THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2 N°168)

Unité de recherche : Résistance aux Traitements et Thérapies innovantes (RTTi)
Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM U1194)

Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cancer de la prostate

Présenté par Valomanda RAKOTONDRAHASO
Le 07 Octobre 2019

Sous la direction du Dr Céline GONGORA et du Dr Diego TOSI

Devant le jury composé de

M. Éric Julien, DR2, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier	Président du jury
Mme Anne Pradines, CR, Centre de recherche en cancérologie de Toulouse	Rapportrice
Mme Palma Rocchi, CR, Centre de recherche en cancérologie de Marseille	Rapportrice
M. Bernard Pau, Professeur honoraire	Invité
M. Cyrille Bastide, PU-PH, Centre hospitalier universitaire de Marseille	Invité
Mme Céline Gongora, DR2, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier	Directrice de thèse
M. Diego Tosi, PH, Institut de cancérologie de Montpellier	Co-encadrant de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Mots-clés : Cancer de la prostate, résistance aux traitements, nouvelles cibles, synergie, MAPK p38

Keywords : Prostate cancer, drug resistance, new therapeutic targets, p38 MAPK

À ma famille

Pour toi, Maman

Remerciements

Arrivant au terme de trois années enrichissantes aussi bien professionnellement que personnellement, je profite de ces quelques pages afin d'adresser ma plus sincère reconnaissance à tous ceux qui ont participé à l'aboutissement de ce parcours.

Tout d'abord, je remercie le Président et les Membres du jury de me faire l'honneur d'accepter d'évaluer cette thèse.

Merci au Département de Mayotte et à la Direction des Affaires Scolaires et Universitaires pour leur financement ayant permis la réalisation de ce Doctorat.

Je remercie ma Directrice de thèse, le Docteur Céline Gongora qui m'a accepté dans son équipe de recherche et m'a donné la chance de réaliser une thèse sous sa direction. Jamais je n'aurais pensé avoir une cheffe aussi disponible, bienveillante et compréhensive. Ces années ne furent pas de tout repos mais tu as su me remotiver quand cela était nécessaire. Merci pour ta confiance et ta patience, j'ai pu apprendre et grandir plus que ce que je n'aurais pu l'espérer ailleurs.

Je remercie, mon co-encadrant de thèse, le Docteur Diego Tosi, qui m'a lui aussi accordé cette opportunité de travailler sur ce projet à ses côtés. Merci pour ta disponibilité malgré ton planning chargé, tes conseils et ton écoute. Merci pour ce stage d'observation qui m'a permis d'en apprendre plus sur le domaine médical mais aussi sur toi. Je te suis reconnaissant pour ton implication et ta confiance qui ont contribué à mon épanouissement tout au long de ce travail.

J'adresse un remerciement commun à mes deux encadrants de thèse pour nos innombrables discussions constructives, honnêtes et ouvertes tant sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie Mme Nadia Vié pour son soutien, ses conseils et sa patience. Merci d'avoir pris le temps de discuter avec moi, bien que j'aurais dû le faire plus tôt et plus souvent. Tu as tant contribué à mon apprentissage et à ma progression durant cette thèse.

Je remercie le Docteur Philippe Pourquier, pour sa simplicité et son humour. Merci d'être autant disponible que ce soit au laboratoire ou par mail afin de discuter, de conseiller et d'écouter. Merci pour tes questions lors des présentations permettant de nous stimuler intellectuellement. J'ose à peine me projeter aux répétitions de la soutenance en écrivant ces lignes.

Aux membres de mon comité de thèse : merci aux Docteurs Gwendal Lazennec, Cyril Ribeyre et Audrey Sirvent d'avoir apporté votre expertise pour l'avancement de ce projet. Merci au Docteur Laurence Guglielmi pour ta disponibilité et ta bonne humeur, sans compter les nombreux conseils donnés.

Merci au Docteur Patrick Balaguer d'avoir accepté de faire partie intégrante de ce projet aussi bien par ta participation dans mon comité de thèse mais aussi en tant que collaborateur. Merci pour tes conseils et tes questions me conduisant à tout le temps prendre du recul sur mon travail.

Merci à Mme Marina Grimaldi pour ton sourire et ton enthousiasme chaque fois que l'on se croise. Merci pour ton travail ayant permis à ce projet d'avancer grâce à notre collaboration.

Aux membres de l'équipe de recherche : chacun à votre manière vous contribuez à faire de l'environnement de travail, un lieu d'épanouissement.
Tout d'abord, à nos différents encadrants : merci au Docteur Maguy Del Rio pour ton écoute, ton humour et ton franc-parler. Merci aux membres de l'équipe, hors laboratoire, le Professeur Alexandre Evrard, le Professeure Nadine Houédé et le Docteur Litaty Mbatchi pour votre facilité d'approche ainsi que votre gentillesse. Merci pour les échanges aussi bien professionnels que personnels.
Aux autres membres de l'équipe qui ont su rendre le quotidien bien plus agréable : Merci Lucie et Candice pour votre aide qui a permis à ce projet d'avancer continuellement et pour votre amitié. Notre entente a été rapide et cela pour mon plus grand plaisir. Merci à mes collègues doctorants, devenus des amis le temps passant. Merci Romain pour ta bonne humeur et ton humour, source de discussions décomplexées et de fous rires. Merci « Aliche » pour ton écoute, ton sens du partage, nos échanges pleins de légèreté et ton regard qui veut tout dire. Merci à Fanny pour ton amitié, tes conseils et ta franchise qui comptent beaucoup pour moi. Tu sais être présente en te démultipliant de partout, et ça c'est fort ! Merci Hadjer « Nounou » Noussaiba pour ton soutien durant ces dernières années. Merci pour les incroyables protocoles, pour ta « géographie » que je ne comprends toujours pas, pour ta disponibilité afin de me montrer ou me réexpliquer une énième fois une manip ou une notion. Mais au-delà du travail, merci d'avoir été présente aussi en dehors.
Aux anciens membres de l'équipe. Merci à Ève et Matthieu pour l'accueil que vous m'avez réservé, en tant que petit nouveau, vos conseils et votre disponibilité ont facilité mon intégration. Merci à Marie pour ta gentillesse, ton écoute, tes conseils et tes réponses aux différentes énigmes que l'on se posait. Merci à Augusto, nous avons commencé en même temps et passant rapidement de parfaits inconnus à amis. Ta bonne humeur est contagieuse, ton humour et ton « karma » furent sources de fous rires. Merci pour tes conseils et ton soutien de tout instant. Merci à Sara (SLM, Sara Lee, Petit Scarabée…) pour ton amitié, tes sens inégalables et inégalés de « l'écoute », de « la lucidité » et du karma. Qui aurait cru qu'accepter de changer un pneu m'aurait amené, plus tard, à vivre des situations totalement farfelues. Merci pour ta présence, pour la plage à Barcelone, pour tes punchs aussi bien au JKD que lors de tes présentations. Je te laisse dériver vers la « lumière » maintenant. Merci à « Leïlass ». Nos compétitions pour finir l'un avant l'autre me manqueront. Merci pour ton soutien au travail comme en-dehors. Tu as su être à l'écoute, surtout de mes délires les plus inattendus, tels des projets professionnels farfelus. Merci pour tes conseils, les repas et les goûters pris de force chez toi. Promis, cette chèvre naine sera tienne, un jour !
Aux stagiaires qui sont passés par le labo ; bien que courtes, je fis de belles rencontres : merci à Marta, Marie, Alice (Délice), Johanna, Julie, Ikrame, Yezza, Olivia, Élise, Antigoni et Iléana.

Merci aux membres de l'équipe du Docteur Reini Fernandez de Luco, tout particulièrement Andrew et Yaiza pour avoir pris le temps de me former à leurs techniques tout en répondant à mes nombreuses interrogations.

Merci à Mr Abdelhay Boulahtouf pour ta bonne humeur et ton sourire permanent. Toujours un plaisir d'échanger avec toi, dans les couloirs entre deux cafés ou deux transfections, pour refaire le monde de la science ou celui de notre quotidien avec humour. Merci pour tes conseils au jeune apprenti que je suis.

Merci à Mme Boubacar Ali Nabiya, autrement connue par son appellation de « Madame Sage » ou par son titre de Marabout de la Science. Merci pour ta franchise, tes passages intempestifs au bureau afin d'exorciser nos mauvaises ondes, les fous rires qui ont été une bouffée d'air

quand la journée semblait longue. J'espère que l'on pourra de nouveau rire autour d'une pizza au maïs.

Merci à Célestine, ancienne voisine de bureau et propriétaire de « Groot ». Merci pour ta bonne humeur et ton sourire ainsi que les tutos « salle de bactério », les soirées apéros et jeux.
Merci à Tristan pour les sorties plages, les sortie rivières, les apéros mais aussi les discussions manips, parce qu'on travaille aussi mine de rien. Merci de ton écoute et de ton entrain.

Merci à Vincent pour son enthousiasme et son humour ainsi que ses conseils. Et puis, comment ne pas apprécier un homme qui aime le basket aussi ?

Merci à mes voisins de bureau, Mélanie et Jaime, votre arrivée a redonné de la vie à ce bureau qui se vidait petit à petit. Merci pour toutes nos discussions, pour votre gentillesse et votre écoute.

Merci à Adeline pour sa gentillesse et son soutien.

Merci à Naoill pour sa disponibilité, sa bonne humeur, son écoute et son aide.

Merci à Carlo pour sa simplicité, son humour et surtout sa compétitivité. Que peut-on attendre de plus d'un partenaire de sport ?

Merci à Éric et Jean-Yves pour leur aide et leurs conseils ayant facilité le quotidien.

Merci à Philippe pour sa disponibilité et sa gentillesse, jamais avide de partager des conseils pour contribuer à améliorer ma formation.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des autres doctorants de l'institut, qui contribuent à animer notre petite « communauté » aussi bien dans la science qu'en dehors : Adrien, Antoine, Émilia, Diala, Gabriel, Guillaume, Habib, Jihad, Maëva, Madi, Rita, Romain, Sara, Valentin, Yannick et Zahra. Je vous souhaite le succès dans tout ce que vous allez entreprendre.

À ceux qui étaient là brièvement et qui ont compté : Merci à Isidora pour son enthousiasme contagieux, pour ses fameuses paroles « La La La » adaptables à toute chanson, pour la chorégraphie « soco soco bate bate vira vira ». Merci à Alecssa pour sa bonne humeur, toujours souriante, sa gentillesse, pour les sorties à découvrir de nouveaux lieux, les apéros, les activités, les fous rires et pour les recettes de cuisine (ces fameux pão de queijo).

À la squad du Top 2, Valentin et Thomas, pour m'avoir permis de m'évader et de penser à d'autre chose. Merci à vous et à Andréa pour votre enthousiasme sans bornes pour les apéros, les sorties et les jeux divers.

À mes meilleurs amis et deuxième famille : Merci à Maud, ma meilleure amie, d'avoir toujours été présente pour écouter et conseiller le « flou ». Merci pour ton soutien, tes conseils, nos fous rires, ta perception de la température et notre brin de folie commun. Merci à Dimitri pour ton aide tout au long de ces années, ta « gestuelle », nos échanges sincères mais farfelus de jour en jour. Merci à Arthur « Bill », le temps et la distance laissent certaines choses intactes, et notre amitié en fait partie. Merci à Corinne et toi, d'avoir fait de moi l'heureux parrain de votre premier enfant. À vous, tellement de choses à dire que je ne pourrais intégralement mettre par écrit.

À ma famille, je vous adresse mes remerciements les plus profonds et les plus sincères. Rien de tout ce que j'ai accompli jusqu'à aujourd'hui n'aurait été possible sans les miens. On dit qu'on ne décide pas de sa famille mais si j'avais pu le faire, je vous aurais choisi à l'infini. Merci Dada pour ta présence et tes conseils, grâce à toi, je suis devenu un homme de valeurs. Merci à mes grands frères, Tafika et Faneva, vous êtes les modèles que j'ai passé ma vie à poursuivre. Merci Mélissa pour ton soutien dans tous les instants. Merci à mes neveux, Tahiry et Mahery, vous voir me procure une grande joie, vous qui grandissez si vite que j'en perds la notion de temps. Merci Neny pour tous tes efforts afin de nous bâtir un avenir solide et faire de nous, des personnes respectables et respectées. Tu es et tu resteras dans toutes mes pensées. *Mandrapihaona Neny malala.*

Merci au ciel de m'avoir permis d'en arriver là et puisse-t-il m'accorder la grâce de toujours désirer plus que je ne puisse accomplir.

Résumé

En France, le cancer de la prostate est le premier cancer par son incidence ainsi que la troisième cause de mortalité pour cette pathologie. La progression de la maladie est dépendante des androgènes. Ainsi l'un des traitements majeurs du cancer de la prostate est la déprivation androgénique : le blocage de la production ou de l'action des androgènes conduit à inhiber la croissance tumorale. La plupart des patients répondent à cette thérapie, cependant l'évolution de la pathologie vers un stade d'insensibilité à la castration est inévitable, ce qui est associé à un mauvais pronostic. Au cours de la progression du cancer de la prostate, la voie de signalisation des androgènes demeure active grâce au récepteur des androgènes. Ce récepteur est une cible idéale afin de traiter et de bloquer la progression tumorale. Une telle inhibition du récepteur des androgènes peut être faite par l'utilisation d'un anti-androgènes de seconde génération : l'Enzalutamide. Cette molécule perturbe l'interaction entre le récepteur des androgènes et son ligand, elle peut bloquer la translocation nucléaire du récepteur activé mais elle empêche aussi son interaction avec l'ADN. Bien que l'utilisation de l'Enzalutamide ait contribué à améliorer la survie des patients, son utilisation conduit à l'émergence d'une résistance à l'Enzalutamide, ce qui constitue un défi thérapeutique considérable.

