, IGBMC, 1, rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, France.

² Department of urology, Center for Clinical research, University Freiburg Medical Center, Breisacherstrasse 66, D-79106 Freiburg, Allemagne.

³ Service d'oncologie et d'hématologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. ceraline@unistra.fr

cibles. Pour exercer son action, la DHT se fixe au récepteur des androgènes (RA), un facteur de transcription androgéno-dépendant, membre de la famille des récepteurs des hormones stéroïdes et de la superfamille des récepteurs nucléaires [2]. L'expression du RA est documentée à tous les stades d'évolution du cancer de la prostate, jouant ainsi un rôle-clé dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses prostatiques [3, 4] (→).

(→) Voir la Synthèse de F. Labrie et al., m/s n° 10, octobre 2003, page 910

Structure et fonction du récepteur des androgènes

Les fonctions de contrôle androgéno-dépendant de l'expression de gènes sont portées par les quatre domaines fonctionnels du RA : le domaine N-terminal (NTD), intrinsèquement désordonné, contenant la fonction d'activation transcriptionnelle AF-1 ; le domaine de liaison à l'ADN (DBD), très conservé, assurant la reconnaissance d'éléments de réponse aux androgènes (ARE) ; le domaine de liaison au ligand (LBD) contenant la fonction d'activation transcriptionnelle AF-2 ligand-dépendante ; et la région charnière (RC) entre le DBD et le LBD, qui contient le signal de localisation nucléaire [2] (Figure 1).

En l'absence de ligand, la stabilité du RA dans le cytoplasme est assurée par un complexe de protéines chaperonnes incluant les protéines de réponse au choc thermique (*heat shock proteins*, HSP) HSP40, HSP70 et HSP90, ainsi que les protéines co-chaperonnes p23, FKBP-4 (FK506

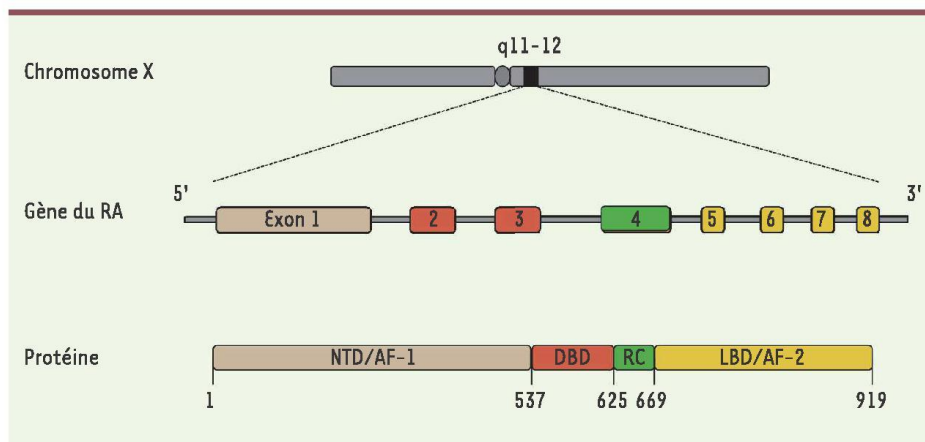


Figure 1. Structure moléculaire du gène codant la protéine du récepteur des androgènes (RA).

Le gène du RA est localisé sur le bras long du chromosome X et contient 8 exons. Domaines de la protéine : NTD : domaine amino-terminal ; AF-1 : fonction de transactivation 1 ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; RC : région charnière ; LBD : domaine de liaison du ligand ; AF-2 : fonction de transactivation 2.

binding protein 4) et SGTA (*small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha*). HSP90 permet le maintien d'une structure conformationnelle assurant une grande affinité du RA pour son ligand naturel, la dihydrotestostérone (DHT). La liaison de la DHT à son récepteur aboutit à la dissociation de HSP90 et au recrutement de HSP27 qui favorise la translocation nucléaire du RA, puis sa fixation aux ARE présents au niveau du promoteur et des régions activatrices en amont des gènes cibles [5]. Cette voie de signalisation correspond à la voie génomique, classique (ou canonique), du RA. Néanmoins, une autre voie de signalisation du RA existe, la voie non génomique. Dans cette dernière, le RA demeure dans le cytoplasme après la stimulation androgénique et active d'autres voies de signalisation intracellulaires convergeant vers la voie ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), puis, en aval, à l'activation de facteurs de transcription (Figure 2) [6].

Hormonothérapie du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate étant androgéno-dépendant, la première ligne de traitement pour les patients atteints à des stades avancés consiste en une privation androgénique par castration médicale [7]. Ce traitement vise à supprimer la production d'androgènes testiculaires, soit par désensibilisation des récepteurs hypophysaires de la gonadolibérine (LHRH), au moyen d'agonistes de la LHRH à action prolongée, soit par blocage direct des récepteurs hypophysaires de la LHRH, au moyen d'antagonistes de cette dernière (Dégarelix, Firmagon®). Afin de bloquer la contribution des précurseurs surrénaliens, la castration est, en plus, couplée à des anti-androgènes qui sont des antagonistes stéroïdiens, comme l'acétate de cyprotérone, ou non stéroïdiens, comme le flutamide, le nilutamide et le bicalutamide [8]. Une seconde génération d'anti-androgènes non stéroïdiens, comme l'enzalutamide, a été développée ces dernières années [9]. L'enzalutamide présente une affinité accrue pour le RA, limite le transport nucléaire, altère la liaison de l'ADN aux ARE et le recrutement de coactivateurs [9]. Le blocage androgénique complet consiste également en un couplage de la castration à un inhibiteur de la voie de biosynthèse des androgènes, comme l'acétate d'abi-

ratérone. Cette molécule est un inhibiteur sélectif et irréversible du cytochrome CYP17A1 (aussi appelé 17 α hydroxylase/17,20 desmolase), une enzyme clé de la voie de biosynthèse de la testostérone aux niveaux testiculaire, surrénalien mais aussi intratumoral [10].

Résistance à la castration

La résistance à la castration est définie par la reprise évolutive, biologique et/ou clinique, du cancer malgré une castration efficace. Bien que 80 % des patients répondent à la première ligne d'hormonothérapie, tous présentent une reprise évolutive survenant avec un délai très variable après la mise en place de la castration. Des mécanismes RA-indépendants comme la substitution du RA par le récepteur des glucocorticoïdes [11], l'activation de voies mitogéniques, et la surexpression de la cycline D1, peuvent conduire à une résistance à la castration [12]. La surexpression de facteurs anti-apoptotiques, comme Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), TP53INP1 (*tumor protein P53 inducible nuclear protein 1*) et HSP27 est également associée à la résistance à la castration [13].

La résistance à la castration est notamment due à la sélection d'évènements moléculaires à l'origine du maintien des activités du RA en dépit des faibles taux d'androgènes produits par la castration. Ces évènements se subdivisent classiquement en mécanismes dits ligand-dépendants et ligand-indépendants. Les cellules cancéreuses prostatiques peuvent ainsi contourner la castration en augmentant la synthèse paracrine de DHT au sein du stroma tumoral, à partir de la testostérone circulante [14]. Les cellules cancéreuses prostatiques peuvent également acquérir une hypersensibilité aux androgènes, par une surexpression du RA. Une amplification du gène du RA a été mise en évidence



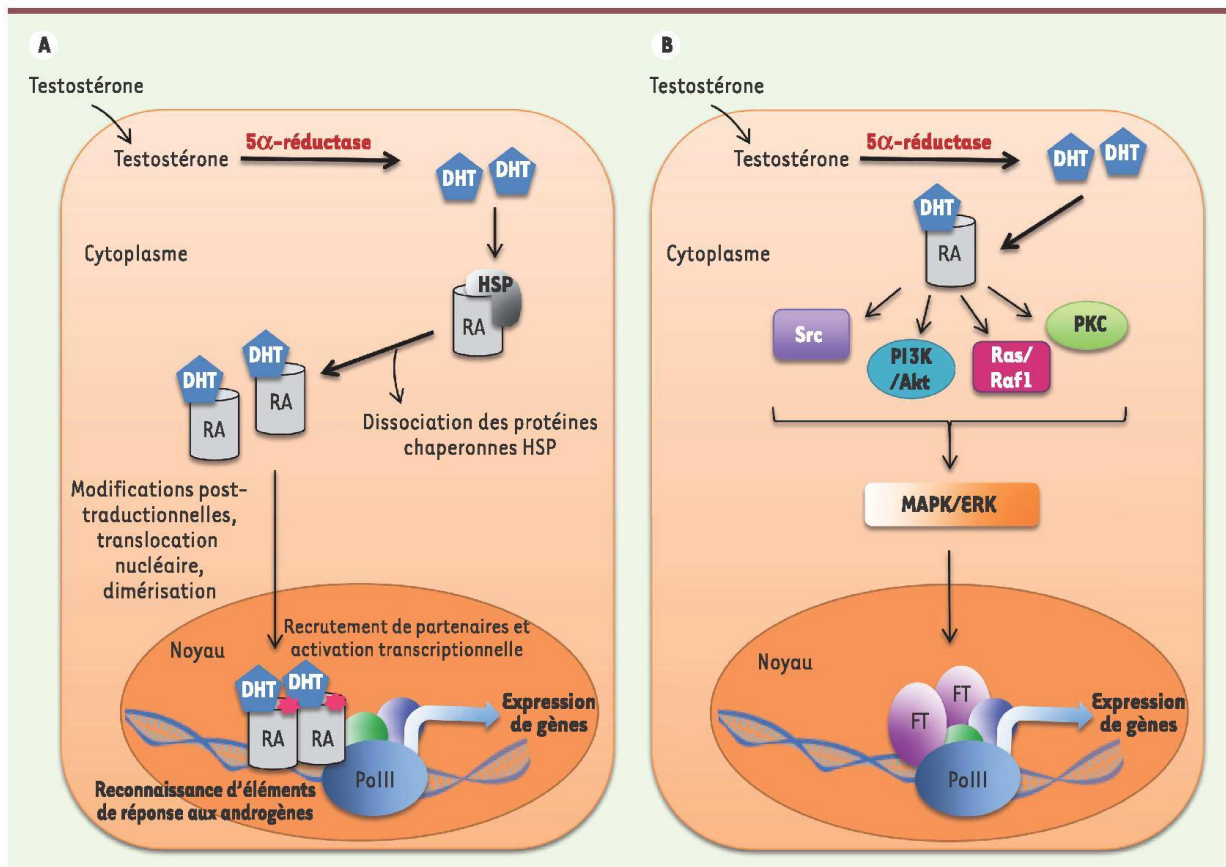


Figure 2. Voies de signalisation génomique (A) et non génomique (B) du récepteur des androgènes (RA). En l'absence de ligand, le RA est maintenu sous une forme inactive dans le cytoplasme, lié à des protéines chaperonnes de choc thermique (HSP). Les modifications conformationnelles du RA suite à la liaison du ligand entraînent la dissociation des protéines chaperonnes. Les activités génomiques du RA requièrent des modifications post-traductionnelles, la translocation nucléaire, la reconnaissance d'éléments de réponse aux androgènes, et le recrutement de cofacteurs aboutissant ainsi au contrôle de l'expression de gènes cibles. Dans le mode d'action non génomique, une fois activé dans le cytoplasme suite à la liaison du ligand, le RA active des cascades de signalisation cytoplasmiques convergeant vers la voie ERK et l'activation en aval de facteurs de transcription. Les étoiles rouges représentent les modifications post-traductionnelle. DHT : dihydrotestostérone ; ERK : *extracellular signal-regulated kinases* ; FT : facteur de transcription ; MAPK : *mitogen-activated protein kinase* ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PKC : protéine kinase C ; RAF1 : *v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1* ; Src : proto-oncogène codant la tyrosine kinase Src.