L'objectif principal de mes travaux de thèse est d'identifier de nouvelles protéines afin d'améliorer les effets thérapeutiques de l'Enzalutamide ou de surmonter la résistance à ce médicament. Ainsi dans notre étude, nous avons supposé que le traitement à l'Enzalutamide induit l'activation de voies de signalisation spécifiques, pouvant être impliquées soit dans le mécanisme d'action du médicament ou dans la résistance à ce dernier. Cette hypothèse nous a conduit à l'identification des protéines MAPKs p38, qui sont activées lors d'un traitement avec l'Enzalutamide. Nos résultats démontrent que la combinaison d'Enzalutamide et d'inhibiteur de la MAPK p38 a un effet antitumoral significatif aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Le mécanisme d'action de cet effet cytotoxique et synergique reste à l'étude. Ces données permettraient d'approfondir la compréhension des mécanismes de résistance lors d'un traitement à l'Enzalutamide et contribuer à la potentialisation de l'effet thérapeutique de cet anti-androgènes.

Abstract

In France, prostate cancer is the most frequently diagnosed male cancer and its progression is tightly associated with the androgen signals. Thus, one of the major treatments for prostate cancer is androgen deprivation: blocking the production or action of androgens leads to an inhibition of tumor growth. Most patients respond to this therapy, however to some point they reach a castration-resistant stage which is associated with a poor prognosis. Since the progression till this late cancer stage is still driven by the androgen signaling pathway, the second-line therapy is focused on targeting the active androgen receptor. Such inhibition can be done by using a second-generation anti-androgens: Enzalutamide. This molecule disrupts the interaction between the androgen receptor and its ligand, it can block the nuclear translocation of the receptor and it also prevents the receptor interaction with DNA. Although Enzalutamide treatment has helped to improve patient survival, its use has led to the emergence of Enzalutamide resistance, which is a considerable therapeutic challenge.

The main objective of my thesis is to identify new proteins in order to improve the therapeutic effects of Enzalutamide or to overcome resistance to this drug. Thus, in our study, we assumed that Enzalutamide treatment induces the activation of specific signaling pathways, which may be involved either in the mechanism of action of the drug or in resistance to it. This hypothesis led us to identify the MAPKs p38 proteins, which are activated during treatment with Enzalutamide. Our results show that the combination of Enzalutamide and p38 inhibitor has a significant antitumor effect both *in vitro* and *in vivo*. The mechanism of action of this cytotoxic and synergistic effect remains under study. These data would allow a better understanding of the Enzalutamide resistance mechanisms and contribute to the enhancement of the therapeutic effect of this anti-androgen.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS 13

INTRODUCTION 17

I. CANCER DE LA PROSTATE 17
A. STRUCTURE ET FONCTION DE LA PROSTATE 17
B. ÉPIDEMIOLOGIE DU CANCER DE LA PROSTATE 18
C. CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET PRISE EN CHARGE DU CANCER DE LA PROSTATE 18
1. Classification et stadification du cancer de la prostate 19
2. Traitement du cancer de la prostate 22
a) Cancer de la prostate localisé et localement avancé 22
(1) Surveillance 23
(2) Curiethérapie 24
(3) Chirurgie 24
(4) Radiothérapie externe 24
b) Cancer de la prostate en rechute après traitement curatif ou métastatique, sensible à la castration 25
(1) Hormonothérapie 25
c) Cancer de la prostate métastatique résistant à la castration 26
(1) Chimiothérapies 26
(a) Docetaxel 26
(b) Cabazitaxel 28
(2) Anti-androgènes de seconde génération 29
(a) Acétate d'Abiratérone (Zytiga®) 29
(b) Enzalutamide (Xtandi®) 30
(3) Dichlorure de Radium-223 (Xofigo®) 32
II. LE RECEPTEUR DES ANDROGENES 33
A. LES ANDROGENES 33
B. CARACTERISTIQUES DU RECEPTEUR DES ANDROGENES 34
C. ACTIVATION DU RECEPTEUR DES ANDROGENES 35
D. REGULATION DU RECEPTEUR DES ANDROGENES 38
1. Modifications post-traductionnelles 38
a) Phosphorylation 38
b) Acétylation 41
c) Sumoylation 42
d) Ubiquitination 42
e) Méthylation 43
2. Cofacteurs du récepteur des androgènes 43
III. MECANISMES DE RESISTANCE A LA CASTRATION 44
A. MECANISMES DE RESISTANCE A LA CASTRATION INDEPENDANTS DU RECEPTEUR DES ANDROGENES 44
1. Expression du récepteur aux glucocorticoïdes 44
2. Plasticité cellulaire : acquisition d'un phénotype neuroendocrine 44
3. Altération de voies de signalisation : exemple de PI3K-AKT-mTOR 45
B. MECANISMES DE RESISTANCE A LA CASTRATION DEPENDANTS DU RECEPTEUR DES ANDROGENES 46
1. Synthèse d'androgènes surrénaliens et intra-tumoraux 47
2. Amplification et surexpression du récepteur des androgènes 47
3. Mutations activant le récepteur des androgènes ou élargissant son spectre de ligands 48
4. Surexpression de co-activateurs du récepteur des androgènes 48

5. Expression de variants d'épissage du récepteur des androgènes : cas du variant RA-V7 49
a) Caractéristiques des variants d'épissage 49
b) Mécanismes moléculaires à l'origine des V-RA 52
c) Fonctions génomiques du RA-V7 55
d) Implication dans la résistance à l'Enzalutamide 57
e) Évaluation en tant que biomarqueur pronostique 58
IV. LA VOIE DE SIGNALISATION DE LA MAPK P38 62
A. LES MAPKS 62
1. Généralités 62
2. Les MAPKs p38 63
B. REGULATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DES MAPKS P38 64
1. Activation des MAPKs p38 64
2. Inhibition des MAPKs p38 66
a) Inhibition par les phosphatases 66
b) Inhibition pharmacologique 67
C. IMPLICATION DE LA MAPK P38 DANS LE CANCER DE LA PROSTATE 69
1. Expression dans le cancer de la prostate 69
2. Implication dans la progression tumorale et la résistance au traitement 69

OBJECTIFS DE LA THESE 73

MATERIELS ET METHODES 76

I. CULTURE CELLULAIRE 76
A. LIGNEES CELLULAIRES DU CANCER DE LA PROSTATE 76
B. CONDITIONS DE CULTURE 77
II. TEST DE CYTOTOXICITE CELLULAIRE A LA SULFORHODAMINE B 77
III. TEST DE COMBINAISON DE MEDICAMENTS 78
IV. MEDICAMENTS ET INHIBITEURS DE P38 UTILISES 80
V. EXTRACTION PROTEIQUE 80
VI. WESTERN BLOT 81
VII. ANALYSE PAR PHOSPHOPROTEOMIQUE (PAMGENE ASSAY) 82
VIII. CARACTERISATION DE L'EFFET DES COMBINAISONS DE MEDICAMENTS PAR CELIGO 84
A. ESTIMATION DU NOMBRE DE CELLULES ET DE LA VIABILITE CELLULAIRE 84
B. ÉVALUATION DE LA SYNTHESE D'ADN 84
C. MESURE DU DIAMETRE ET ESTIMATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE DES SPHEROÏDES 85
IX. ÉTUDE *IN VIVO* DE L'EFFET DE L'EFFET DE LA COMBINAISON DE MEDICAMENTS 86
X. ÉVALUATION DE L'EFFET DES MEDICAMENTS SUR L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RECEPTEUR DES ANDROGENES 87

RESULTATS 90

I. LA MAPK P38 EST ACTIVEE PAR L'ENZALUTAMIDE 90
II. TEST DE LA COMBINAISON DE MEDICAMENTS SUR DES LIGNEES DU CAP 92
A. LA COMBINAISON DE TRAITEMENTS ENZALUTAMIDE ET INHIBITEUR DE P38 A UN EFFET SYNERGIQUE SUR LES LIGNEES DE CAP EN 2D 92
B. LA COMBINAISON DE MEDICAMENTS ENZALUTAMIDE + INHIBITEUR DE P38 A UN EFFET SYNERGIQUE SUR LES LIGNEES DE CAP EN 3D 98
III. CARACTERISATION DE L'EFFET DE LA COMBINAISON DE MEDICAMENTS SUR DES LIGNEES DU CAP 104
A. LA COMBINAISON ENZALUTAMIDE + SB202190 A UN EFFET CYTOSTATIQUE SUR LES LIGNEES DE CAP 104

B. LES COMBINAISONS « ENZALUTAMIDE + LY2228820 » ET « ENZALUTAMIDE + ARRY-614 » ONT UN EFFET CYTOSTATIQUE ET CYTOTOXIQUE SUR LES LIGNEES DU CAP 106
IV. LA COMBINAISON « ENZALUTAMIDE + SB202190 » A UN EFFET SYNERGIQUE *IN VIVO* 111
V. ÉVALUATION DE L'EFFET DES MEDICAMENTS SUR L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RA 113
A. LES INHIBITEURS DE P38 INHIBENT L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RA 113
B. L'ASSOCIATION DE L'ENZALUTAMIDE AVEC UN INHIBITEUR DE P38 POTENTIALISE SON INHIBITION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RA 115
VI. LA COMBINAISON ENZALUTAMIDE ET INHIBITEUR DE P38 REDUIT L'EXPRESSION DU VARIANT RA-V7 119

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES 121

CONCLUSION GENERALE 139

ANNEXES 141

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 142

TABLE DES ILLUSTRATIONS ET DES FIGURES 165

Liste des abréviations

17β-HSD : 17β-hydroxysteroid dehydrogenase

3β-HSD : 3β-hydroxysteroid dehydrogenase-Δ5-4-isomerase

AD : Androstenedione.

AF-1 : Fonction de transactivation 1

AF-2 : Fonction de transactivation 2

AKR1C3 : Aldo-Keto Reductase family 1 member C3

AKT : Protein kinase B

ATF2 : cyclic AMP-dependent Transcription Factor-2

ARE : Élément de réponse aux androgènes

ASK1 : Apoptosis Signal regulating Kinase 1

ASOs : Oligonucléotides antisens

BIRC3 : Baculoviral IAP Repeat Containing 3

BMK : Big Map Kinase

CCNA2 : Cyclin A2

CDC25B : Cell Division Cycle 25B

CTC : Cellules Tumorales Circulantes

CaP : Cancer de la Prostate

CD : Cluster of Differentiation

CdK : Cyclin-dependent Kinase

COX-2 : Cyclooxygenase-2

CPNE : Cancer de la Prostate NeuroEndocrinien

CPRC : Cancer de la prostate métastatique résistant à la castration

CYP17A1 : Cytochrome P450 family 17 subfamily A polypeptide 1

DBD : Domaine de liaison à l'ADN

DCC : Dextran Coated Charcoal

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHEA-S : Sulfate de déhydroépiandrostérone

DHT : Dihydrotestostérone

DLK1 : Dual-Leucine zipper-bearing Kinase 1

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DRO : Dérivé Réactif de l'Oxygène

DUSP : Dual-Specificity Phosphatases

ECL : Enhanced ChimiLuminescent

EDN2 : Endothelin 2

EdU : 5-Ethynyl-2´-deoxyuridine

EGF : Epidermal Growth Factor

ERE : Éléments de Réponse aux Œstrogènes

ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2

ETS2 : ETS Proto-Oncogene 2

FKBP5 : FKBP Prolyl Isomerase 5

FKBP51 : FK506-binding protein 51

FT : Facteur de Transcription

GnRh : Gonadotrophines hypophysaires

HATs : Histones AcétylTransférase

HES1 : Hes Family BHLH Transcription Factor 1

HDACs : Histones Désacétylases

hnRNPs : heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins

HR : Hazard Ratio

HSP : Heat-Shock Protein

HuR : Human antigen R

IC : Intervalle de Confiance

IKK2 : Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase subunit β

IL : Interleukine

IP : Iodure de Propidium

ISUP : International Society of Urological Pathology

JNK : c-Jun N-terminal kinase

KLK2 : Kallikrein Related Peptidase 2

KLK3 : Kallikrein Related Peptidase 3

LBD : Domaine de fixation du ligand

LH : Hormone lutéinisante

LH-RH : Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone

LNCaP : Lymph Node Cancer Prostate

LPS : Lipopolysaccharide

MAPKs : Mitogen-Activated Protein Kinases

MDH1 : Malate Dehydrogenase 1

MDM2: Murine Double Minute 2

miARN : micro-ARN$

MK: MAP kinase-activated protein kinase

MKK: MAPK Kinase Kinase

MKKK : MAPK Kinase Kinase Kinase

MKP : MAPK Phosphatases

NKX3-1 : NK3 Homoeobox 1

MLK3 : Mixed Lineage Kinase 3

MMP-2 : Matrix Metalloproteinase type 2

MRG15 : MORF-related gene 15

mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin

NCOA3 : Nuclear receptor coactivator 3

NLS : Signal de Localisation Nucléaire

NR3C : Nuclear Receptor subfamily group C

NTD : Domaine amino-terminal

OGDH : Oxoglutarate Dehydrogenase

ORM1 : Orosomucoid 1

PAK6 : p21-activated kinase 6

PDX : Patient-Derived Xenograft

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKA : Protein Kinase A

PP2A : Protein phosphatase 2

PP2C : Serine/threonine protein phosphatase 2C

PSA : Antigène Prostatique Spécifique

PSMA : Prostate Specific Membrane Antigen

PSIP1 : PC4 and SRSF1 interacting protein 1

PTB : Polypyrimidine Tract-Binding protein

PTEN : Phosphatase and Tensin homolog

RA : Récepteur des Androgènes

RA-e : Récepteur des Androgènes entier (non tronqué)

RA-V7 : Variant 7 d'épissage du Récepteur des Androgènes

RASSF3 : Ras Association Domain Family Member 3

Rb1 : Protéine du rétinoblastome

RG : Récepteur des Glucocorticoïdes

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

ROR-γ : Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ

SAPK : Stress-Activated Protein Kinase

SG : Score de Gleason

SGK1 : Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1

SIRT1 : Sirtuine 1

SPOP : Speckle-type POZ Protein

SRD5A1 : Steroid 5 Alpha-Reductase 1

SRSF1 : Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1

STAT-3 : Signal Transducer and Activator of Transcription-3

STS : Steryl-Sulfatase

SULT2A1 : bile salt sulfotransferase

SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier

TAB1 : Transforming growth factor-Activated protein kinase 1-Binding protein 1

TAO1/2 : Thousand-And-One amino acid ½

TCA : Acide trichloroacétique

TCR-CD3 : T-cell receptor-Cluster of Differentiation 3

TEM : Transition Epithélio-Mesenchymateuse

TMPRSS2 : Transmembrane Serine Protease 2

TNFα : Tumor Necrosis Factor α

TNM : Tumeur primitive – Ganglions lymphatiques – Métastases

TRAMP : Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate

TTP : Tristetraproline

UBE2C : Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 C

V-RA : Variants d'épissage du Récepteur des Androgènes

Wip1 : Wild-type p53-induced phosphatase 1

ZAP70 : Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70

ZEB1 : Zinc finger E-box-binding homeobox 1

Introduction

I. Cancer de la prostate

A. Structure et fonction de la prostate

La prostate est une glande exocrine faisant partie de l'appareil uro-génital masculin. Elle est située sous la vessie, au-dessus du périnée, en arrière de la symphyse pubienne, en avant du rectum et autour du canal de l'urètre. La prostate est structurée en différentes zones anatomiques (**Figure 1**)[1] :

- Zone transitionnelle : partie centrale de la glande, entourant la portion de l'urètre traversant la prostate
- Zone centrale : entourant les canaux éjaculateurs, efférences des vésicules séminales, traversant la prostate jusqu'à l'urètre,
- Zone périphérique : proche du rectum et constituant la majeure partie de la glande. Cette région est la plus touchée lors de développement de cancers
- Stroma fibromusculaire antérieur : située en avant de l'urètre, elle est composée de fibres musculaires et de tissu conjonctif fibreux formant l'apex de la prostate.

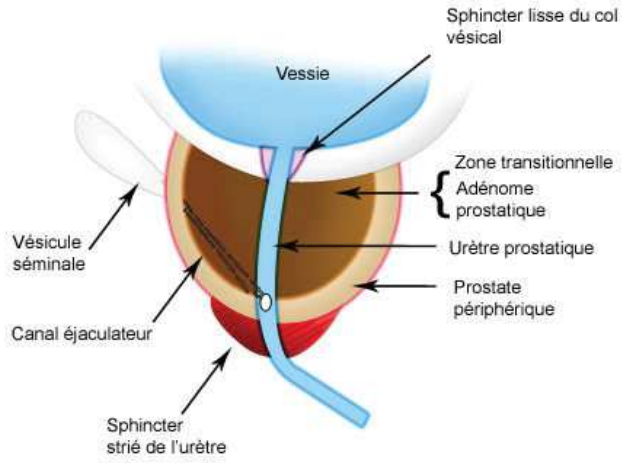


Figure 1 : Structures de la prostate

La prostate contribue à la synthèse de la composante la plus abondante du sperme, le liquide prostatique, qui assure la survie des spermatozoïdes le long de leur progression dans les voies génitales femelles, et qui contient une protéine caractéristique, l'antigène prostatique spécifique (PSA : *Prostate Specific Antigen*), une protéase permettant la liquéfaction du sperme.

B. Épidémiologie du cancer de la prostate

En France, le cancer de prostate (CaP) demeure la tumeur solide la plus souvent diagnostiquée chez les hommes avec 50 430 nouveaux cas en 2015. De plus, cette maladie est la troisième cause de mortalité due à un cancer avec 8 512 décès estimés au cours de cette même année[2].

Plusieurs facteurs de risque sont associés au CaP :

- l'âge : le CaP est très rare à l'âge de 50 ans et touche principalement les hommes aux alentours de 70 ans ;
- l'origine ethnique : des hommes ayant des origines africaines ou antillaises ont un risque accru de développer la maladie[3,4] ;
- les antécédents familiaux : le risque de développer un CaP est multiplié chez les hommes ayant au moins deux parents proches atteints de la maladie[5], et ce risque est d'autant plus élevé si le diagnostic des membres de la famille a été réalisé avant leur 65 ans ;
- Certaines altérations génétiques ont été identifiées, comme des facteurs de susceptibilité dans le CaP. C'est le cas, par exemple, des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs BRCA1/BRCA2[6–8] ou du facteur de transcription (FT) HOXB13[9] associées à des tumeurs plus agressives.

D'autres éléments sont évoqués comme de potentiels facteurs de risque mais leur réelle implication reste à démontrer dans l'étiologie de la maladie. Ainsi, des facteurs environnementaux tels que les expositions fréquentes et prolongées à des xénobiotiques (pesticides, cadmium…) considérés comme des perturbateurs endocriniens sont à l'étude dans le développement du CaP[10].

C. Caractéristiques cliniques et prise en charge du cancer de la prostate

L'évolution de la maladie est souvent lente, s'étalant sur plusieurs années, et est fréquemment asymptomatique lorsqu'elle est localisée.

1. Classification et stadification du cancer de la prostate

Le CaP est diagnostiqué, le plus souvent, à l'examen anatomopathologique de biopsies prostatiques, obtenues suite à l'apparition des symptômes spécifique ou à la détection d'une augmentation du PSA en cours de dépistage.

L'examen anatomopathologique permet aussi de déterminer le score de Gleason (SG), qui est un des paramètres principaux pour l'estimation du pronostic du CaP. Initialement proposé en 1966, le SG est basé sur le système de grade de Gleason, une échelle représentant le degré de différenciation des cellules tumorales par des valeurs allant de 1 à 5[11] : le grade 1 étant assigné aux cellules très différenciées, et le grade 5 correspondant aux cellules très indifférenciées (**Figure 2**)[12].

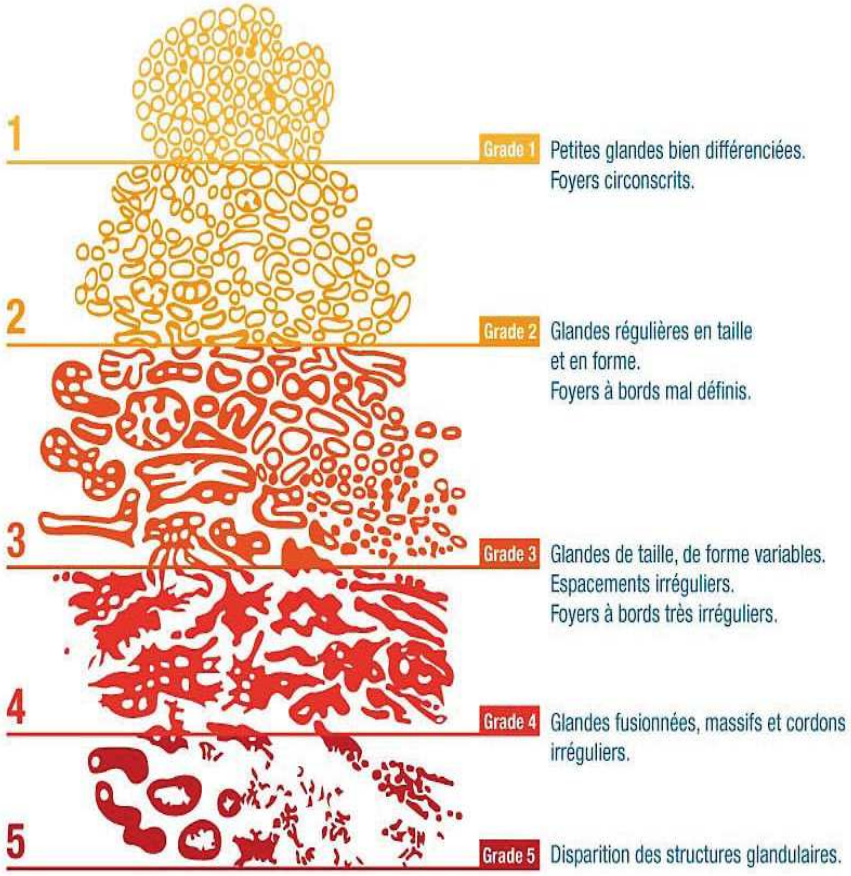


Figure 2 : Représentation du grade de Gleason

Le SG est déterminé selon les règles suivantes : (i) en présence d'un seul grade, le SG correspond au double de la valeur de ce grade ; (ii) en présence de deux degrés de différenciation, le SG est équivalent à la somme de ces deux grades ; (iii) en présence de plus

de deux degrés de différenciation, le grade le plus représenté et le grade le plus élevé sont pris en compte ; (iv) en tout cas, le score le plus bas qu'on puisse assigner est de 6. Depuis 2014, une nomenclature simplifiée, basée sur le SG, est utilisée : la classification ISUP (*International Society of Urological Pathology*), qui définit 5 groupes pronostics (**Tableau 1**)[13].

Grade ISUP	Score de Gleason	Statut tumoral
1	6 (3+3)	Faible agressivité
2	7 (3+4)	Agressivité modérée
3	7 (4+3)	
4	8 (4+4, 3+5 ou 5+3)	Forte agressivité
5	9-10 (4+5, 5+4, 5+5)	

Tableau 1 : Classification ISUP du cancer de la prostate

La détermination du stade du cancer est aussi permise par l'utilisation de la classification TNM tenant compte de trois critères (**Tableau 2**) :

- La taille de la tumeur primitive (**T**)
- L'envahissement des ganglions lymphatiques (**N**)
- La présence ou non de métastases à distance (**M**)

T= Tumeur primaire	
Classification clinique (cT)	
TX	Tumeur primitive non évaluée
T0	Tumeur primitive non retrouvée
T1T1	Tumeur non palpable ou non visible par imagerie
T1a	Découverte histologique d'une tumeur dans ≤5% des tissus réséqués (au moment de la résection transurétrale de la prostate)
T1b	Découverte histologique d'une tumeur dans >5% des tissus réséqués (au moment de la résection transurétrale de la prostate)
T1cT1c	Tumeur identifiée par biopsie à l'aiguille (en raison d'un taux élevé de PSA)
T2	Tumeur confinée à l'intérieur de la prostate (les tumeurs trouvées dans l'un ou les deux lobes par biopsie à l'aiguille mais non palpables par toucher rectal ou visibles par imagerie sont classées comme T1c)
T2a	Tumeur touchant la moitié d'un lobe ou moins.
T2b	Tumeur touchant plus de la moitié d'un lobe mais pas les deux lobes
T3a	Extension extracapsulaire de la tumeur (uni- ou bilatérale)
T3b	Invasion tumorale des vésicules séminales
T4	Tumeur fixée ou envahissant les structures adjacentes, autre que les vésicules séminales (vessie, muscles élévateurs et/ou paroi pelvienne)
Classification pathologique (pT)	
pT2	Limitée à l'organe
pT3	Extension extraprostatique
pT3a	Extension extraprostatique ou invasion microscopique du col de la vessie
pT3b	Invasion des vésicules séminales
pT4	Tumeur fixée ou invasion tumorale des structures adjacentes autre que les vésicules séminales (vessie, rectum)
N = Ganglions lymphatiques régionaux	
Classification clinique (cT)	
Nx	Ganglions lymphatiques régionaux non évalués
N0	Absence de métastase ganglionnaire
N1	Atteinte ganglionnaire métastatique
Classification pathologique (pN)	
pNx	Ganglions régionaux non évalués
pN0	Absence de métastase ganglionnaire
pN1	Atteinte ganglionnaire métastatique
M = Métastases à distance	
M0	Absence de métastases à distance
M1	Métastases à distance
M1a	Atteinte des ganglions lymphatiques non régionaux

M1b	Atteinte osseuse
M1c	Métastases à d'autres sites avec ou sans atteinte osseuse

Une autre nomenclature, la classification de D'Amico permet de catégoriser le cancer de prostate localisé (cT1-2 N0 M0) en fonction du risque de rechute, afin de déterminer l'orientation thérapeutique du patient. Il prend en compte le SG, la classification clinique du TNM et le taux de PSA afin d'organiser les patients en trois groupes[14]:

- risque faible : PSA ≤ 10 ng/mL, et score de Gleason ≤ 6, et stade clinique T1c ou T2a ;
- risque intermédiaire : PSA entre 10 et 20 ng/mL, ou score de Gleason de 7, ou stade clinique T2b ;
- risque élevé : PSA > 20 ng/mL, ou score de Gleason > 7 (8, 9 ou 10) ou stade clinique T2c.