dans 25-30 % des cancers de la prostate au stade de résistance à la castration [15]. L'augmentation de l'expression du RA peut également résulter d'une absence de sa dégradation à la suite d'une mutation du gène *SPOP* (*Speckle-type POZ protein*) qui code une ubiquitine ligase E3 [16]. La synergie avec des voies de signalisation dépendantes de facteurs de croissance, comme l'IGF-1 (facteur de croissance insulino-mimétique de type 1), le FGF7 (facteur de croissance des fibroblastes 7), l'EGF (facteur de croissance épidermique), le LHRH, les neuropeptides, et l'IL-6 (interleukine-6), ainsi que la modification du mode d'action des coactivateurs et des corépresseurs, sont susceptibles d'aboutir à la transactivation du RA en dépit des taux faibles résiduels d'androgènes circulants [17]. Un autre mécanisme récurrent, associé à la résistance à la castration, est l'émergence de formes mutées ou de variants d'épissage du RA [18].

Mutations ponctuelles du RA

Le gène du RA étant localisé sur le chromosome X en position q11-14, son expression est monoallélique chez les hommes. Il est donc raisonnable d'imaginer que toute mutation affectant les fonctions du RA dans une cellule donnée puisse induire un changement de phénotype. Si une perte de fonction est généralement attribuée aux mutations, ou altérations génétiques, touchant le RA dans le syndrome d'insensibilité aux androgènes (SIA), les mutations « gain de fonction » sont prépondérantes dans le cancer de la prostate. Ainsi, la région charnière et le LBD représentent des points chauds avec près de 45 % des mutations



décrites dans la littérature [19]. Ces mutations ont pour caractéristique majeure de modifier la poche de liaison du ligand formée par les résidus L702, N7056, Q712, Q739, W742, M750, et T878. De façon intéressante, les mutations L702H, W742C, H875Y et T878A représentent à elles seules près de 15 à 20 % des mutations du RA décrites dans le cancer de la prostate résistant à la castration. Ces mutations étendent la spécificité de reconnaissance du RA à d'autres stéroïdes. Ainsi, la mutation T878A augmente l'affinité du RA pour la progestérone et la médroxyprogestérone [20]. Certaines de ces mutations permettent la reconnaissance d'un composé à action anti-androgénique comme un agoniste [18, 21]. La mutation T878A est d'ailleurs retrouvée chez 40 % des patients traités par blocage androgénique complet et utilisant le flutamide comme antagoniste. Des données récentes montrent l'implication de la mutation T878A dans la résistance à l'acétate d'abiratéronne *via* la modification de la voie de biosynthèse des androgènes en faveur de la synthèse de progestérone à la suite de l'inhibition de CYP17A1. Les mutations du RA peuvent également être à l'origine d'une résistance aux nouveaux anti-androgènes. Ainsi, la mutation F876L, touchant le résidu phénylalanine en position 876, près de la poche de liaison du ligand, confère une résistance *in vitro* et *in vivo* à l'enzalutamide et à l'ARN-509, deux anti-androgènes de seconde génération [22].

Mutations non-sens et variants d'épissage du RA

De nombreux variants¹ du RA, se caractérisant par l'absence de la région carboxy-terminale, ont été décrits dans le cancer de la prostate résistant à la castration. Ces variants peuvent être générés par clivage protéolytique du RA par la calpaïne 2, une protéase dépendante du calcium. Ce mécanisme a été mis en évidence dans des cellules de la lignée cancéreuse prostatique humaine 22RV1 [23]. À noter que le niveau d'expression de la calpaïne 2 est en effet plus élevé dans des cancers de la prostate métastatiques, en comparaison à des cancers localisés [24]. La présence de ces variants tronqués de la région C-terminale peut également s'expliquer par des mutations non-sens au niveau de l'exon 4 du gène du récepteur. Ces mutations provoquent l'apparition de codons *stop* prématurés au niveau de la région charnière ou de la partie proximale du LBD [25, 26]. Enfin, des épissages alternatifs des transcrits du RA produisent également des formes tronquées du récepteur [24]. Ces cinq dernières années, 17 variants tronqués du RA, issus de ces épissages alternatifs, ont ainsi été identifiés dans plusieurs lignées cellulaires ou modèles de xénotransferts de cancer de la prostate, ainsi que dans des échantillons isolés de patients (Figure 3). Parmi ces variants d'épissage, les variants AR-V7 et AR-V567es ont été particulièrement étudiés, notamment en raison de la disponibilité d'anticorps spécifiques qui ont permis l'étude de leur expression par immunohistochimie dans des échantillons tumoraux provenant de patients. Deux mécanismes moléculaires conduisent à l'expression de ces

variants. Le premier consiste en un réarrangement au niveau du locus du gène du RA. Le deuxième repose sur une modification de l'expression de certains gènes du complexe protéique impliqué dans l'épissage, comme hnRNPA1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*), DDX39A et DDX39B (*DEAD-Box helicase 39A et 39B*) [27-29].

Tous les variants d'épissage du RA délétés de la partie C-terminale ne présentent pas nécessairement une activité androgéno-indépendante constitutive. En effet, seuls les variants possédant un signal de localisation nucléaire (NLS) sur la protéine présentent cette caractéristique. Le NLS bipartite du RA, au niveau des exons 3 et 4, peut en effet être conservé, comme c'est le cas pour le variant ARV567es, ou un NLS peut être apporté par la séquence intronique retenue. Cependant, le variant AR-V7 constitue une exception. Il présente en effet une localisation nucléaire et une activité constitutive ligand indépendante et ce, en l'absence même de signal de translocation nucléaire.

Plusieurs données concordantes montrent une augmentation sous castration de l'expression des variants d'épissage au cours du temps [30]. Des taux très faibles de variants du RA ont ainsi été détectés dans les tissus prostatiques non cancéreux, de même que dans les formes localisées de cancer de la prostate, avant toute hormonothérapie, alors que ces taux sont bien plus élevés au stade de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration. Le rapport entre les variants courts (tronqués) du RA et la forme sauvage du récepteur évolue donc au cours du temps.

Propriétés fonctionnelles des variants du RA délétés du domaine carboxy-terminal

La sélection positive de variants du RA à activité transcriptionnelle ligand-indépendante est un paradigme de mécanisme de résistance du cancer de la prostate à la castration. Ces variants sont initialement exprimés dans des tumeurs primaires, mais leur expression est augmentée dans les métastases osseuses isolées de patients résistants à la castration [31]. Leurs effets sur la croissance des cellules cancéreuses prostatiques, dans un environnement appauvri en androgènes, ont été démontrés *in vitro* et *in vivo* [32]. En pratique clinique, les études se concentrent essentiellement sur le variant AR-V7. Sa détection dans les cellules cancéreuses prostatiques circulantes a été corrélée à une résistance à l'enzalutamide et à l'abiratéronne [33]. Toutefois, cette observation a

¹ Le terme générique *variant* désigne ici des néo-protéines issues de modifications post-transcriptionnelles ou produites par des gènes mutés ou des transcrits alternatifs.

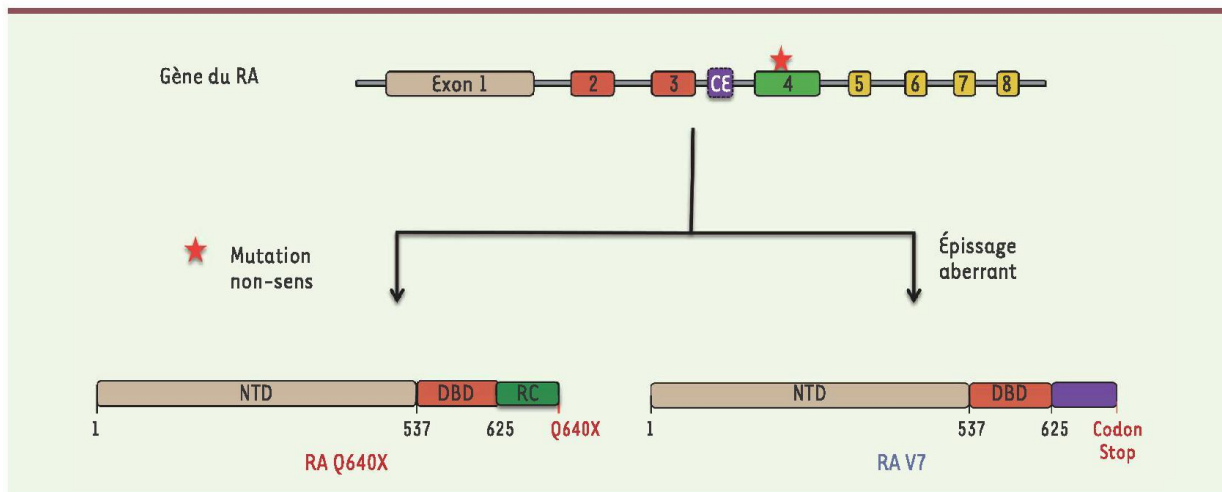


Figure 3. Origine des variants constitutivement actifs du récepteur des androgènes (RA). Les variants constitutivement actifs du RA peuvent provenir d'une mutation ponctuelle non-sens conduisant à un codon stop prématuré au niveau de l'exon 4 (étoile rouge) ou d'un exon cryptique (CE) pouvant être généré lors d'un épissage aberrant des pré-ARNm. La séquence nucléotidique de cet exon cryptique « CE » conduit à un codon stop prématuré. La séquence protéique de ces variants d'épissage en C-terminal est tronquée comparativement à la séquence normale du RA. NTD : domaine amino-terminal ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; RC : région charnière.