2. Traitement du cancer de la prostate

Les différents examens réalisés, afin de poser le diagnostic du CaP, permettent d'orienter le choix du traitement. La prise en charge du patient tiendra compte de son état général et de la progression de sa maladie. Ainsi les différentes stratégies thérapeutiques seront adaptées selon le statut tumoral du patient[15].

a) Cancer de la prostate localisé et localement avancé

L'approche thérapeutique pour les patients affectés par un CaP non métastatique est déterminé sur la base de la stadification selon le système TNM et du risque de rechute selon la classification de D'Amico[15,16] (**Tableau 3**).

Tableau 2 : La classification clinique du TNM des tumeurs de la prostate (préopératoire)

Statut tumoral	Approche thérapeutique
Localisé à risque faible cT1-2a et SG ≤ 7 (Grade ISUP 1) et PSA ≤ 10 ng/mL	- Surveillance active - Curiethérapie - Prostatectomie totale - Radiothérapie externe
Localisé à risque moyen cT2b ou SG de 7 (Grade ISUP 2/3) ou PSA entre 10-20 ng/mL	- Surveillance active - Curiethérapie - Prostatectomie totale - Radiothérapie externe +/- suppression androgénique néo-adjuvante
Localisé à risque élevé cT2c ou SG > 7 (Grade ISUP 4/5) ou PSA > 20 ng/mL	- Suppression androgénique néo-adjuvante + radiothérapie externe + suppression androgénique adjuvante - Prostatectomie totale + curage ganglionnaire pelvien
Localement avancé (cT3-4 ou cN+)	- Suppression androgénique néo-adjuvante + radiothérapie externe + suppression androgénique adjuvante - Prostatectomie totale + curage ganglionnaire pelvien - Suppression androgénique

Tableau 3 : Stratégies thérapeutiques pour le CAP localisé ou localement avancé

Les différentes thérapies évoquées sont détaillées ci-après.

(1) Surveillance

Deux stratégies de suivi peuvent être adoptées selon l'espérance de vie estimée du patient : l'attente vigilante et la surveillance active.

L'attente vigilante concerne les patients inaptes à recevoir un traitement curatif. Les raisons de cette inéligibilité sont une réduction de l'espérance de vie du patient, à cause de son âge et/ou de potentielles comorbidités pouvant conduire à augmenter le risque de décès par d'autres causes que le CaP. Durant ce suivi, les traitements seront orientés, au fur et à mesure de l'apparition des symptômes, afin d'améliorer la qualité de vie du patient[17,18].

La surveillance active est destinée aux patients présentant un CaP dont la prise en charge ne nécessite pas un traitement curatif immédiat. Cependant la surveillance active incombe au patient de réaliser des examens réguliers par le contrôle de son taux de PSA (tous les 6 mois)

et la réalisation de biopsies. Ces divers examens permettent de déclencher le traitement curatif à des seuils prédéfinis des paramètres contrôlés, afin de traiter la maladie à un stade potentiellement mortelle mais curable, tout en préservant l'espérance de vie[19]. Ainsi le critère d'arrêt de la surveillance active, outre le souhait du patient, passe par un changement dans les résultats des biopsies ou d'une progression du stade T.

(2) Curiethérapie

La curiethérapie ou radiothérapie interne est un traitement local des cancers de la prostate. Ce traitement utilise les rayonnements d'implants radioactifs, placés à l'intérieur de la prostate, afin de détruire les cellules cancéreuses. La décroissance du rayonnement au fur et à mesure de l'éloignement des sources radioactives permet de limiter les effets sur les tissus avoisinants. La curiethérapie est indiquée pour les patients atteints d'un CAP localisé et présentant de faibles risques de récidive.

Il existe deux procédés de curiethérapie :

- par implant temporaire (source Iridium 192), à la suite de l'irradiation, les éléments radioactifs ne restent pas dans la prostate.
- par implant permanent (grains d'Iode 125), qui demeure le procédé le plus commun

La curiethérapie peut être associée à de la radiothérapie externe ou de l'hormonothérapie.

(3) Chirurgie

La chirurgie est proposée aux patients ayant un CAP localisé ou localement avancé, et consiste à réaliser une ablation totale de la prostate, des vésicules séminales et d'une partie des canaux déférents.

(4) Radiothérapie externe

La radiothérapie externe est basée sur l'utilisation dirigée de rayonnements ionisants afin de détruire localement les cellules cancéreuses afin de prévenir leur prolifération. Elle constitue l'un des traitements de références pour les cancers localisés ou localement avancés.

b) Cancer de la prostate en rechute après traitement curatif ou métastatique, sensible à la castration

(1) Hormonothérapie

Le traitement des patients avec un CaP en rechute après traitement curatif ou présentant une diffusion métastatique de la maladie comprend toujours une hormonothérapie. Cette forme de traitement tire avantage du caractère hormono-dépendant des cellules cancéreuses de la prostate : la progression tumorale est stimulée par la présence d'androgènes, notamment la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). Ainsi par le blocage de la production ou de l'action des androgènes, la croissance tumorale est stoppée ou ralentie[20,21]. La privation androgénique peut être obtenue par deux approches :

- La castration chirurgicale (orchidectomie bilatérale) ;
- La castration chimique : ce traitement a recours à des analogues (agonistes ou antagonistes) de la LH-RH[22,23]

La suppression androgénique peut être utilisée pour des formes localisées du CaP, en association avec la radiothérapie, pendant une courte durée (6 mois) pour les cancers à risque intermédiaire ou de longue durée (3 ans) pour les cancers à haut risque.

La déprivation androgénique peut être associée à des anti-androgènes afin de s'assurer d'un blocage androgénique complet. Ces anti-androgènes vont inhiber l'activation du récepteur des androgènes (RA) en se liant de manière compétitive au niveau du site de liaison à son ligand : la DHT. On distingue deux classes[24] :

- Les anti-androgènes stéroïdiens : l'acétate de cyprotérone (Androcure®)
- Les anti-androgènes non-stéroïdiens : Nilutamide (Anandron®), Flutamide (Eulexin®) et Bicalutamide (Casodex®).

c) Cancer de la prostate métastatique résistant à la castration

Au fil du temps, le patient développe un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (CPRC)[25–27].

La résistance à la castration signifie que le cancer progresse malgré la suppression androgénique. Ce stade est défini par différents critères :

- une testostéronémie caractéristique d'une castration (< 50 ng/dL ou 1,7 nmol/L) ;
- une progression biologique, caractérisée par trois augmentations du PSA à au moins une semaine d'intervalle, avec deux augmentations > 50 % de la valeur de PSA par rapport au nadir et des valeurs de PSA supérieures à 2 ng/ml ;
- une progression radiologique.

Les traitements à disposition et le choix de la séquence thérapeutique optimal sont dépendants du tableau clinique et du souhait du patient[15].

(1) Chimiothérapies

(a) Docetaxel

Le Docetaxel est un alcaloïde qui cible les cellules cancéreuses par l'inhibition de leurs mécanismes de division cellulaire. La molécule stabilise les microtubules, en liant la tubuline ce qui inhibe leur dépolymérisation et conduit au blocage de la mitose cellulaire[28]. C'est le premier traitement ayant démontré un bénéfice significatif sur la survie chez des patients atteints d'un CPRC dans deux essais cliniques de phases III. Dans l'étude TAX 327, l'effet du Docetaxel associé à de la Prednisone (un corticostéroïde) a été comparé à l'effet de la Mitoxantrone couplé à de la Prednisone. La Mitoxantrone fut la première chimiothérapie proposée aux patients atteints d'un CPRC[16] ; cette molécule permettait d'atténuer la douleur et d'améliorer la qualité de vie des patients sans pour autant augmenter leur survie[29]. L'étude « SWOG9916 », par contre, visait à étudier l'effet du Docetaxel associé à l'Estramustine, comparé à la Mitoxantrone apparié à la Prednisone[30]. Les deux études ont démontré une amélioration de la survie globale par le Docetaxel :

- 18,9 mois pour le bras Docetaxel + Prednisone comparé à 16,5 mois pour le bras Mitoxantrone + Prednisone (*Hazard Ratio* (HR) = 0.76 ; 0.62 – 0.94 ; Intervalle de confiance (IC) = 95% ; $p = 0.009$)
- 17,5 mois pour le bras Docetaxel + Estramustine comparé à 15,6 mois pour le bras Mitoxantrone + Prednisone (HR = 0.80 ; 0.67 – 0.97 ; IC 95% ; $p = 0.009$)

Il faut préciser ici qu'un nombre limité de patients affectés par un CaP peut présenter des lésions métastatiques déjà au diagnostic, donc dans un contexte de potentielle sensibilité à la castration. Trois études ont été réalisées afin de comparer l'effet du Docetaxel en association avec la déprivation androgénique à la suppression androgénique seule dans ce contexte clinique.

L'essai randomisé de phase III GETUG-AFU15 a évalué l'efficacité et la tolérance d'une association de Docétaxel et hormonothérapie chez des patients présentant un CaP métastatique. L'utilisation de Docetaxel a amélioré la survie sans progression biochimique (23 mois avec Docetaxel contre 13 mois sans chimiothérapie ; HR : 0.72, $p = 0.0052$) et clinique (23 mois contre 15 mois sans chimiothérapie (HR : 0.75, $p = 0.0147$). Cependant la combinaison de traitement ne conduisait pas à une amélioration significative du bénéfice de survie. Après un suivi médian de 50 mois, la médiane de survie était de 58,9 mois pour le bras Docetaxel comparé à 54,2 mois pour le bras déprivation androgénique seul (HR : 1.01 ; 0.75 – 1.36 ; IC 95%). Et cette absence de différence dans la médiane de survie des deux bras n'est toujours pas visible après 82,9 mois de suivi médian[31].

L'étude ECOG-CHAARTED a évalué l'effet de l'administration de Docetaxel avec la déprivation androgénique comparé à l'hormonothérapie seule. La médiane de survie est plus importante pour les patients traités avec le Docetaxel et l'hormonothérapie comparé à la déprivation androgénique seule (57.6 mois pour 44 mois ; HR = 0.61 ; 0.47-0.80 ; IC 95% ; $p < 0.001$). Le groupe de patients présentant une charge de maladie plus importante ont eu un bénéfice de survie de 17 mois avec l'ajout de la chimiothérapie (49,2 mois pour le bras Docetaxel avec hormonothérapie comparé aux 32,2 mois du bras hormonothérapie ; HR = 0.60 ; O.45-0.81 ; IC 95% ; $p < 0.001$). Cette étude a démontré que l'utilisation de la chimiothérapie associé à l'hormonothérapie, conduisait à augmenter la survie globale des patients : la survie médian étant de 58 mois avec l'ajout de la chimiothérapie contre 47 mois avec l'hormonothérapie seule (HR : 0.73 ; 0.59-0.89 ; IC 95%)[32,33].

L'essai randomisé STAMPEDE comprenait plusieurs bras de traitement : hormonothérapie seule, Docetaxel + hormonothérapie, les deux traitements avec ou sans ajout d'acide zolédronique (un biphosphonate). Après un suivi médian de 43 mois, une amélioration de la

survie globale a été retrouvée chez les patients avec une CaP métastatique que ce soit dans le bras Docetaxel + hormonothérapie (HR = 0.8 ; 0.65-0.99 ; IC 95%) ou dans le bras Docetaxel + hormonothérapie + acide zolédronique (HR = 0.92 ; 0.75-1.12 ; IC 95%). L'analyse d'un sous-groupe de patients avec une CaP métastatique montre que l'ajout de Docetaxel induit un bénéfice sur la survie globale (65 mois contre 43 mois sans ajout de Docetaxel ; HR = 0.73 ; 0.59-0.89 ; IC 95%). Cependant les patients avec un CaP avancé, sans métastases, n'ont aucun bénéfice de l'ajout de Docetaxel (HR = 1.01 ; 0.65-1.56 ; 95% IC)[34].

Une méta-analyse de l'ensemble des données de ces essais cliniques ont confirmé l'effet bénéfique de l'association de Docetaxel avec de l'hormonothérapie, sur la survie des patients atteints de CaP métastatique hormonosensible[35].

(b) Cabazitaxel

Jusqu'en 2010, le Docetaxel demeurait le traitement de référence sans alternative en cas d'échappement à cette thérapie. Le Cabazitaxel est un dérivé semi-synthétique, appartenant à la famille des taxanes. Il a été développé afin de servir de deuxième ligne de traitement en cas de résistance à la chimiothérapie de première ligne. Le Cabazitaxel partage le même mécanisme d'action que le Docetaxel : il se fixe à la tubuline, ce qui induit son assemblage en microtubules, ne pouvant se dépolymériser, et bloque la mitose cellulaire. L'étude de phase III randomisée « TROPIC », a comparé, l'effet du Cabazitaxel associée à la Prednisone comparé à un traitement incluant la Mitoxantrone associé à la Prednisone. Cet essai a été réalisé chez des patients prétraités, sans succès, avec le Docetaxel. Les résultats ont indiqué une amélioration de la médiane de survie globale, de 2,4 mois, avec l'utilisation du Cabazitaxel (12,5 mois à 15,1 mois ; HR = 0.70 ; 0.59-0.83 ; IC 95% ; $p < 0.0001$)[28]. Ces résultats ont conduit à la mise en place du Cabazitaxel en tant que traitement de 2e ligne suite à une résistance au Docetaxel.
Par ailleurs, un essai clinique randomisé de phase III « FIRSTANA » a testé l'effet du Cabazitaxel comparé au Docetaxel en tant que traitement de première ligne de patients chimionaïfs ayant un CPRC ou un CaP localisé à haut risque. Ainsi les patients ont été traités avec trois bras différents : Cabazitaxel 20 mg/m^2 (C20), Cabazitaxel 25 mg/m^2 (C25) et Docetaxel 75 mg/m^2 (D75). Les résultats indiquent que l'effet du Cabazitaxel n'est pas supérieur à celui du Docetaxel sur la survie globale : 24,5 mois pour le C20 (HR vs Docetaxel = 1.01 ; $p = 0.997$), 25.2 mois pour le C25 (HR vs Docetaxel = 0 ; $p = 0.757$) et 24,3 mois pour le D75[36].