été obtenue à partir de cohortes constituées d'un faible nombre de patients, et elle est encore débattue [34].

Les variants du RA stimulent l'expression de gènes connus pour être androgéno-dépendants comme celui codant l'antigène spécifique prostatique (PSA). Cependant, ces variants peuvent induire un profil transcriptionnel qui leur est spécifique, en s'homodimérisant ou en s'hétérodimérisant avec une autre forme tronquée du RA [35, 36]. Le programme transcriptionnel des variants du RA impliquerait le recrutement de cofacteurs particuliers comme FOXO1 (*forkhead box protein O1*), phospho-MED1 (*Mediator complex subunit 1*), ou FOXA1 [27, 37]. Vav3, une Rho-GTPase échangeuse de nucléotides GDP/GTP, est également connue pour induire une accumulation plus importante de AR-V7 dans le noyau des cellules cancéreuses prostatiques [38].

Variantes constitutifs du récepteur des androgènes, transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et motilité cellulaire

Les variants constitutivement actifs du RA sont associés à une induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) partielle comme en témoigne la co-expression de marqueurs épithéliaux et de marqueurs mésenchymateux [39]. Cette implication des variants constitutifs du RA dans l'EMT a été rapportée dans d'autres modèles cellulaires, et dans des modèles de souris transgéniques [40-42]. Par exemple, un lien entre ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) et les variants du RA a été mis en évidence dans les cellules cancéreuses prostatiques 22RV1 [42], et des souris transgéniques, exprimant le variant ARv567es dans l'épithélium prostatique, développent spontanément des tumeurs prostatiques. La castration de ces souris conduit

au développement d'un carcinome invasif caractérisé par une diminution de l'expression de la E-cadhérine et une augmentation du facteur de transcription TWIST et de la vimentine [40].

L'analyse du transcriptome des cellules LNCaP (des cellules établies à partir d'un adénocarcinome prostatique) qui surexpriment un RA sauvage ou le variant AR-V7 montre que les gènes affectés en présence de ce variant sont principalement impliqués dans la motilité cellulaire (GEO dataset GSE71334)². En plus de la N-cadhérine, CXCL13 (*C-X-C motif chemokine 13*), FBLN5 (fibiline 5), ou encore TGM2 (transglutaminase 2) font partie des protéines dont les gènes sont les plus surexprimés en présence du variant AR-V7 (Communication personnelle ; GEO dataset GSE71334). Les variants constitutivement actifs du RA induisent aussi l'expression de RhoB (Ras homolog family member B), une petite GTPase, qui est à l'origine de la migration des cellules prostatiques LNCaP [43].

L'ensemble de ces données montre que les variants constitutifs du RA induisent l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la progression tumorale. Toutefois, les mécanismes moléculaires associant les variants du RA au contrôle de l'expression de marqueurs de l'EMT restent à déterminer.

² Données d'ARN-seq publiées dans la banque GEO (*gene expression omnibus*, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE71334>).



Variants constitutifs du récepteur des androgènes, marqueurs de cellules souches et de cellules souches cancéreuses

Les cellules souches prostatiques normales n'expriment pas le RA. Il en est de même des cellules souches cancéreuses (CSC) issues de tumeurs prostatiques hormono-naïves [44, 45]. Cependant, le RA serait faiblement exprimé dans les CSC issues de cancer de la prostate résistant à la castration [45]. À ce jour, aucune étude expérimentale n'a montré une expression des variants du RA dans les CSC prostatiques. Toutefois, il existe un lien entre les variants du RA et l'expression de marqueurs de cellules souches. Dans un modèle de souris transgéniques, la surexpression du variant AR-V7 dans l'épithélium prostatique conduit à une augmentation de la population de cellules progénitrices exprimant les marqueurs de cellules souches, Sca-1 (*stem cells antigen-1*), aldéhyde déshydrogénase et Trop-2 (*tumor-associated calcium signal transducer 2*) [41]. Le mécanisme moléculaire impliqué serait une augmentation de la sécrétion de facteurs paracrines comme les facteurs de croissance TGF β 2 (*tumour growth factor β 2*) et IGF-1 par les cellules épithéliales exprimant les variants du RA. TGF β 2 et IGF-1 maintiennent la population de cellules souches/cellules progénitrices prostatiques en prévenant ou en retardant leur différenciation [41]. L'expression du variant AR-V7 a également été corrélée à une augmentation des marqueurs de cellules souches Nanog et lin28B (*lin-28 homolog B*), respectivement dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et DU-145 [42]. De plus, l'expression du variant AR-V7 augmente la capacité des cellules PC-3 et DU-145 à former des sphéroïdes [42]. L'ensemble de ces données mène ainsi à l'hypothèse selon laquelle l'expression de variants constitutifs du RA au niveau de la tumeur pourrait conduire au maintien d'une population de CSC du fait des effets paracrines des facteurs de croissance TGF β 2 et IGF-1, mais aussi à une dédifférenciation de cellules épithéliales tumorales en CSC. Comme l'expression de marqueurs mésenchymateux est associée à la résistance à la castration [46], un des rôles de ces variants du RA pourrait être la génération ou le maintien de cette population de CSC résistant à la castration.

Conclusion

Les mécanismes de résistance à la castration semblent maintenir les activités transcriptionnelles du RA au sein de la tumeur. Ces mécanismes impliquent une mutagenèse importante au niveau du LBD conduisant à l'émergence de formes mutées du RA. Ces formes mutées du RA peuvent reconnaître comme agonistes des stéroïdes autres que les androgènes, mais aussi des anti-androgènes, d'où l'intérêt de cibler une autre région du RA. Les recherches actuelles se focalisent donc sur la région amino-terminale, le DBD étant très conservé au sein des récepteurs nucléaires. La région N-terminale constitue plus de la moitié de la séquence protéique du RA et comprend de nombreuses séquences répétées (polyglutamine, polyglycine et polyproline). Elle est notamment impliquée dans les processus de modifications post-traductionnelles du RA et d'interactions protéiques. Toutefois, des études plus approfondies, à l'interface de la biologie et de la biophy-

sique, sont nécessaires pour mieux comprendre le mode d'action de cette région intrinsèquement désordonnée du RA. Par ailleurs, les interconnexions avec les autres voies de signalisation sont nécessaires pour les fonctions des variants du RA. Il serait donc intéressant d'envisager des thérapies combinées ciblant le domaine amino-terminal du RA et les cascades de signalisation impliquées dans le mode d'action des variants du RA. \diamond

SUMMARY

Androgen receptor variants in prostate cancer

Prostate cancer is a public health concern as it currently represents the most frequent malignancy in men in Europe. Progression of this hormone-dependent cancer is driven by androgens. Thus, the most common treatment for patients with advanced prostate cancer consists in an androgen ablation by castration therapy. However, the majority of patients relapses and develops a castration-resistant prostate cancer. This failure of androgen deprivation is related to the emergence of mutant and splice variants of the androgen receptor. Indeed, androgen receptor variants are ligand-independent, constitutively active and thus able to induce resistance to castration. This review focuses on AR variants signaling pathways and their role in resistance to castration and prostate cancer progression. \diamond

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Grosclaude P, Belot A, Daubisse Marliac L, et al. Le cancer de la prostate, évolution de l'incidence et de la mortalité en France entre 1980 et 2011. *Progrès en Urologie* 2015 ; 25 : 536-42.
- Dehm SM, Tindall DJ. Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 2007 ; 21 : 2855-63.
- Labrie F, Cusan L, Gomez JL, et al. De la biologie à la clinique : le décès dû au cancer de la prostate peut-il maintenant être une exception ? *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 910-9.
- Taplin ME. Drug insight: role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer. *Nat Clin Pr Oncol* 2007 ; 4 : 236-44.
- Azad AA, Zoubeidi A, Gleave ME, et al. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2015 ; 12 : 26-36.
- Zarif JC, Miranti CK. The importance of non-nuclear AR signaling in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *Cell Signal* 2016 ; 28 : 348-56.
- Attard G, Parker C, Eeles RA, et al. Prostate cancer. *Lancet* 2016 ; 387 : 70-82.
- Labrie F. Blockade of testicular and adrenal androgens in prostate cancer treatment. *Nat Rev Urol* 2011 ; 8 : 73-85.
- Tran C, Ouk S, Clegg NJ, et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* 2009 ; 324 : 787-90.
- Fizazi K, Scher HI, Molina A, et al. Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2012 ; 13 : 983-92.