Mes travaux de thèse portent sur l'étude du CPRC et plus particulièrement sur la résistance à l'anti-androgènes de seconde génération : l'Enzalutamide. Notre but est de pouvoir améliorer ce traitement par la compréhension des mécanismes à l'origine de la résistance à l'Enzalutamide. Il est donc nécessaire de développer l'ensemble des mécanismes pouvant être impliqués dans la résistance thérapeutique.

(2) Anti-androgènes de seconde génération

Les patients traités par déprivation androgénique s'orientent inévitablement vers une résistance à la castration [25]. Ainsi ces derniers ne répondent plus à la première thérapie de suppression des androgènes et ce stade de la maladie est associé à un mauvais pronostic. L'évolutivité de la maladie vers une résistance à la castration hormonale a encouragé la recherche d'alternatives thérapeutiques. Ainsi il a été prouvé que le RA restait actif dans des cellules du CaP et contribuait à leur prolifération. En effet, la surexpression du RA suffisait à promouvoir la progression tumorale malgré un traitement par déprivation androgénique dans des modèles murins de xénogreffe[37,38].

Ces médicaments sont le sujet d'étude de cette thèse et seront les seuls traitements considérés dans la suite du développement de nos travaux.

(a) Acétate d'Abiratérone (Zytiga®)

L'acétate d'Abiratérone est un inhibiteur de la biosynthèse d'androgènes issu de la métabolisation de substrats androgéniques surrénaliens ou du cholestérol. Ce traitement va cibler le cytochrome P450 17A1 (CYP17A1), l'enzyme clé de la stéroïdogenèse. Le CYP17A1 possède deux activités enzymatiques : une fonction 17α-hydroxylase, responsable de la conversion de la prégnénolone et de la progestérone en précurseurs des glucocorticoïdes (17-OH prégnénolone et 17-OH progestérone). Sa deuxième fonction, 17;20-lyase, est responsable de la production de déhydroépiandrostérone et d'androstènedione, à partir de précurseurs de glucocorticoïdes (**Figure 3**)[39]. L'utilisation d'acétate d'Abiratérone inhibe ces deux activités

enzymatiques, ce qui conduit à diminuer la production androgénique au niveau des glandes surrénales, des testicules et des tissus tumoraux. Il en résulte une réduction de la testostéronémie chez des patients atteints d'un CaP[40,41].

L'usage de l'acétate d'Abiratérone a été testé dans deux études de phases III sur des patients atteints de CPRC. L'essai COU-AA-301 visait à comparer l'efficacité et la tolérance de l'Abiratérone par rapport à un placebo dans une étude de phase III randomisée en double aveugle chez des patients ayant déjà reçus une chimiothérapie à base de docétaxel[42]. L'essai COU-AA-302 a été réalisé chez des patients chimio-naïfs atteints d'un CRPC asymptomatique ou peu symptomatique, et visait à comparer l'efficacité et la tolérance de l'Abiratérone à un placebo[43,44]. Les résultats des deux essais montrent un gain en survie globale :

- 14,8 mois dans le bras Abiratérone comparé à 10,9 mois pour le bras placebo (HR = 0.65 ; 0.54-0.77 ; IC = 95% ; p <0,001) dans l'essai COU-AA-301 ;
- 34,7 mois dans le bras Abiratérone comparé à 30,3 mois dans le bras placebo (HR = 0.81 ; 0.70-0.93 ; IC 95% ; p = 0,0033) dans l'essai COU-AA-302

Récemment, une autre étude a démontré un effet de ce traitement pour la CaP en phase métastatique précoce, hormono-sensible[45]. Cet essai clinique de phase III, réalisé en double aveugle, vise à étudier, dans une cohorte de 1199 patients avec un CaP hormonosensible, l'effet d'un traitement avec de l'Abiratérone associé à de la prednisone, par rapport à deux placebos. Les premiers résultats de cette étude étaient pour une durée de suivi médian de 30,4 mois. Les patients ayant reçu de l'Abiratérone ont une survie sans progression de 33 mois vs 14.8 mois pour les patients ayant reçu le placebo (HR = 0.47 ; 0.39 – 0.55 ; IC 95% ; p<0.001). Ces données ont conduit à une autorisation d'utilisation de l'Abiratérone pour le traitement des patients présentant un CaP métastatique hormonosensible à haut risque, en février 2018. Les résultats finaux de cette étude, pour un suivi médian de 51.8 mois, confirment les précédents résultats. Les patients traités avec l'Abiratérone ont une survie globale de 53.3 mois vs 36.5 mois pour les patients recevant un placebo (HR = 0.7 ; 0.6-0.8 ; IC 95% ; p<0.0001)[46].

(b) Enzalutamide (Xtandi®)

L'Enzalutamide est un anti-androgène non stéroïdien choisi sur la base de son affinité et de sa sélectivité pour le RA dans des modèles de CaP. Cette molécule possède une affinité 5 à 8 fois supérieure au bicalutamide[47–49]. L'Enzalutamide agit en tant qu'inhibiteur du RA en entravant

sa translocation nucléaire, en bloquant sa liaison à l'ADN et en empêchant le recrutement de ses co-activateurs (**Figure 3**)[39]. De plus, l'Enzalutamide est un antagoniste pur, sans propriétés agonistes détectables dans des cellules de CaP (LNCaP) surexprimant le RA. Il a été démontré que le médicament induit également une régression des tumeurs de xénogreffes de souris mâles castrées, un modèle où le traitement au bicalutamide ralentit seulement la croissance[50].

L'Enzalutamide a été testé dans deux études de phases III sur des patients atteints de CPRC[51]. L'essai clinique « AFFIRM » est un essai, multicentrique, randomisé de phase III en double aveugle testant l'efficacité et la tolérance à l'Enzalutamide comparé à un placebo. Cet essai s'adresse aux patients atteints d'un CPRC ayant été prétraités avec du Docetaxel[52]. L'étude « PREVAIL » est un essai clinique de phase III randomisé en double aveugle visant à comparer les effets d'un traitement avec l'Enzalutamide par rapport à un placebo pour des patients chimio-naïfs atteints d'un CPRC[53].
Pour les deux essais cliniques, il y a une amélioration de la survie globale avec l'utilisation d'Enzalutamide :

- étude PREVAIL : 32,4 mois dans le bras Enzalutamide comparé à 30,2 mois dans le bras placebo (HR = 0.71 ; (0.60 – 0.84) ; IC 95% ; $p < 0.001$) ;
- étude AFFIRM : 18,4 mois dans le bras Enzalutamide comparé à 13,6 mois dans le bras placebo (HR = 0.63 ; (0.53 – 0.75) ; IC 95% ; $p < 0.001$) ;

Ces résultats ont justifié l'utilisation de l'Enzalutamide dans le traitement du CPRC pré- ou post-chimiothérapie.

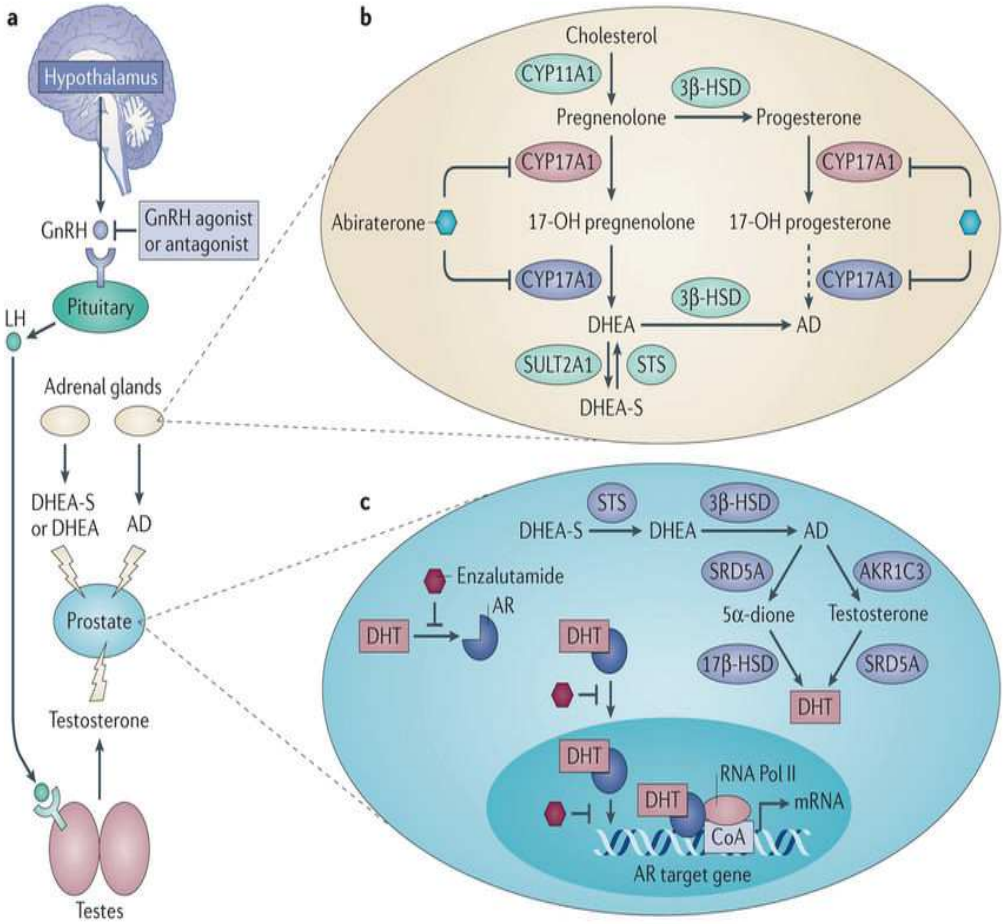


Figure 3 : Mécanismes d'action de l'Abiratérone et de l'Enzalutamide.

A. Axe hypothalamo-hypophysaire : voie LHRH. L'utilisation d'agonistes de LHR conduit à une inhibition progressive de GnRH tandis que l'effet des antagonistes est immédiat. Cela conduit à une réduction de la production de LH résultant en une faible testostéronémie. **B.** Inhibition de la stéroïdogenèse à partir des androgènes surrénaliens par l'Abiratérone. **C.** Inhibition de l'activation du RA par l'Enzalutamide : compétition avec la Dihydrotestérone pour la liaison au RA, entrave de la translocation nucléaire du RA, perturbation de l'interaction entre l'ADN, le RA et les co-activateurs.

AKR1C3 : Aldo-Keto Reductase family 1 member C3. 3ß-HSD : 3ß-hydroxysteroid dehydrogenase-Δ5-4-isomerase. 17ß-HSD : 17ß-hydroxysteroid dehydrogenase. SRD5A : Steroid 5α-Reductase. STS : Steryl-Sulfatase. SULT2A1 : bile salt sulfotransferase. DHEA : Déhydroépiandrostérone. DHEA-S : DHEA-Sulfate. AD : Androstenedione. CYP17A1 : cytochrome P450 family 17 subfamily A polypeptide 1. DHT : Dihydrotestostérone. AR : Androgen Receptor. CoA : Co-activateur

(3) Dichlorure de Radium-223 (Xofigo®)

Le chlorure de Radium-223 est un radio isotope, mimétique du calcium présentant un tropisme osseux, ce qui permet de traiter les métastases osseuses en délivrant des rayonnements de haute énergie à de courte distance, tout en préservant les tissus sains environnants[54].

L'utilisation de Radium-223 est recommandée pour les patients présentant un CPRC avec atteinte osseuse sans métastases viscérales, ne pouvant bénéficier d'une chimiothérapie.

II. Le récepteur des androgènes

L'émergence d'un CPRC est systématique durant la période de suppression androgénique. Parmi les mécanismes moléculaires participant à cette hormono-résistance, la voie de signalisation du RA peut avoir une implication.

A. Les androgènes

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes participant au développement, à la physiologie et à la pathogénèse de la prostate. Ils sont synthétisés par deux sources biologiques d'androgènes[55] :

- Les cellules de Leydig des testicules qui produisent la testostérone
- Les cellules corticales des glandes surrénales produisant principalement trois androgènes : la déhydroépiandrostérone (DHEA), son ester de sulfate (DHEA-S) et l'Androstènedione.

Le RA peut être activé par différents androgènes, les ligands du RA sont la testostérone et son métabolite, la DHT. Sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire, les cellules de Leydig vont produire la testostérone grâce à deux hormones : l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) et l'hormone lutéinisante (LH). Ainsi sous forme libre circulante et liposoluble, la testostérone traverse la membrane plasmique et se retrouve dans le cytoplasme des cellules prostatiques. Par la suite, elle sera convertie par l'enzyme 5α-réductase en DHT. Ce métabolite a une affinité cinq fois plus élevée que la testostérone pour le domaine de fixation du ligand (LBD) du RA.

Physiologiquement, les androgènes participent au développement de l'appareil reproducteur, des organes génitaux externes et de la prostate. Ces hormones jouent aussi un rôle dans le métabolisme des différents tissus (peau, muscles, os, tissu adipeux)[56,57].