RÉFÉRENCES

11. Narayanan S, Srinivas S, Feldman D. Androgen–glucocorticoid interactions in the era of novel prostate cancer therapy. *Nat Rev Urol* 2016 ; 13 : 47–60.
12. Egan A, Dong Y, Zhang H, et al. Castration-resistant prostate cancer: adaptive responses in the androgen axis. *Cancer Treat Rev* 2014 ; 40 : 426–33.
13. Katsogiannou M, Ziouziou H, Karaki S, et al. The hallmarks of castration-resistant prostate cancers. *Cancer Treat Rev* 2015 ; 41 : 588–97.
14. Hearn JWD, AbuAli G, Reichard CA, et al. HSD3B1 and resistance to androgen-deprivation therapy in prostate cancer: a retrospective, multicohort study. *Lancet. Oncol* 2016 ; 17 : 1435–44.
15. Linja MJ, Savinainen KJ, Saramäki OR, et al. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 3550–5.
16. Mani R-S. The emerging role of speckle-type POZ protein (SPOP) in cancer development. *Drug Discov Today* 2014 ; 19 : 1498–502.
17. Perner S, Cronauer M V, Schrader AJ, et al. Adaptive responses of androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 2015 ; 6 : 35542–55.
18. Bergerat JF, Céraline J. Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum Mutat* 2009 ; 30 : 145–57.
19. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, et al. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat* 2012 ; 33 : 887–94.
20. Céraline J, Erdmann E, Erbs P, et al. A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer. *Eur J Endocrinol* 2003 ; 148 : 99–109.
21. Derycke LDM, Bracke ME, Hagberg Thulin M, et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cell* 2014 ; 6 : 1180–9.
22. Joseph JD, Lu N, Qian J, et al. A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens Enzalutamide and ARN-509. *Cancer Discov* 2013 ; 3 : 1020–9.
23. Libertini SJ, Tepper CG, Rodriguez V, et al. Evidence for calpain-mediated androgen receptor cleavage as a mechanism for androgen independence. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 9001–5.
24. Mudryj M, Tepper CG. On the origins of the androgen receptor low molecular weight species. *Horm Cancer* 2013 ; 4 : 259–69.
25. Céraline J, Cruchant MD, Erdmann E, et al. 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* 2004 ; 108 : 152–7.
26. Lapouge G, Erdmann E, Marcias G, et al. 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* 2007 ; 121 : 1238–44.
27. Liu LL, Xie N, Sun S, et al. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene* 2014 ; 33 : 3140–50.
28. Li Y, Hwang TH, Oseth L a, et al. AR intragenic deletions linked to androgen receptor splice variant expression and activity in models of prostate cancer progression. *Oncogene* 2012 ; 31 : 4759–67.
29. Nakata D, Nakao S, Nakayama K, et al. The RNA helicase DDX39B and its paralog DDX39A regulate androgen receptor splice variant AR-V7 generation. *Biochem Biophys Res Commun* 2017 ; 483 : 271–6.
30. Antonarakis ES, Armstrong AJ, Dehm SM, et al. Androgen receptor variant-driven prostate cancer: clinical implications and therapeutic targeting. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2016 ; 19 : 231–41.
31. Hörnberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, et al. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One* 2011 ; 6 : e19059.
32. Guo Z, Yang X, Sun F, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 2305–13.
33. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, et al. [AR]-[V]7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med* 2014 ; 371 : 1028–38.
34. Bernemann C, Schnoeller TJ, Luedeke M, et al. Expression of AR-V7 in circulating tumour cells does not preclude response to next generation androgen deprivation therapy in patients with castration resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2017 ; 71 : 1–3.
35. Xu D, Zhan Y, Qi Y, et al. Androgen receptor splice variants dimerize to transactivate target genes. *Cancer Res* 2015 ; 75 : 3663–71.
36. Hu R, Lu C, Mostaghel E, et al. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2012 ; 72 : 3457–62.
37. Mediwal SN, Sun H, Szafran AT, et al. The activity of the androgen receptor variant AR-V7 is regulated by FOXO1 in a PI3K-AKT-dependent way. *Prostate* 2013 ; 73 : 267–77.
38. Peacock SO, Fahrenholtz CD, Burnstein KL. Vav3 enhances androgen receptor splice variant activity and is critical for castration-resistant prostate cancer growth and survival. *Mol Endocrinol* 2012 ; 26 : 1967–79.
39. Cottard F, Asmane I, Erdmann E, et al. Constitutively active androgen receptor variants upregulate expression of mesenchymal markers in prostate cancer cells. *PLoS One* 2013 ; 8.
40. Liu G, Sprenger C, Sun S, et al. AR variant ARv567es induces carcinogenesis in a novel transgenic mouse model of prostate cancer. *Neoplasia* 2013 ; 15 : 1009–17.
41. Sun F, Chen HG, Li W, et al. Androgen receptor splice variant AR3 promotes prostate cancer via modulating expression of autocrine/paracrine factors. *J Biol Chem* 2014 ; 289 : 1529–39.
42. Kong D, Sethi S, Li Y, et al. Androgen receptor splice variants contribute to prostate cancer aggressiveness through induction of EMT and expression of stem cell marker genes. *Prostate* 2015 ; 75 : 161–74.
43. Tsai HC, Boucher DL, Martinez A, et al. Modeling truncated AR expression in a natural androgen responsive environment and identification of RHOB as a direct transcriptional target. *PLoS One* 2012 ; 7 : e49887.
44. Zazzo E Di, Galasso G, Giovannelli P, et al. Prostate cancer stem cells: the role of androgen and estrogen receptors. *Oncotarget* 2016 ; 7 : 193–208.
45. Deng Q, Tang DG. Androgen receptor and prostate cancer stem cells: biological mechanisms and clinical implications. *Endocr Relat Cancer* 2015 ; 22 : T209–20.
46. Jeter CR, Liu B, Liu X, et al. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 2011 ; 30 : 3833–45.

TIRÉS À PART
J. Céraline

LA FONDATION PREMUP : UN OPÉRATEUR DE TERRAIN EN PÉRINATALITÉ RECONNU POUR SON EXCELLENCE ET SON INTERDISCIPLINARITÉ

La Fondation de coopération scientifique PremUp, unique en Europe, intervient sur la prévention du handicap à la naissance, par la protection de la santé de la femme enceinte et du nouveau-né.



FONDATION DE COOPÉRATION SCIENTIFIQUE SUR LA GROSSESSE ET LA PRÉMATURITÉ



MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SANTÉ



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE



ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS



Inserm Institut de recherche pour le développement



UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES



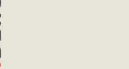
UNIVERSITÉ PARIS SUD



UNIVERSITÉ SORBONNE UNIVERSITÉS



UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT



CENTRE HOSPITALIER INTERCOMMUNAL DE CRETEIL

Modelling the androgen receptor network as a fast track to drug repositioning for prostate cancer

Edwige Schreyer^{1*}, Firozeh Ashtiani², Constantinos Demonacos³, Luciano Mutti⁴, Jocelyn Céraline^{1,5,6*}, Marija Krstic-Demonacos^{7*}, Emyr Bakker^{8*}

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France; Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7104, Illkirch, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, Illkirch, France; Université de Strasbourg, Illkirch, France

² Hematogenix Laboratory Services, BioHub, Mereside, Alderley Park, SK10 4TG, UK

³ Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

⁴ Sbarro Institute for Cancer Research and Molecular Medicine, Center for Biotechnology, College of Science and Technology, Temple University, Philadelphia, PA, 19122, USA

⁵ Service d'Onco-Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

⁶ Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France

⁷ Biomedical Research Centre, School of Environment and Life Sciences, University of Salford, Salford, United Kingdom

⁸ School of Medicine, University of Central Lancashire, Preston, United Kingdom

* Corresponding Authors

For enquiries relating to prostate cancer, please contact Jocelyn Céraline (ceraline@unistra.fr) and/or Edwige Schreyer (schreyer.edwige@gmail.com)

For enquiries relating to bioinformatics, please contact Marija Krstic-Demonacos (m.krstic-demonacos@salford.ac.uk) and/or Emyr Bakker (ebakker@uclan.ac.uk)

Abstract

The androgen receptor (AR) is an intracellular steroid hormone receptor that is widely known for its key role in prostate cancer (PCa) development. PCa is largely driven by androgens, and thus androgen ablation therapy represents a common therapeutic avenue for PCa. However, the majority of patients will ultimately relapse and develop castration-resistant PCa (CRPCa), which itself is driven by constitutively active androgen receptor mutants. Thus, increased understanding of and methods to inhibit AR signalling are essential to improving clinical outcomes. To gain further insight into AR signalling, herein a systems biology approach was undertaken via the construction of a Boolean model of the androgen receptor protein signalling network. This model (AESo68) consisting of 68 nodes connected by 215 logical interactions of activation or inhibition encapsulates a portion of the androgen receptor signalling and to our knowledge is the first model of its kind applied to AR signalling. Genome-wide model validation of model predictions generated after an AR in silico knockout achieved a correct prediction rate of 71% when using previously-published, publically-available microarray data. This high success rate of correct predictions ($p < 6.27125 \times 10^{-10}$ compared to a random model) signifies the strength of this modelling approach. Lastly, the use of the DRUGSURV database has identified several potential drugs that could be repositioned in prostate cancer on the basis of the model analysis, most promisingly sunitinib. This model thus provides a platform for future development through model expansion and additional analyses, along with linking to other processes such as in silico drug repositioning.

Introduction

Prostate cancer (PCa) represents a significant health concern as it is the most common carcinoma malignancy in men in Europe (Schreyer et al. 2017) and is also the second leading cause of cancer deaths (Tan et al. 2014). PCa is treated in the first instance by androgen suppression through surgical or chemical castration, which sets a clear, established role for the androgen receptor (AR) to be involved in PCa. After initial androgen suppression, patients are placed on androgen deprivation therapy

and this induces long-term remission in the patients (Tan et al. 2014). However, all patients will eventually progress to castration-resistant prostate cancer, which is an advanced form of the disease which no longer responds to androgen deprivation (Schreyer et al. 2017; Tan et al. 2014).

The phenomenon of no longer responding to androgen deprivation is thought to arise through a variety of mechanisms including increased sensitivity of the AR to ligands, mutation allowing stimulation by non-androgenic ligands, and ligand-independent AR action (Tan et al. 2014). Thus, it is clear that in order to improve therapeutic outcomes, an increased understanding of AR signalling is needed.

Computational biology has seen increasing prevalence in recent years, in part due to the developments in technology that allow for more powerful methodologies and high-throughput research to be taken forward. There are many types of computational approaches, but a popular one is systems biology, where the aim is to successfully model a biological system (Werner et al. 2014). There are many approaches to modelling, ranging from small-scale quantitative to large-scale qualitative, but for modelling larger networks Boolean modelling is preferred as the simplified logic reduces computational demand and therefore larger networks can be modelled (Mori et al. 2015).

Like the AR, the glucocorticoid receptor (GR) is a steroid hormone receptor, and computational methodologies have previously been applied to the GR with success (Bakker et al. 2017). Given the success of the Boolean modelling approach to understand GR function, with the model achieving consistently significantly better correct prediction rates than a random model, the aim herein was to produce a similar model of AR signalling. This model, AESo68 (Androgen Receptor Model by Edwige Schreyer, consisting of 68 nodes) contains 215 logical interactions of activation or inhibition and has been validated on a genome-wide scale, achieving a correct prediction rate of 71%. This highly promising correct prediction rate provides a promising platform for further development.

Material and Methods

Extraction and Manual Curation of Protein Interaction Records

STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (Szklarczyk et al. 2017), which was in v10 at the date of initial extraction, was used as the starting point for protein interaction records, as with previous publications (Bakker et al. 2017; Tian et al. 2013). For the model described herein, high confidence (>700 confidence score) interactions were extracted and filtered for “activation or inhibition” as their mode of action and “t” for the option “a_is_acting”. Initially all interactions relating to the androgen receptor (STRING ID 9606.ENSP00000363822) and manually curated by searching the literature to find evidence to verify the interaction that STRING predicted. This formed the ‘primary layer’ (proteins interacting directly with the AR).

Once this layer was complete, interactions for the proteins interacting with AR were extracted and filtered in the same way as described previously, as well as filtering to include only interactions between the proteins that interact with the AR. The remaining interactions were then manually curated as with the primary layer to form the second layer. Curation evidence utilised papers found from STRING and PubMed, along with existing curation records from previously published models (Bakker et al. 2017; Tian et al. 2013). The full interaction records, along with the PubMed ID evidence of a paper supporting each interaction, can be seen in Table S1 and Table S2.

Model Visualisation and Topology Analysis

Model visualisation was undertaken through the use of Cytoscape, an open-source software for model visualisation and analysis (Shannon et al. 2003). Interaction records were imported into Cytoscape and parameters were adjusted to refine the model’s appearance as needed. The NetworkAnalyzer plugin was used to generate information on network topology in the form of the node degree distribution.

Model Analysis Through CellNetAnalyzer

CellNetAnalyzer (CNA, v2018.c) was used for model analysis, a software which is capable of modelling both mass-flow and signal-flow networks (Klamt et al. 2007). In construction of the AEO68 model, a signal-flow model was chosen. Interaction records were converted into format readable by CNA and analysis undertaken using the two main approaches in CNA: dependency matrix generation/comparison and logical steady state analysis (LSSA).

A dependency matrix, as generated by CNA, provides a numerical and visual representation of the overall effect of every network constituent on every network constituent. In generating the dependency matrices analysed herein, the exhaustive search algorithm was employed. The benefit of a dependency matrix is that it analyses not only the individual reactions within the model, but also takes into account all possible signalling and feedback loops to encapsulate even indirect effects (Bakker et al. 2017). Six types of relationship are possible with a dependency matrix (Klamt et al. 2007).

1. A has no effect on B if no positive or negative paths link A to B
2. A is a strong activator of B if no negative paths exist and positive paths exist between A and B. Another condition is that there are no negative feedback loops within the positive paths.
3. A is a weak activator of B if there are positive and no negative paths from A to B, as well as negative feedback loop in the positive paths.
4. A is a strong inhibitor of B if there no positive paths exist and negative paths link A to B. There should also not be negative feedback along the negative paths.
5. A is a weak inhibitor of B if there are no positive paths and negative paths from A to B exist, along with a negative feedback loop on the negative paths.
6. A is ambivalent to B if negative and positive paths exist between them.

Generation of dependency matrices allows for comparison between the wild-type model and an in silico knockout, which simulates an in vivo loss-of-function mutation. Here, this was applied by knocking out the AR, thus simulating loss of androgen sensitivity.

The second approach in CellNetAnalyzer is LSSA, which as a starting point has every node set as “undertermined”. Then, by determining the input nodes where 1 is ON and 0 is OFF – for instance in the wild-type model, ANDROGEN was set to 1, or in the mutant simulation ANDROGEN was set to 1 but AR was set to 0) - the model will then proceed logically through the model’s interactions until a steady state is reached. LSSA will typically assign 1 (ON) or 0 (OFF) to every node in the model, however some nodes may be marked as NaN, which means undetermined – in these cases it means the node exhibits some oscillatory behaviour or that its status cannot be fully determined (Bakker et al. 2017; Klamt et al. 2007; Tian et al. 2013).

LSSA Comparison and Genome-Wide Model Validation

As described in detail elsewhere (Tian et al. 2013) LSSA scenarios can be compared to assess the model’s performance. In brief, a value called Emod is generated by comparing the steady state of nodes in one scenario against another. Node i can be described in scenario 1 as $S(i)_1$ and as $S(i)_2$ with the Emod values being as below.

$E_{mod} = 0$	if	$S(i)_1 = \text{NaN}$	and	$S(i)_2 = \text{NaN}$
$E_{mod} = 0$	if	$S(i)_1 = 1$	and	$S(i)_2 = 1$
$E_{mod} = 0$	if	$S(i)_1 = 0$	and	$S(i)_2 = 0$
$E_{mod} = -1$	if	$S(i)_1 = 1$	and	$S(i)_2 = 0$
$E_{mod} = -1$	if	$S(i)_1 = \text{NaN}$	and	$S(i)_2 = 0$
$E_{mod} = -1$	if	$S(i)_1 = 1$	and	$S(i)_2 = \text{NaN}$
$E_{mod} = 1$	if	$S(i)_1 = \text{NaN}$	and	$S(i)_2 = 1$
$E_{mod} = 1$	if	$S(i)_1 = 0$	and	$S(i)_2 = \text{NaN}$
$E_{mod} = 1$	if	$S(i)_1 = 0$	and	$S(i)_2 = 1$

The E_{mod} value represents the model's prediction as to how the node will *behave in vivo/vitro*: a value of 1 indicates that the model predicts the protein will increase in the second condition; a value of 0 indicates no predicted change between the two scenarios whilst a -1 indicates the model predicts it will decrease in the second scenario.

Additionally, the calculation of E_{mod} allows for the accuracy of the model to be assessed on a wider scale. By obtaining previously published microarray data that was deposited into the Gene Expression Omnibus database by the authors of the original study (Gonit et al. 2011) an E_{exp} value was generated. The four microarray datasets used for this are stated below.

Table 1: Microarray data used for model validation

GSM558626	LNCaP + R1881 rep1
GSM558627	LNCaP + R1881 rep2
GSM558628	LNCaP + AR-shRNA rep1
GSM558629	LNCaP + AR-shRNA rep2

To obtain E_{exp} the following steps were performed. The repeat microarrays (GSM558626 and GSM558627 for androgen-treated LNCaP cells and GSM558628 and GSM558629 for LNCaP cells treated with AR shRNA) were averaged for each probe ID. The Log_{10} fold-change score for all probes within the microarray between the source (androgen-treated) and target (AR-shRNA-treated) scenarios was calculated, along with the average Log_{10} fold change and the standard deviation (STDEV). This average and standard deviation was then used to create a dynamic threshold where the upper limit was the average+STDEV and the lower limit was the average-STDEV. This dynamic threshold was used to determine if genes were upregulated, downregulated or unchanged between the two scenarios.

For every node within the model, the median score of all probe IDs relating to the gene was obtained for both the androgen-treated and AR-shRNA cells. The Log_{10} fold change was calculated for each gene based on the median score, and then this Log_{10} score was compared to the dynamic threshold. If the value was higher than the upper

limit of the dynamic threshold, the gene was considered to be upregulated ($E_{mod} = 1$). If the value was lower than the lower limit of the dynamic threshold, the gene was considered to be downregulated ($E_{mod} = -1$). If the value lay between the lower and upper limits of the dynamic threshold, then the gene was considered to be unchanged between the two scenarios ($E_{mod} = 0$).

The absolute value of $E_{mod} - E_{exp}$ was calculated, which could take three possible values: 0 (model prediction was correct); 1 (small error prediction) or 2 (large error prediction). A small error occurs when the model predicts (for example) no change but the gene actually goes up or down, or the model predicts it goes up/down but it is actually unchanged (so a “one-step” error). A large error prediction occurs when the model predicted the opposite of what occurred (i.e. model predicted the gene would be downregulated when in fact it is upregulated). This previously published methodology (Bakker et al. 2017; Tian et al. 2013). These values could then be tallied to give an estimation of the model’s accuracy.

Calculation of P-Value for Correct Predictions

In order to determine the significance of the number of correct predictions obtained by the model, the WolframAlpha computational knowledge engine (<http://www.wolframalpha.com/>) was used with the search phase “Probability of [A] success in [B] trials, chance of success is [C]”. [A] is the number of correct predictions, [B] is the total number of predictions and [C] is the chance of success (1/3, as there are only three possible outcomes so a random model would achieve that).

In silico drug repositioning

To find repositioned drugs against potential targets identified through model construction and analysis, the DRUGSURV database (Amelio et al. 2014) was used. DRUGSURV is a tool for repositioning of approved and experimental drugs for oncology based on patient survival information (Amelio et al. 2014). The relevant official gene symbols were input to the system and the direct and indirect drugs (if any) were noted.

Results

AESo68 Model Generation

The AESo68 model was generated via a similar, adapted workflow to the procedures used for the previously published GEBo52 GR model (Bakker et al. 2017) and the PKT206 TP53 model (Tian et al. 2013) (Figure 1).

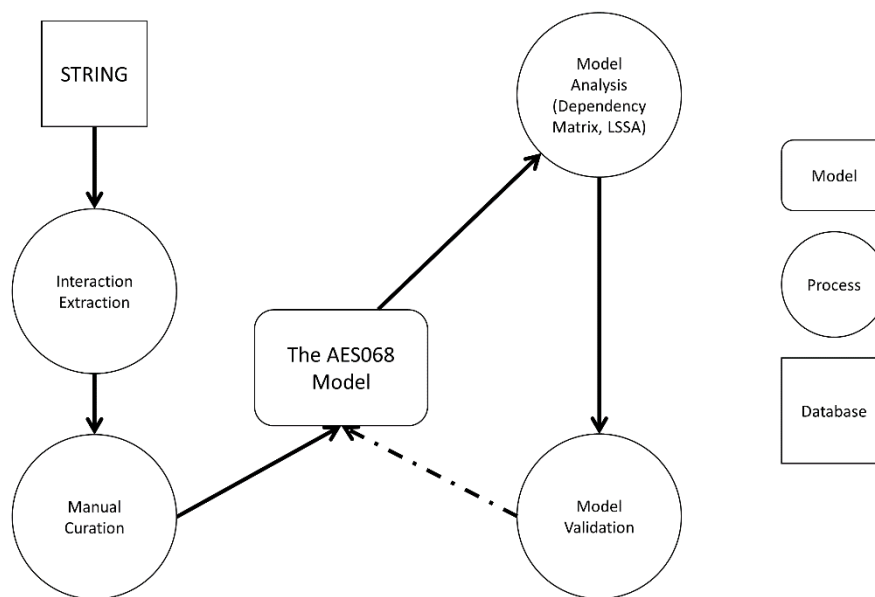


Figure 1: Workflow diagram of the AESo68 model construction.

Database files were extracted from STRING, automatically extracted, and then manually curated. These manual curations formed the basis of the AESo68 model, which underwent analyses such as dependency matrices and LSSAs. The validation of these analyses could then potentially be fed into the model to better refine its interactions (hence the dashed line). As before (Bakker et al. 2017; Tian et al. 2013) several rules were applied during the curation process: first, in the primary layer, proteins that had an effect on AR (or were affected by the AR) but did so through mechanisms that were considered to be too indirect were not included. In the second layer, the “intermediary” rule was applied – if two proteins (that already existed within the model) were predicted to interact but did so through a mediator, then the

reaction would be put as going through the mediator if the mediator already existed within the model to capture the most accurate signalling, whereas if the mediator did not already exist within the model, the reaction would be put as direct, as the inclusion of the mediator for the sole purpose of that reaction would be redundant. Some nodes represent more than one protein or had similar noteworthy modifications; these are noted in the S3 Table.

AESo68 Model Structure

The AESo68 model (Figure 2) contains 68 nodes connected by 215 logical interactions of activation or inhibition.