B. Caractéristiques du récepteur des androgènes

Le RA appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires NR3C (*Nuclear Receptor subfamily group C*)[58]. Cette famille comprend des récepteurs des hormones stéroïdes tels que le récepteur des glucocorticoïdes (NR3C1), le récepteur des minéralocorticoïdes (NR3C2), le récepteur de la progestérone (NR3C3), le récepteur des œstrogènes (NR3CA/B) et le récepteur des androgènes (NR3C4)[59,60]. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription activés par la liaison avec des ligands stéroïdiens (les œstrogènes, la progestérone, la testostérone, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes)[61].

Le gène du récepteur des androgènes est situé sur le bras long du chromosome X en position 12 (Xq12), contient 8 exons et fait plus de 10kb. Ce gène code pour une protéine de 110 kDa composée de 919 acides aminés. La protéine du récepteur des androgènes est composée de quatre domaines distincts (**Figure 4**)[62–64] :

- Le domaine amino-terminal (NTD), résidus 1 à 537 : région régulatrice permettant la transcription de gènes spécifiques. Cette région est composée d'un sous-domaine AF-1 (Fonction de transactivation 1), résidus 142 à 485, qui est constitutivement actif et responsable de la majorité de l'activité d'AR à travers des interactions de type protéine-protéine[62,65]
- Le domaine de liaison à l'ADN (DBD), résidus 537 à 625 : région très conservée, qui permet la liaison avec l'ADN après la fixation du ligand du RA. L'interaction avec l'ADN se fait au niveau des régions promotrices des gènes régulés par le RA, appelées « éléments de réponses aux androgènes » (ARE). Cette interaction conduit à l'activation des fonctions des domaines NTD et LBD par un changement de conformation de l'homodimère, permettant avec des corégulateurs, d'induire la transcription des gènes cibles[66].
- La région charnière (*Hinge*), résidus 625 à 669 : permet la dimérisation du récepteur et porte le signal de translocation nucléaire.
- Le domaine de fixation du ligand (LBD), résidus 669 à 919 : région d'interaction avec les androgènes, contenant un sous domaine, AF-2 (Fonction de transactivation 2), s'activant en fonction de la liaison à un ligand.

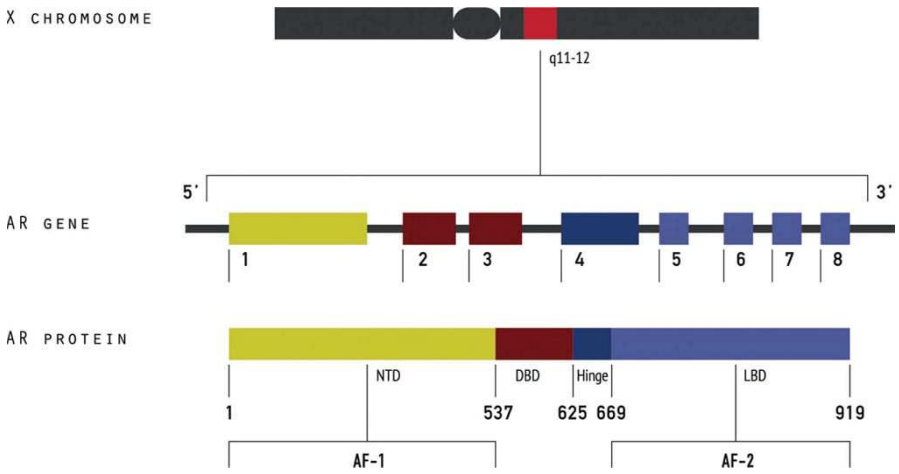


Figure 4 : Représentation schématique du gène et de la protéine du RA
AR : Récepteur des Androgènes. NTD : Domaine N-Terminal. DBD : Domaine de liaison à l'ADN. LBD : Domaine de liaison au ligand. AF-1 : Fonction de transactivation 1. AF-2 : Fonction de transactivation 2

C. Activation du récepteur des androgènes

En l'absence de son ligand, le récepteur des androgènes est séquestré dans le cytoplasme, par son association aux protéines de choc thermique (*Heat-Shock Protein* : HSP), HSP90, HSP70, complexées avec les protéines FKPB52 et P23 [67–69]. Cette association inactive le RA, sans pour autant affecter son affinité pour le ligand. C'est la liaison à la DHT, au niveau du LBD, qui provoque la dissociation du complexe RA-HSP. Le RA change de conformation, provoquant l'interaction entre ses extrémités N-terminal et C-terminal, ce qui va augmenter sa stabilité et démasquer ses sites de dimérisation ainsi sa séquence de localisation nucléaire (NLS). Après homodimérisation, le RA rentre dans le noyau sous forme de dimères grâce à l'α-importine [70–72]. Des modifications post-traductionnelles peuvent aussi contribuer à sa translocation nucléaire telles que la phosphorylation, la méthylation, la sumoylation ou l'acétylation [73,74]. Dans le noyau, le RA se fixe au niveau des ARE, dans les régions promotrices de ses gènes cibles. Cette fixation induit la transcription de gènes impliqués dans la survie et la croissance des cellules prostatiques, la sécrétion de PSA, ainsi que d'autres voies de signalisation (**Figure 5**)[63,68].

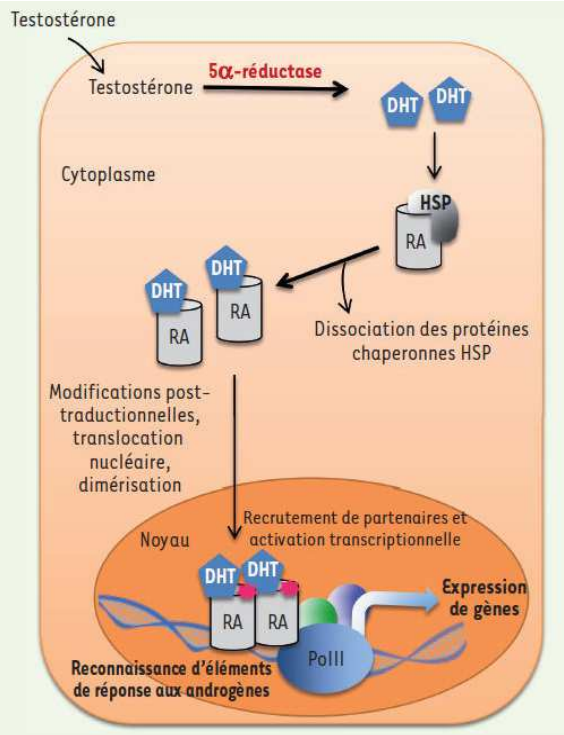


Figure 5 : Activation de la voie de signalisation des récepteurs des androgènes.
Le RA reste sous forme inactive, liée à l'HSP, dans le cytoplasme. La liaison de la DHT induit des changements de conformation du RA et la dissociation des protéines chaperonnes. Après sa translocation nucléaire, le RA interagit avec les éléments de réponse aux androgènes, et induit le recrutement de cofacteurs aboutissant ainsi à la transcription de ses gènes cibles.
RA : Récepteur des Androgènes. DHT : Dihydrotestostérone. HSP : Heat-Shock Protein. PolII : Polymerase II

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les HSP peuvent avoir d'autres rôles que celui de protéine chaperonne. Par exemple, la MAPK p38 peut phosphoryler d'autres protéines kinases : MK2 ou MK3 (MK : *MAP kinase-activated protein kinase-2/3*), qui vont, à leur tour, induire la phosphorylation de la protéine chaperonne HSP27 au niveau de ses résidus Sérine, 15, Sérine 78 et Sérine 82[75–77]. Ce processus de phosphorylation de la protéine HSP27 est provoqué par la liaison du RA avec ses ligands. Ainsi en parallèle de l'activation de la protéine HSP27, il y a dissociation de l'HSP90 du RA, qui sera lié par l'HSP27 et diriger vers le noyau jusqu'à sa fixation aux AREs (**Figure 6.A**)[67]. Ce phénomène participe à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du RA[67]. De plus la protéine HSP27 est aussi impliquée dans la régulation de l'ARNm du RA car une surexpression de la protéine HSP27 est associée à une augmentation de la quantité d'ARNm du récepteur[78]. Un autre rôle de l'HSP27 est son activation de la protéine MMP-2 (*Matrix Metalloproteinase type 2*), qui stimule le processus d'invasion cellulaire[79]. À l'inverse, s'il y a inhibition de la phosphorylation d'HSP27, la liaison du ligand conduit à la dissociation complexe protéique RA-HSP90. Cependant en l'absence de l'HSP27, le RA sera reconnu et pris en charge par MDM2 (*Murine Double Minute 2*), une protéine E3

ubiquitine ligase, conduisant à sa dégradation par le protéasome (**Figure 6.B**)[67]. Ceci a pour conséquence de réduire l'activité transcriptionnelle du récepteur et d'augmenter le phénomène d'apoptose dans les cellules[67,80]

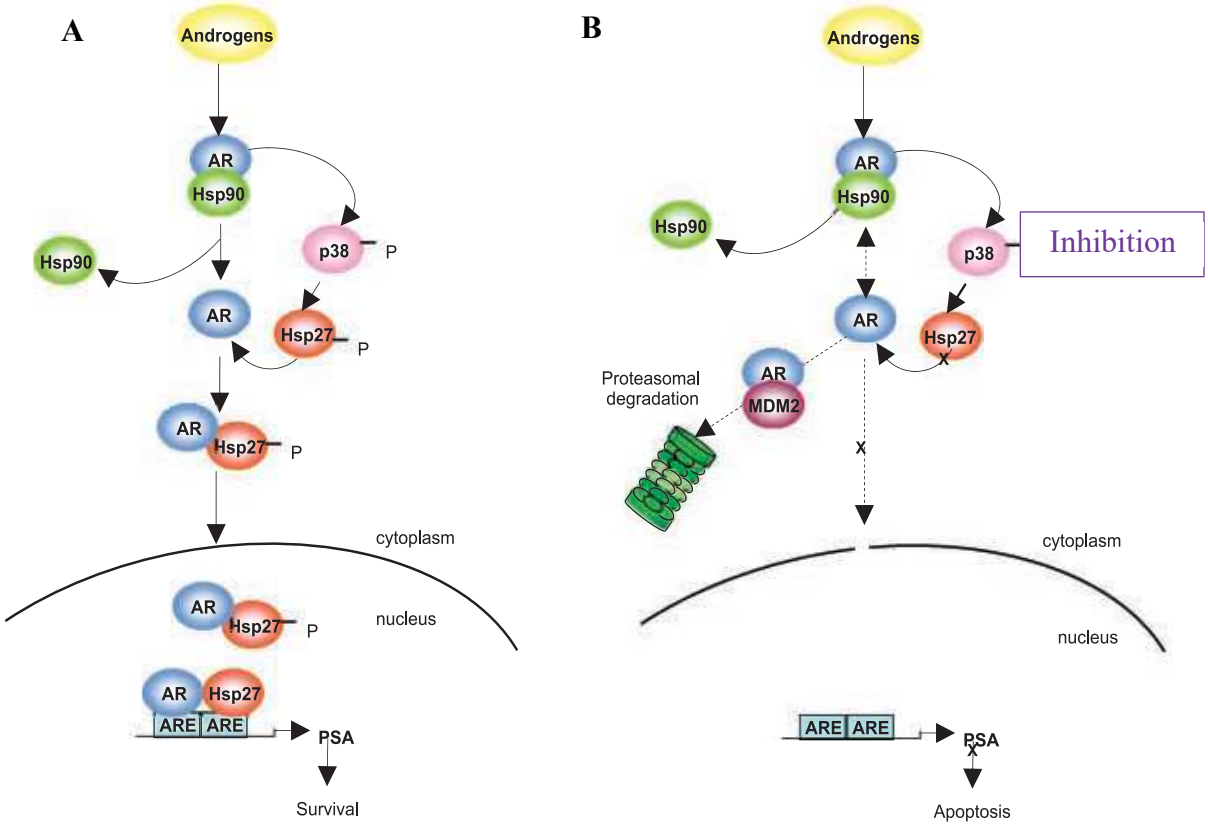


Figure 6 : Interactions entre la protéine HSP27, la MAPK p38 et le récepteur des androgènes
A. Fixation du ligand sur le récepteur des androgènes conduisant à la phosphorylation de la protéine HSP27 par la MAPK p38. Ceci induit la dissociation de la protéine HSP90 du RA et l'HSP27 permet la translocation nucléaire du récepteur, jusqu'à sa fixation à l'ADN et induction de son activité génomique. **B.** L'inhibition de la protéine HSP27 conduit à l'association de l'E3 ubiquitine ligase, MDM2 avec le récepteur des androgènes. Après ubiquitination, le récepteur est dégradé par le protéasome.
AR : Récepteurs des androgènes. ARE : Éléments de réponse aux Androgènes. HSP : Protéine de choc thermique. PSA : Prostate Specific Antigen.

D. Régulation du récepteur des androgènes

1. Modifications post-traductionnelles

Le RA peut subir différentes modifications post-traductionnelles pouvant altérer sa stabilité, sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle (**Figure 7**)[74].