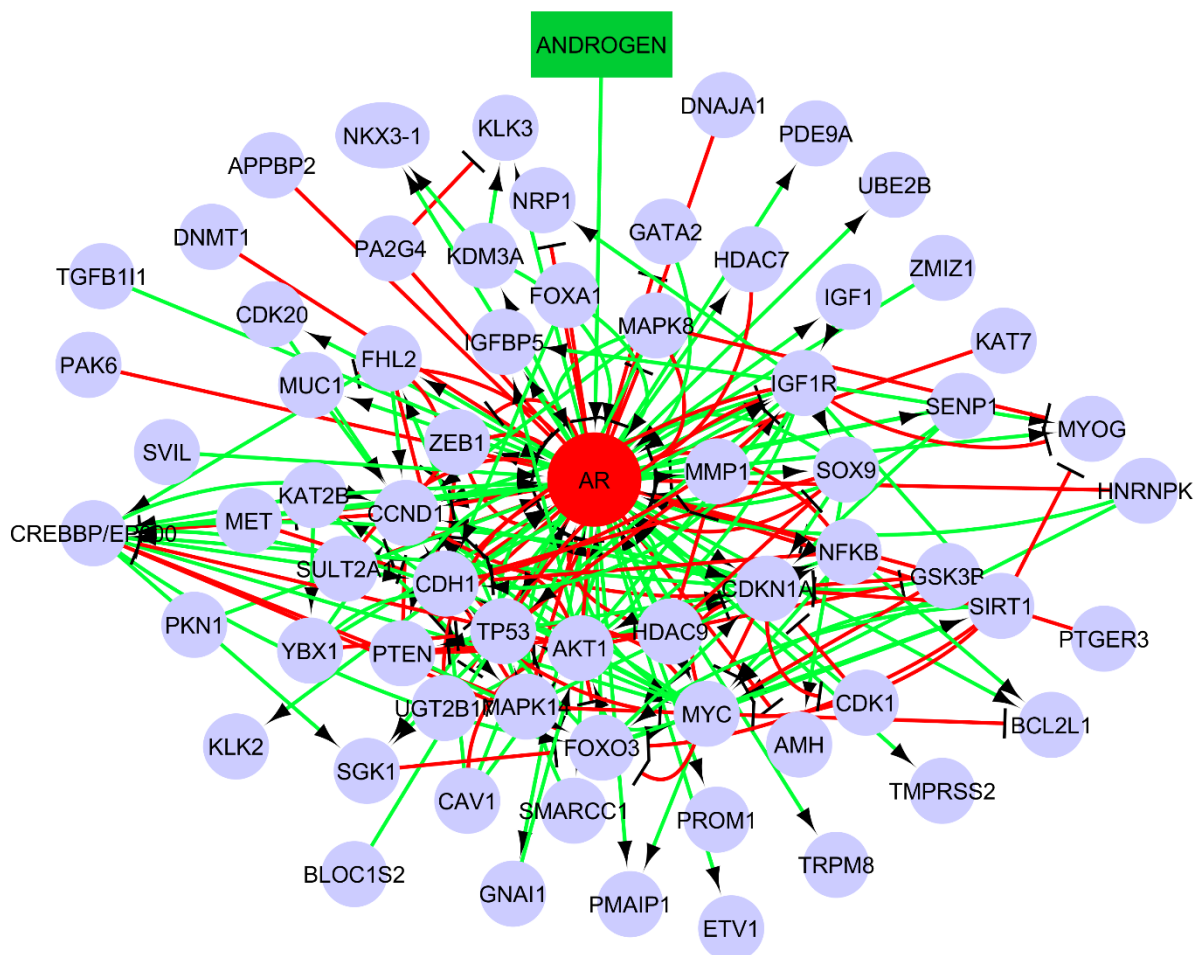


Figure 2: The AESo68 model.

Green open arrows represent activation relationships, whilst red closed arrows represent inhibition relationships. The AR, the central node, is highlighted in red whilst the model input (ANDROGEN) is a green square at the top. Most nodes are represented in lilac circles.

It is widely established that feedback loops are important regulatory elements in biological systems. The AESo68 model has 38 two-step (i.e. Protein A -> Protein B -> Protein A) feedback loops, which is a lower degree of interconnectivity than has been seen for earlier models (Bakker et al. 2017) but also a higher degree than others (Tian et al. 2013). Understanding the degree of node connectivity is important for understanding network integrity, as the more connected a network is the more resistant it is to aberration (such as mutation). The degree of node connectivity was assessed via the NetworkAnalyzer plugin in Cytoscape.

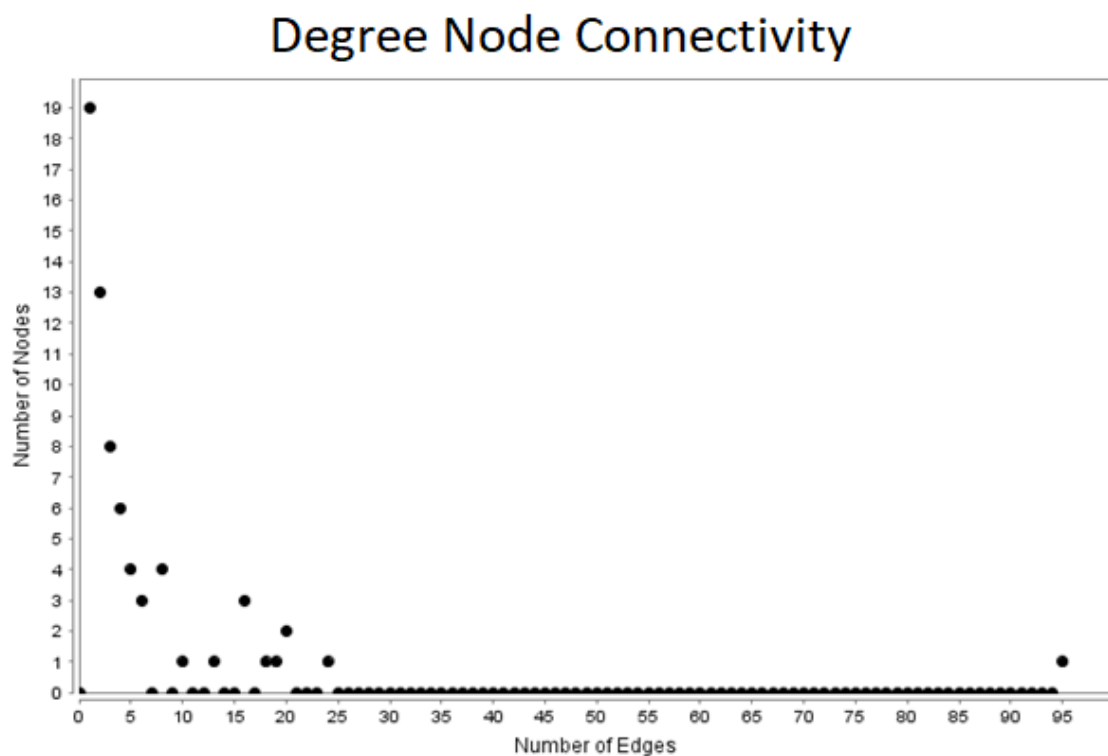


Figure 3: Node connectivity of AESo68 model.

The number of nodes that exhibit the degree of connectivity shown on the y-axis is shown on the x-axis.

In terms of connectivity, the AR was clearly the most connected node, with 95 edges. After that, the most connected nodes were MYC (24 interactions), AKT1 (20 interactions), CCND1 (20 interactions), CDH1 (19 interactions), IGF1R (18 interactions), CDKN1A (16 interactions), CREBBP/EP300 (16 interactions), TP53 (16 interactions), FOXO3 (13 interactions), SIRT1 (10 interactions). All other remaining nodes had less than ten interactions (accounting for 84% of nodes). Understanding

the most connected nodes is important for in silico knockouts, as the nodes that are the most connected are the ones most likely to have a stronger effect on the network.

AESo68 Dependency Matrix Generation and in silico Knockouts

As described in the Materials and Methods, CNA is capable of generating a dependency matrix which shows the effect of every node in the model on every node in the model. Figure 4 below shows the dependency matrix for the wild-type model.

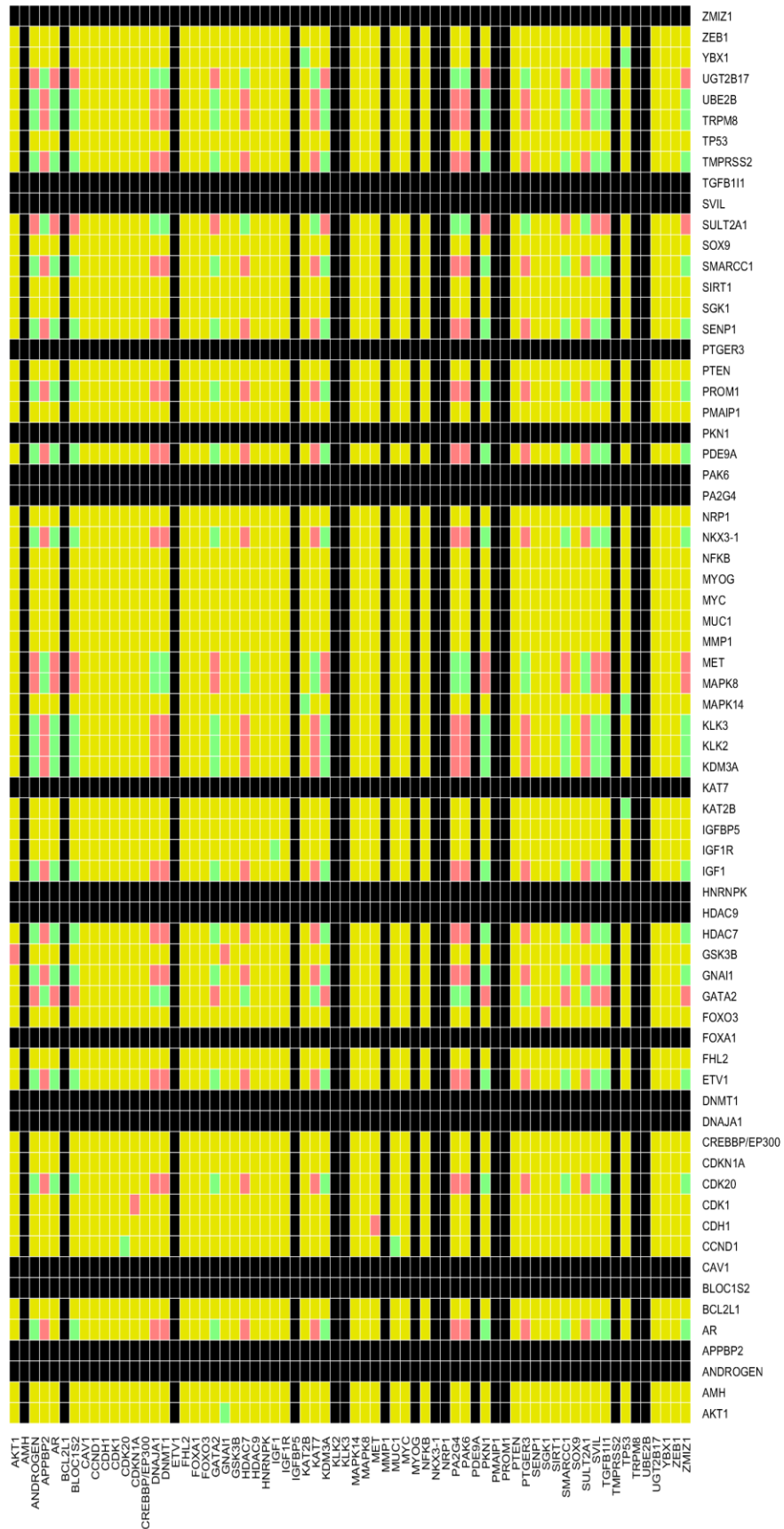


Figure 4: Dependency matrix for the AESo68 model. Dependencies show the effect of the node on the y-axis on the x-axis. Black represents no effect, yellow ambivalent, pink weak inhibitor, light green weak activator, dark green strong activator and dark red strong inhibitor.

In total 4624 (68*68) dependencies were observed in the AESo68 model. Of these, 1972 were no effect, 2221 were ambivalent, 208 were weak inhibitor, 223 were weak activator and there were no strong inhibitors or strong activators.

To characterise how the network changes following a mutation event, an in silico knockout of the androgen receptor (AR) was performed. Figure 5 below shows the changes in dependencies following this.

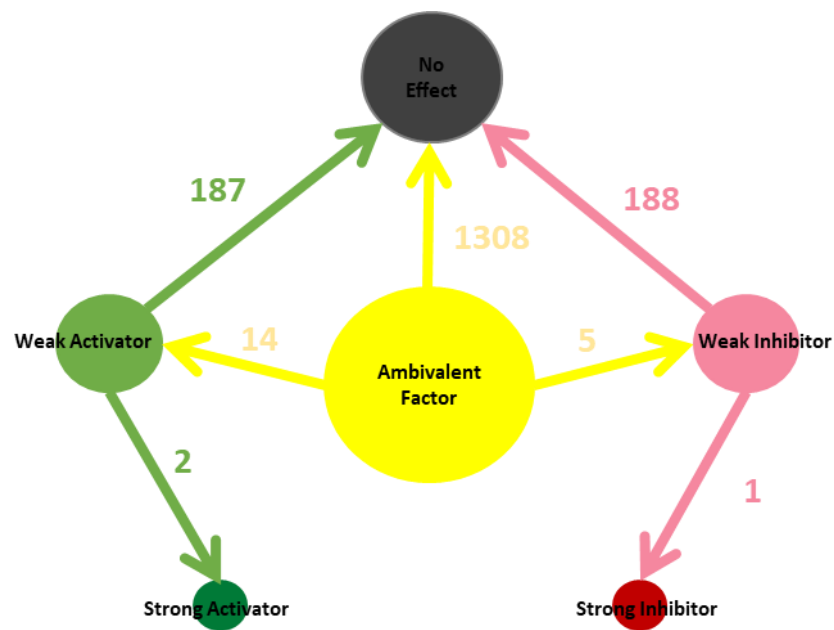


Figure 5: Dependency matrix alterations following an in silico AR knockout.

Although the wild-type model had no strong activators or inhibitors, the removal of the AR changed three relationships into strong/total versions. These are the changes most likely to exert a physiological change, so they are worth investigating and may also provide novel insight into how signalling is altered. The three changes are summarised below.

Table 2: Dependency matrix alterations to strong relationships

Node Deleted	Activated Node	Target Node	Original Relationship	New Relationship
AR	PA2G4	KLK3	Weak Inhibitor	Strong Inhibitor
AR	KDM3A	KLK3	Weak Activator	Strong Activator
AR	KDM3A	NKX3-1	Weak Activator	Strong Activator

It is also certainly possible that knockout of other highly connected nodes would produce changes in the strong dependencies, which is something to be explored.

Genome-Wide Model Validation

Whilst the dependency matrix approach described above certainly provides useful information, it would be more beneficial for the model to be assessed on a wider scale. To this end, logical steady state analysis (LSSA) was employed in conjunction with microarray validation. As described in the Materials and Methods, LSSA between a wild-type and mutant scenario can encapsulate the model's predictions for the entire network, which can then be validated via microarray data. Androgen-response and androgen-resistant cells were simulated and LSSA performed, with the results shown below in Figure 6.

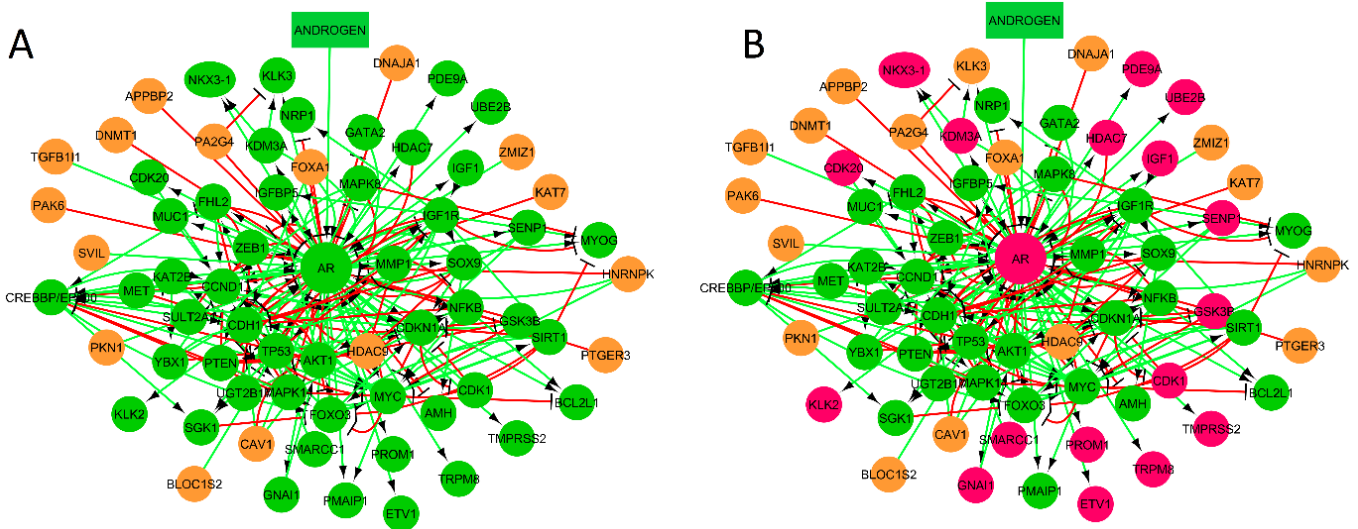


Figure 6: LSSA results of simulations of androgen-response (A) and androgen-resistant (B) cells.

ON/activated nodes are represented by green circles, whilst red represents OFF/inactive nodes. Orange represents undetermined (NaN) nodes.

Table 3 below summarises prediction rates achieved from microarray validation of LSSA results:

Table 3: Microarray validation of LSSA results using the microarrays described in Table 1 in the Materials and Methods.

Correct Predictions	Small Error Predictions	Large Error Predictions	P-Value of Correct Predictions
46 (71%)	19 (29%)	0 (0%)	6.27125×10^{-10}

As shown above in Table 3, the AESo68 model achieved a correct prediction rate of 71%. Given that there are three possible outcomes (correct, small error, or large error) a random model would be expected to achieve a correct prediction rate of 33.3%. 71% is obviously significantly higher than 33.3%, and the p-value indicates extreme statistical significance. Therefore, this provides encouraging evidence of the predictive power of the AESo68 model.

Drug Repositioning of Androgen Receptor Activators

In order to determine if the AESo68 model could be used to identify potential drug targets, nodes that were indicated to be an AR activator by the dependency matrix were submitted to DRUGSURV (Amelio et al. 2014). Potential drugs for multiple targets are shown in S4 Table. The most promising repositioned drug appears to be sunitinib, as it targets multiple nodes and pathways. Indeed, a cursory examination of <https://clinicaltrials.gov> reveals that there is an ongoing trial with sunitinib plus hormonal ablation before prostatectomy (NCT00329043), which indicates that this approach of combined computational modelling and in silico repositioning is valid, and able to identify potentially clinically important drugs.

Discussion

The androgen receptor remains a key player in prostate cancer. Despite decades of research, castration-resistant PCa remains a problem, and efforts to increase our understanding of androgen receptor signalling are ongoing. The research presented herein shows, for the first time to our knowledge, the application of a Boolean modelling approach using CellNetAnalyzer analytical methods to the androgen receptor. These approaches have previously been applied to cancer in general through TP53 modelling (Tian et al. 2013) and leukaemia through GR modelling (Bakker et al. 2017) but this approach has yet to be applied to PCa.

It is interesting that the AESo68 model identified 38 two-step feedback loops. This shows a lower degree of connectivity per node than the GR model (which had 64 two-step feedback loops despite having only 52 nodes) (Bakker et al. 2017). However, the AESo68 model has significantly more connectivity per node than the TP53 model (Tian et al. 2013). Thus, it is unclear whether the increased connectivity in the AESo68 model is due to updates to the STRING database (with each update offering more accurate and a higher number of protein interactions) or due to inherent feedback within the different biological systems.

Although achieving a 71% correct prediction rate is a promising find with regard to the accuracy of the AESo68 model, the results here are still limited through the very

nature of Boolean modelling. The fixed-state nature of Boolean logic (i.e. ON or OFF) does not accurately capture gene expression, where in reality it is of course a much more quantitative scale. There have been several approaches to address this shortcoming of Boolean modelling in the past. One that has been applied successfully to the type of Boolean model presented herein is the signal transduction flow score algorithm (STSFA) (Isik et al. 2012). This approach has been shown to improve predictive capacity in both the TP53 model (Hussain et al. 2014) and the GR model (Bakker et al. 2017), with the GR model reaching correct prediction rates as high as 87%. The algorithm works by superimposing microarray and/or ChIP-seq data on top of a Boolean model, thus providing a “starting score” to every node within the model. These scores then traverse along the signalling pathways present within the model. Thus, this “semi-quantitative” approach overcomes the natural limitations present within Boolean modelling, and therefore represents a promising avenue for future research relating to the AESo68 model.