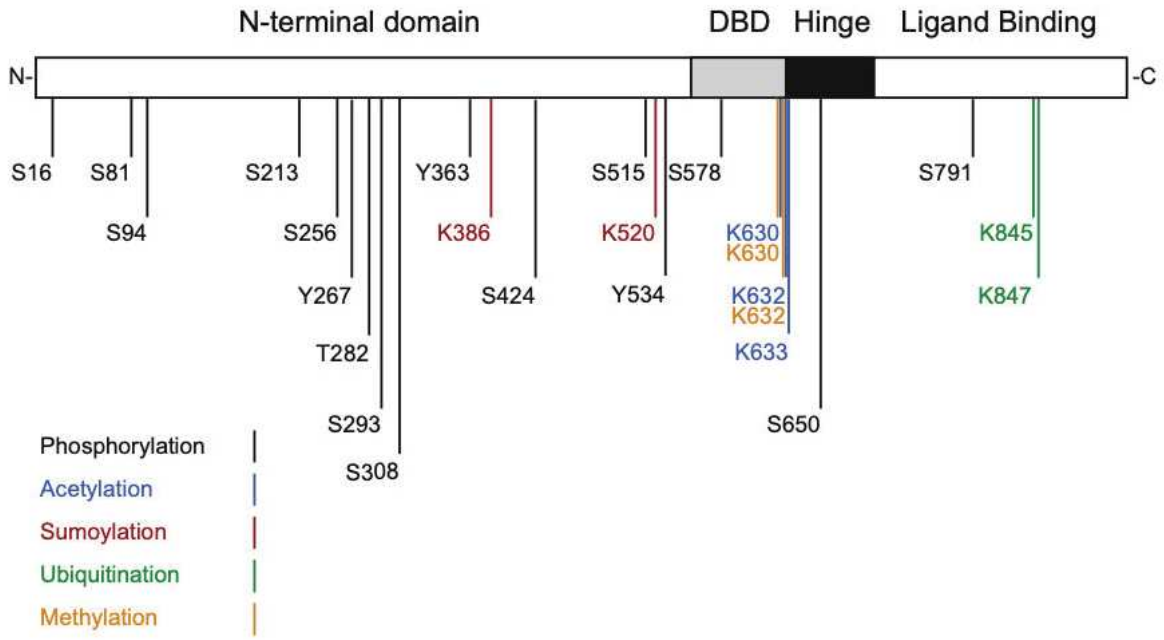


Figure 7 : Sites de modifications post-traductionnelles du RA.
NTD : Domaine N-Terminal. DBD : Domaine de liaison à l'ADN. Hinge : Région charnière. LBD : Domaine de liaison au ligand.

a) Phosphorylation

Le RA est phosphorylé sur différents résidus sérine (S), thréonine (T) et tyrosine (Y). Ces sites de phosphorylation sont contenus principalement au niveau de la région NTD mais les autres domaines (DBD, *Hinge* et LBD) possèdent aussi des résidus pouvant être phosphorylés. Ainsi la phosphorylation du RA participe à la régulation de sa localisation cellulaire et de son activité transcriptionnelle. De plus, le RA peut être phosphorylé en présence ou en absence d'androgènes, ce qui implique qu'une phosphorylation du RA peut jouer un rôle dans la sensibilité aux ligands, ce qui est un facteur important dans la progression du CaP et le développement du CPRC (**Tableau 4**)[81].

La phosphorylation du résidu S16 se produit en présence ou en absence d'androgènes : sa phosphorylation augmente s'il y a fixation du ligand par le RA mais ce résidu reste phosphorylé même en l'absence d'androgènes. Les protéines PKA (*Protein Kinase A*) et Calmoduline kinase II ont été prédites comme potentielles kinases pour le site S16[82]. Bien qu'aucune fonction physiologique n'a été identifiée, il a été suggéré que ce site S16 pourrait avoir un rôle dans le CPRC du fait de son état spécifique de phosphorylation[83,84].

Une étude a comparé par spectrométrie de masse, le niveau de phosphorylation de plusieurs résidus sérine dans des cellules de CaP cultivées en présence d'androgènes[83]. Les résultats montrent que le résidu S81 est le site le plus phosphorylé du RA en réponse aux androgènes. D'autres résidus S16, S256, S308, S424 et S650 présentaient également des niveaux plus ou moins élevés de phosphorylation dépendant de la concentration d'androgènes. Une autre étude a déterminé que la phosphorylation du résidu S81 était réduite dans un milieu appauvri en androgènes. Cependant l'ajout de la DHT stimulait la phosphorylation de ce résidu Ser-81[85]. D'autres études ont associé la phosphorylation du site S81 à la stimulation de l'activité transcriptionnelle du RA (localisation cellulaire, fixation aux ARE, liaison à la chromatine) et à l'expression de protéines androgéno-dépendantes (PSA). De plus, la phosphorylation du résidu S81 conduit à la stimulation de l'activité de plusieurs protéines Cdk 1, Cdk 5 et Cdk 9 (*Cyclin dependent kinase*) favorisant la croissance des cellules du CaP[85–88].

La phosphorylation du résidu S94 n'est pas altérée par l'absence d'androgènes[83,84]. De plus, tout comme le résidu S16, aucune fonction biologique n'a été identifiée, cependant du fait de son activation constitutive, un potentiel rôle sur l'activation transcriptionnelle du RA a été suggéré.

Les effets de la phosphorylation du résidu S213 sont variables en fonction des kinases impliquées. La phosphorylation du résidu S213 par Akt (*Protein kinase B*) stimule l'activité transcriptionnelle du RA et accroît la stabilité du récepteur, ce qui a pour conséquence de promouvoir la survie cellulaire des cellules du CaP[89,90]. La phosphorylation induite par la kinase PIM-1 est associée à la régulation de l'activité transcriptionnelle du RA pouvant être impliquée dans la croissance cellulaire des cellules du CaP en cas d'appauvrissement du milieu en androgènes[91,92]. De plus, le niveau de phosphorylation du résidu S213 est plus important dans le CPRC comparé au CaP hormono-sensible[92,93].

Les résidus Y267 et Y363 du RA sont phosphorylés par Ack1. Une étude a montré que cette phosphorylation favorise la croissance de xénogreffes de cellules LNCaP et LAPC4 chez des souris castrées[94]. Ce rôle d'Ack1, dans la prolifération des cellules LNCaP en l'absence d'androgènes, a été confirmé par une autre étude, qui a prouvé que l'expression d'un Ack1 muté

(inactif) inhibait la croissance tumorale même en présence d'androgènes. Ces données suggèrent un rôle d'Ack1 du RA dans les cellules dépendantes ou indépendantes aux androgènes[95,96].

La phosphorylation de la S308 par le complexe protéique D3/CDK11^{p58} conduit à inhiber l'activité transcriptionnelle du RA dans les cellules du CAP. Cette régulation négative conduit à une diminution de la prolifération cellulaire[97]. De plus, l'augmentation de la phosphorylation du résidu S308 et du résidu S791 chez les patients atteints de CPRC contribue à améliorer leurs bénéfices de survie. Cette observation confirme le rôle du site S308 dans la diminution de l'activité transcriptionnelle du RA[98].

La phosphorylation du résidu S515 contribue au processus de transactivation du RA par le recrutement de la machinerie de transcription, nécessaire à la transactivation des gènes cibles du récepteur[99]. De plus, cette stimulation de l'activité transcriptionnelle du RA par la phosphorylation du résidu S515 peut être induite en réponse à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) conduisant à une croissance tumorale, en présence ou non d'androgènes[100].

La phosphorylation du résidu S578 par la protéine PKC (*Protein Kinase C*), en réponse à l'EGF, augmente l'activité transcriptionnelle du RA et stimule la croissance cellulaire[100]. Cependant ce résidu peut aussi être phosphorylé par la protéine PAK6 (*p21-activated kinase 6*), ce qui conduit à inhiber la translocation nucléaire du RA et stimule son processus de dégradation[101].

La phosphorylation du résidu S791, dépendante de la protéine Akt induit une augmentation de la liaison au ligand ainsi que de la translocation nucléaire du récepteur. Cependant ces phénomènes sont associés à une stabilité réduite du RA, suggérant un potentiel rôle dans la dégradation du récepteur[102]. De plus, chez les patients atteints de CPRC, une augmentation de l'état de phosphorylation du résidu S791 est associée à un bon pronostic, avec une augmentation du taux de survie globale[98].

La phosphorylation du résidu S650, se produisant en présence ou en absence d'androgènes, régule la localisation et l'activité transcriptionnelle du RA[86,103,104]. Il est intéressant de noter que parmi les kinases ciblant ce résidu, la MAPK p38α est capable de le phosphoryler directement. En effet, une étude a montré que l'inhibition de la MAPK p38 conduisait à réduire le niveau de phosphorylation du résidu S650. De plus, les RA, sans résidus S650 phosphorylés, ne pouvaient être exportés hors du noyau. Le fait que ce résidu se situe dans la région charnière et à proximité du signal de localisation nucléaire peut expliquer l'incapacité du RA à traverser du noyau vers le cytoplasme. Ainsi, la MAPK p38, par la phosphorylation du résidu S650 conduit à réguler négativement l'activité transcriptionnelle du RA, car il favorise le transport du récepteur hors du noyau[104].

Domaine	Résidu phosphorylé	Kinase / Phosphatase	Fonction
NTD	S16	PKA, Calmoduline kinase II[82]	
NTD	S81	PKC, CDK1, CDK5, CDK9, Src, PP2A[87,105]	Croissance cellulaire Liaison à la chromatine Activité transcriptionnelle Stabilisation du RA Spécificité du promoteur
NTD	S94	PP2A[82,105]	
NTD	S213	PI3K, AKT1, PIM-1[87–89,106]	Translocation nucléaire Stabilité de la protéine
NTD	Y267	Ack1, Src[94–96,107]	Activité transcriptionnelle
NTD	Y223	Ack1[108]	Activité transcriptionnelle
NTD	S256	PP2A[84]	
NTD	S308	PP2A, Cycline D3/CDK11p58[97,105,109]	Activité transcriptionnelle Inhibition du RA
NTD	Y363	Ack1[95]	Activité transcriptionnelle
NTD	S424	PP2A, PP1[82,105]	Activité transcriptionnelle
NTD	S515	MAPK, CDK7[99,100]	Clivage du RA médié par la Caspase 3
NTD	Y534	Src[107,110–112]	Localisation de la protéine Activité transcriptionnelle
DBD	S578	PKC, PAK6[100,101]	Activité transcriptionnelle
Hinge	S650	CK2a, MKK4, ERK1, JNK1, p38α, PP1[86,103,104]	Localisation de la protéine Activité transcriptionnelle
LBD	S791	PI3K, AKT1[89,102,106]	Localisation de la protéine Activité transcriptionnelle Inhibition de l'apoptose
LBD	T850	PIM-1L[91]	Stabilité de la protéine

Tableau 4 : Phosphorylation des résidus du RA et leurs rôles fonctionnels

b) Acétylation

Le RA est directement acétylé par des histones acétyltransférases (HATs) sur trois résidus lysine (K) dans sa région charnière : K630, K632 et K633 (**Figure 7**). L'acétylation augmente l'affinité du RA pour ses cofacteurs et stimule son activité transcriptionnelle [113,114]. À l'inverse l'action d'histones désacétylases (HDACs) tels que HDAC1 ou SIRT1 (Sirtuine 1) conduit à la diminution de l'activité transcriptionnelle d'AR[115,116]. Par ailleurs, une étude suggère que l'acétylation pourrait être impliquée dans la prolifération tumorale car l'expression exogène d'un RA mimant l'acétylation, dans la lignée DU145 (dépourvue du RA endogène) conduit à la stimulation de leur prolifération cellulaire. De plus, la xénogreffe et le suivi de la croissance tumorale de ces cellules DU145 indique qu'elles sont moins sujettes à l'apoptose comparées à des cellules possédant le RA sauvage[117].

c) Sumoylation

Le RA peut subir une sumoylation qui est la liaison covalente, au niveau de résidu lysine (K), d'une ou de plusieurs protéines SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*), de petites protéines structuralement proches de l'ubiquitine[118]. La sumoylation peut moduler différentes processus cellulaires tels que la transcription, le cycle cellulaire, le transport nucléocytoplasmique[119]. Il existe 4 isoformes des protéines SUMO[118], le RA est principalement modifié par SUMO1. Le processus de sumoylation implique trois enzymes ligases différentes : E1, E2 et E3. L'enzyme ligase E3 prend en charge le RA afin d'y associer la marque de sumoylation, qui est placée au niveau des résidus K386 et K520 du récepteur (**Figure 7**). La sumoylation est un processus de régulation de l'activité transcriptionnelle du RA qui diminue quand ce dernier est sumoylé[120,121].

d) Ubiquitination

L'ubiquitination est la liaison covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur des résidus lysine. La fixation de l'ubiquitine est médiée par différentes molécules : l'enzyme d'activation séquentielle (E1), l'enzyme de conjugaison (E2) et l'enzyme ligase (E3). L'ubiquitine contient sept résidus de lysine qui permettent la formation de chaînes de poly-ubiquitine[122]. Cet enchaînement d'ubiquitine sera reconnu comme un signal de dégradation et donc ce processus est impliqué dans la stabilité de la protéine. Les sites d'ubiquitination ont été identifiés sur deux résidus lysine dans la partie C-terminale du LBD du RA : K845 et K847 (**Figure 7**)[123]. Différentes E3 ubiquitine ligases ont été associées dans la régulation du RA. La protéine MDM2 prend en charge le RA phosphorylé par Akt, conduisant à sa dégradation[124]. En absence de phosphorylation du RA, c'est la protéine CHIP qui va induire le processus d'ubiquitination du récepteur[99]. De plus, une autre enzyme, SPOP (Speckle-type POZ Protein), peut aussi se lier au RA, sur un degron (motif structural minimal permettant la reconnaissance et la dégradation d'une protéine) riche en sérine et thréonine dans la région charnière du récepteur. Cette interaction SPOP-RA conduit à la dégradation du récepteur, à l'inhibition des gènes transcrits par le RA et à une diminution de la croissance[125,126]. À l'inverse, l'enzyme RNF6 peut stimuler la transcription du RA par l'ajout de chaînes de 7 et 27 résidus lysines au niveau des sites K845 et K847[123]. Ces chaînes d'ubiquitines crées par RNF6 conduit au

recrutement d'un co-activateur du RA, ARA54, possédant un domaine d'interaction avec l'ubiquitine et participant à la stimulation de l'activité transcriptionnelle du RA[123].

e) Méthylation

Le RA peut être méthylé au niveau de deux résidus lysine situés dans sa région charnière : K630 et K632. Ces résidus peuvent être aussi acétylés (**Figure 7**). Cette région charnière contient une séquence Lys-Leu-Lys-Lys, similaire à d'autres sites d'interaction de la méthyltransférase SET9. Il a été démontré que SET9 est capable de se lier au RA et que cette fixation augmente les interactions entre les domaines N- et C-terminaux du RA, ce qui stimule son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de Set9 empêche la liaison du RA sur les régions promotrices du PSA dans les cellules LNCaP. Et à l'inverse, une surexpression de Set9 accroit la fixation du RA au niveau de ces mêmes régions promotrices. Set9 a été identifié comme un régulateur positif de l'activité du RA, pouvant potentiellement jouer un rôle dans le CaP[127,128].