Ultimately, the AESo68 has demonstrated successful prediction rates, and is a good source for further development. There are several key points where future work could be directed. A common suggestion for models is model expansion to include more nodes, more inputs as well as biologically-relevant outputs. This is a potential point for the AESo68 model. Additionally, the dependency matrix alterations could be validated by literature searching to verify their effect (if already known) or if they are novel mechanistic predictions then they could be validated in the laboratory (for example by depleting AR and then tracking KLK3 or NKX3-1 expression and seeing if it is mediated through KDM3A). Similarly, laboratory validation (for instance simple cytotoxic assays) of the repositioned drugs against prostate cancer cells could be performed, as DRUGSURV identified many potential drugs. The aforementioned STSFA could be employed onto the AESo68 model to confirm its enhanced predictive power. Lastly, the AESo68 model could be validated using patient data, in much the same way that the GR model was validated using patient data (Bakker et al. 2017). Validation with patient data brings the model that step closer to translational relevance, which is the ultimate aim of research to help PCa patients.

In conclusion, the data presented herein shows the novel application of Boolean modelling to understand androgen receptor signalling. The high correct prediction rate achieved via genome-wide model validation (71%) with a very low p-value indicates the strength of the model’s predictive capacity. The identification of novel

signalling events following the loss of functional AR may improve our understanding of androgen receptor signalling, and the identification of potential repositioned drugs could be taken forward for laboratory testing.

References

Amelio I, Gostev M, Knight RA, Willis AE, Melino G, and Antonov AV. 2014. DRUGSURV: a resource for repositioning of approved and experimental drugs in oncology based on patient survival information. *Cell Death Dis* 5:e1051. 10.1038/cddis.2014.9

Bakker E, Tian K, Mutti L, Demonacos C, Schwartz JM, and Krstic-Demonacos M. 2017. Insight into glucocorticoid receptor signalling through interactome model analysis. *PLoS Comput Biol* 13:e1005825. 10.1371/journal.pcbi.1005825

Gonit M, Zhang J, Salazar M, Cui H, Shatnawi A, Trumbly R, and Ratnam M. 2011. Hormone depletion-insensitivity of prostate cancer cells is supported by the AR without binding to classical response elements. *Mol Endocrinol* 25:621-634. 10.1210/me.2010-0409

Hussain M, Stutchbury B, Tian K, Atalay R, Schwartz J, and Krstic-Demonacos M. 2014. Applications of p53 interactome analysis to personalised drug discovery. Conference: International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (IWBBIO 2014). Universidad de Granada, Granada, Spain. p 192-203.

Isik Z, Ersahin T, Atalay V, Aykanat C, and Cetin-Atalay R. 2012. A signal transduction score flow algorithm for cyclic cellular pathway analysis, which combines transcriptome and ChIP-seq data. *Mol Biosyst* 8:3224-3231. 10.1039/c2mb25215e

Klamt S, Saez-Rodriguez J, and Gilles ED. 2007. Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. *BMC Syst Biol* 1:2. 10.1186/1752-0509-1-2

Mori T, Flottmann M, Krantz M, Akutsu T, and Klipp E. 2015. Stochastic simulation of Boolean rxncon models: towards quantitative analysis of large signaling networks. *BMC Syst Biol* 9:45. [10.1186/s12918-015-0193-8](https://doi.org/10.1186/s12918-015-0193-8)

Schreyer E, Barthélémy P, Cottard F, Ould Madi-Berthélémy P, Schaff-Wendling F, Kurtz J-E, and Céraline J. 2017. Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate. *Med Sci (Paris)* 33:758-764.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, and Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498-2504. [10.1101/gr.1239303](https://doi.org/10.1101/gr.1239303)

Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, Jensen LJ, and von Mering C. 2017. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45:D362-d368. [10.1093/nar/gkw937](https://doi.org/10.1093/nar/gkw937)

Tan MHE, Li J, Xu HE, Melcher K, and Yong E-l. 2014. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* 36:3. [10.1038/aps.2014.18](https://doi.org/10.1038/aps.2014.18)

Tian K, Rajendran R, Doddananjaiah M, Krstic-Demonacos M, and Schwartz JM. 2013. Dynamics of DNA Damage Induced Pathways to Cancer. *PLoS One* 8. [10.1371/journal.pone.0072303](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072303)

Werner HMJ, Mills GB, and Ram PT. 2014. Cancer Systems Biology: a peak into the future of patient care? *Nat Rev Clin Oncol* 11:167-176. [10.1038/nrclinonc.2014.6](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.6)

COMMUNICATIONS PERSONNELLES

- 1) Journées de l'École Doctorale, Illkirch-Graffenstaden, France ; 26-27 Février
2015

Communication orale

Prostate cancer microenvironment

Edwige Schreyer

- 2) EMBO Conference on Nuclear Receptors, Ajaccio, France ; 24-28 Septembre
2015

Poster

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Edwige Schreyer, Eva Erdmann, Félicie Cottard, Marine Delbecque, Pauline Berthélémy , Irène Asmane, Frédérique Wendling, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

- 3) 9ème Forum du Cancéropôle Grand Est, Strasbourg, France ; 12-13 Novembre
2015

Poster

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Edwige Schreyer, Eva Erdmann, Félicie Cottard, Marine Delbecque, Pauline Berthélémy , Irène Asmane, Frédérique Wendling, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

- 4) 24ème Journée de l'ARTP, Paris, France ; 18 Novembre 2015

Poster

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Cottard F., Delbecque M., Berthélémy P., Asmane I., Wendling F., Kurtz J.E. and Céraline J.

5) 9th UK Stem Cell Meeting, Manchester, Royaume-Uni ; 3 Décembre 2015

Poster

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Cottard F., Delbecque M., Berthélémy P., Asmane I., Wendling F., Kurtz J.E. and Céraline J.

6) 4èmes Journées de la FMTS, Strasbourg, France ; 28-29 Avril 2016

Communication orale

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Cottard F., Delbecque M., Berthélémy P., Asmane I., Wendling F., Kurtz J.E. and Céraline J.

Prix de la meilleure communication orale

7) 6ème Journée des Récepteurs Nucléaires, Paris, France ; 9 Mai 2016

Communication orale

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Cottard F., Delbecque M., Berthélémy P., Asmane I., Wendling F., Kurtz J.E. and Céraline J.

8) 23rd Annual Meeting of the European Cancer Center, Strasbourg, France ; 13

Mai 2016

Poster

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Cottard F., Delbecque M., Berthélémy P., Asmane I., Wendling F., Kurtz J.E. and Céraline J.

9) Androgens, Innsbruck, Autriche ; 15-17 Septembre 2016

Poster

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Edwige Schreyer, Eva Erdmann, Félicie Cottard, Marine Delbecque, Pauline Berthélémy, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

10) 23rd Meeting of the EAU Section of Urological Research, Parme, Italie ; 20-22 Octobre 2016

Travel Award

Communication orale

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Edwige Schreyer, Eva Erdmann, Félicie Cottard, Marine Delbecque, Pauline Ould-Madi Berthélémy, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

11) 25ème Journée de l'ARTP, Paris, France ; 16 Novembre 2016

Poster

Stroma corruption by androgen receptor variants in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Cottard F., Delbecque M., Ould-Madi Berthélémy P., Kurtz J.E., and Céraline J.

12) 10ème Forum du Cancéropôle Grand Est, Nancy, France ; 24-25 Novembre 2016

Communication orale

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Ould-Madi Berthélémy P., Kurtz J.E., and Céraline J.

13) Journées de l'École Doctorale, Illkirch-Graffenstaden, France ; 22-23 Mars 2017

Communication orale

Androgen receptor variants and microenvironment in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Ould-Madi Berthélémy P., Kurtz J.E., and Céraline J.

14) 18ème journée Scientifique Régionale de la Ligue Contre le Cancer, Illkirch-Graffenstaden, France ; 30 Novembre 2017

Poster

Stroma corruption by androgen receptor variants in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Ould-Madi Berthélémy P., Kurtz J.E., and Céraline J.

15) 25rd Meeting of the EAU Section of Urological Research, Athènes, Grèce ; 4-6
Octobre 2018

Poster

Stroma corruption by androgen receptor variants in prostate cancer

Schreyer E., Erdmann E., Maglott-Roth A., Ould-Madi Berthélémy P., and Céraline J.

Rôle du récepteur des androgènes dans les communications cellulaires au sein du cancer de la prostate

La castration représente le traitement de référence du cancer de la prostate à un stade avancé. Cependant, la plupart des patients rechute du fait notamment de l'émergence de variants tronqués constitutivement actifs du récepteur des androgènes (RA). Le microenvironnement tumoral, en particulier les fibroblastes associés au cancer (CAFs), favorisent largement la progression tumorale. Ils sont très hétérogènes et dérivent de plusieurs types cellulaires dont les cellules souches mésenchymateuses (MSCs). Afin de mettre à jour l'impact des variants du RA sur le microenvironnement tumoral, mon projet de thèse a porté sur l'étude des effets de ces variants du RA sur la différenciation des MSCs en CAFs. Les résultats obtenus m'ont permis de démontrer un impact positif du variant RA Q641X sur l'expression du facteur de différenciation VEGF par les cellules tumorales, ainsi que sur l'expression des marqueurs de différenciation en CAFs FSP-1, CXCL12, PDGFR- β , ainsi que VEGF, au niveau des MSCs. Ces données suggèrent que le variant RA Q641X est capable d'induire la différenciation des MSCs en CAFs, soulignant ainsi l'importance de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ces variants du RA.

Mots-Clés : Cancer de la prostate, variants constitutivement actifs du récepteur des androgènes, microenvironnement tumoral, fibroblastes associés au cancer, cellules souches mésenchymateuses

Androgen ablation therapy remains the most common treatment for patients with advanced prostate cancer. However, most patients will relapse due to the emergence of truncated constitutively active androgen receptor (AR) variants. The tumor microenvironment is another necessary feature driving prostate cancer progression. Cancer associated fibroblasts (CAFs) are the major specialized stromal cells that favor tumor progression. These cells are very heterogeneous and derive from several other cell types as mesenchymal stem cells (MSCs). In order to highlight the impact of AR variants on surrounding tumor stroma, the aim of my project was to investigate the effects of these AR variants on MSCs differentiation into CAFs. I noticed that the expression of VEGF, a CAF differentiation factor, was upregulated in tumor cells expressing AR Q641X variant. Similarly, the expression of CAF differentiation markers FSP-1, CXCL12, PDGFR- β , and VEGF was enhanced in MSCs in presence of AR Q641X variant. These data highlight an unknown property of AR Q641X variant in prostate tumor cells that is its ability to induce MSCs differentiation into CAFs, underlining the urgent need to develop novel strategies targeting these AR variants.

Keywords: Prostate cancer, constitutively active androgen receptor variants, tumor microenvironment, cancer associated fibroblasts, mesenchymal stem cells