2. Cofacteurs du récepteur des androgènes

Un panel d'environ 300 co-régulateurs potentiels du RA ont été identifiés[129]. Ces co-régulateurs peuvent être divisés en deux classes fonctionnelles : les co-activateurs, qui vont permettre l'activité du RA même en présence de faibles concentrations d'androgènes. Et les co-répresseurs qui vont réprimer la transactivation du RA[130]. Ainsi les co-régulateurs peuvent moduler l'activité transcriptionnelle du RA au niveau des séquences de ses gènes cibles. Mais ils peuvent aussi agir sur le métabolisme du RA, en régulant la stabilité du RA via le protéasome[131] ou les protéines chaperonnes comme HSP90[132]. L'action des co-régulateurs peut aussi se faire directement sur la structure et la fonction du RA par la modulation des modifications post-traductionnelles précédemment évoqué (ligase, ubiquitinase, kinase)[133].

III. Mécanismes de résistance à la castration

Dans le contexte du CPRC, le RA joue un rôle majeur dans la promotion du développement tumoral. Ainsi, l'étude menée dans cette thèse ne tiendra compte que du rôle du RA, et donc des mécanismes de résistance associés à ces derniers seront plus développés que ceux indépendants des récepteurs. Cependant, il est à noter l'existence d'un sous-ensemble de cancers réfractaires à la castration qui est indépendant de l'activation du RA via d'autres mécanismes.

A. Mécanismes de résistance à la castration indépendants du récepteur des androgènes

1. Expression du récepteur aux glucocorticoïdes

Le récepteur des androgènes et le récepteur des glucocorticoïdes (RG) font partie de la même famille de récepteurs nucléaires conduisant à des similarités dans leurs structures et leurs mécanismes d'action[134].

Il a été démontré que l'inhibition du récepteur des androgènes induit une augmentation de l'expression du récepteur des glucocorticoïdes[135]. Ce récepteur activé est capable d'interagir avec les éléments de réponse aux androgènes et de réguler un sous-ensemble de gènes cibles du récepteur des androgènes. Ainsi par l'activation du récepteur des glucocorticoïdes, des cellules tumorales résistantes à l'Enzalutamide peuvent poursuivre leur croissance[136]. De plus, le blocage de l'expression du récepteur des glucocorticoïdes dans des lignées LNCaP et VCaP résistantes à l'Enzalutamide permet de rétablir la sensibilité au traitement[137]. Ainsi, la perte ou l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes est contournée par l'expression d'autres récepteurs stéroïdiens qui peuvent promouvoir la croissance tumorale.

2. Plasticité cellulaire : acquisition d'un phénotype neuroendocrine

Parmi les cancers de la prostate, un sous-ensemble échappe à la suppression androgénique par l'acquisition d'un phénotype neuroendocrinien, devenant ainsi un cancer de la prostate neuroendocrinien (CPNE)[138]. Les cellules de CPNE se distinguent par un changement de morphologie, de type carcinome à petites cellules, dans lesquelles il n'y a pas d'expression du RA ni de production de PSA. Il est possible de détecter les biomarqueurs spécifiques de ce phénotype neuroendocrinien tels que la chromogranine A, l'énolase neurospécifique ou la

synaptophysine[139–142]. Cette plasticité cellulaire permet aux tumeurs de passer de caractéristiques histologiques d'adénocarcinome, exprimant le récepteur des androgènes, à des caractéristiques neuroendocrines n'exprimant pas le récepteur des androgènes. Une étude suggère que cette transition se fait à partir d'un précurseur d'adénocarcinome[143]. En effet, il a été montré que la perte ou la mutation de TP53 (codant pour la protéine suppresseur de tumeur p53) et de RB1 (codant pour la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome) est un facteur important dans l'induction de la différenciation neuroendocrinienne. En effet, chez des souris dépourvues de la protéine Rb1, l'inhibition du RA favorise la transition des cellules cancéreuses de la prostate vers un phénotype neuroendocrinien. De plus, la mutation de TP53 confère une résistance supplémentaire aux traitements. Similairement, dans des modèles de cancer de la prostate humaine, lors d'un traitement avec de l'Enzalutamide, les cellules tumorales pouvaient alterner entre dépendance et indépendance androgénique. Ces phénomènes coïncidaient avec une perte de TP53 et de RB1[144–146]. À ce jour, les mécanismes précis induisant ce changement de phénotype restent mal connus. Cependant, des études associent l'origine des CPNE à la réactivation de programme de transition epithélio-mesenchymateuse (TEM). En effet, des études ont montré que l'inhibition du RA conduit à stimuler des gènes impliqués dans le TEM, tels que ZEB1 (*Zinc finger E-box-binding homeobox 1*). L'expression de ce facteur de transcription est augmenté quand le RA est inhibé, ce qui induit une activation du processus de TEM et donc un changement de phénotype cellulaire[147,148].

Ainsi le phénomène de différenciation neuroendocrinien est un mécanisme pouvant promouvoir la résistance à la castration tout en assurant la progression tumorale.

3. Altération de voies de signalisation : exemple de PI3K-AKT-mTOR

Le CaP peut présenter des altérations de certaines voies de signalisation pouvant participer à sa progression. L'axe PI3K-AKT-mTOR (*Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mechanistic Target Of Rapamycin*) est souvent dérégulé dans les tumeurs primaires et métastatiques. La protéine PI3K est activé par des récepteurs couplés à la protéine G ou à des récepteurs à activité tyrosine kinase. Cette activation conduit à la phosphorylation de la protéine AKT, qui stimule à son tour, l'enzyme mTOR. Ainsi la voie PI3K-AKT-mTOR est capable de promouvoir la survie cellulaire par la régulation de la phosphorylation, de la transcription ou de la traduction de plusieurs cibles en aval[149–151]. Dans le cas du cancer de la prostate, la dérégulation de la signalisation PI3K-AKT-mTOR a pu être observée pour les stades localisés

et avancés du cancer. De plus, l'inactivation de la PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), un gène suppresseur de tumeur, inhibiteur de la voie PI3K-AKT, est aussi courante dans les tumeurs avancées de la prostate [149,152,153]. L'absence de PTEN corrélée à une inhibition du RA, conduit à l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR, provoquant l'émergence d'une résistance à la suppression androgénique [154,155]. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'une inhibition de l'axe PI3K-AKT-mTOR peut stimuler la différenciation neuroendocrine des cellules prostatiques cancéreuses, ce qui peut contribuer à l'agressivité des tumeurs[156].

B. Mécanismes de résistance à la castration dépendants du récepteur des androgènes

La progression vers un CPRC et l'échappement hormonal associé sont le plus souvent provoqués par la réactivation du RA[39]. L'utilisation des anti-androgènes, dont l'Enzalutamide, a donc fait de l'inhibition du RA, la stratégie thérapeutique appliquée pour les CPRC. Ce traitement a ainsi conduit à augmenter les bénéfices de survie des patients. Cependant l'émergence d'une résistance à l'Enzalutamide est inévitable car de nombreux mécanismes moléculaires permettent la réactivation de la voie de signalisation du RA (**Figure 8**)[157]. Ainsi comprendre les processus impliqués dans la progression de la tumeur après la réponse initiale au traitement est nécessaire pour améliorer les effets de la thérapie.

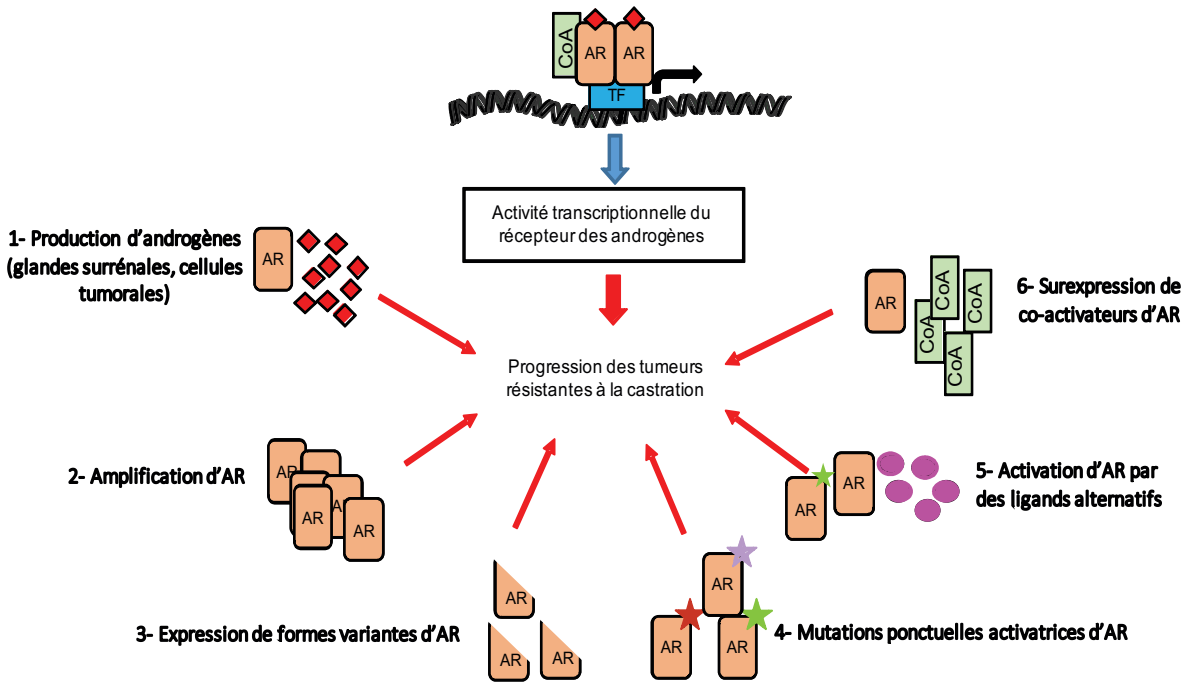


Figure 8 : Les mécanismes de résistance à l'inhibition de la voie de signalisation du récepteur des androgènes
AR : Récepteur des Androgènes. CoA : Co-activateur d'AR. TF : facteur de transcription.

1. Synthèse d'androgènes surrénaliens et intra-tumoraux

Les principaux androgènes actifs pour la prostate sont la testostérone et la DHT. Le processus de castration par voie chirurgicale ou chimique va induire une réduction de la testostéronémie supérieure à 90%. Cependant les cellules cancéreuses de la prostate peuvent synthétiser des androgènes (**Figure 8.1**). En effet, une comparaison de biopsie tissulaire de patients hormonosensibles et hormonorésistants a révélé un taux plus élevé de biosynthèse d'androgènes pour les patients résistants à la castration. Cette production androgénique soutenue est la résultante d'une stéroïdogenèse d'androgène à partir du cholestérol présent dans les tissus tumoraux [158–162]. Une autre alternative est la conversion de précurseurs d'androgènes produits dans les glandes surrénales tels que la DHEA en DHT [163,164].

Le traitement par l'Abiratérone cible la production d'androgènes surrénaliens (par l'inhibition de CYP17). Bien que cela conduise à la diminution du taux de DHEA, sa forme sulfatée, le DHEA-S peut servir de précurseur pour être converti en testostérone et en DHT dans les tissus prostatiques[165]. Les androgènes surrénaliens et intra-tumoraux permettent ainsi de maintenir la progression tumorale.

2. Amplification et surexpression du récepteur des androgènes

L'amplification du gène du RA est une altération génétique courante chez les patients ayant un CPRC et plus rare chez les patients non-traités par suppression androgénique[166] (**Figure 8.2**). Cette amplification conduit à la surexpression de l'ARNm et de la protéine du RA. En effet, il a été démontré que le taux d'ARNm du récepteur est deux fois supérieur pour les CPRC quand ce gène est amplifié. De plus, il y a une augmentation du taux de protéine du RA dans plusieurs modèles de xénogreffes de tumeurs isogéniques hormono-résistants comparées aux hormono-sensibles[167,168]. Une autre étude a exposé un mécanisme supplémentaire conduisant à la suractivation de la voie de signalisation du RA : l'augmentation de la stabilité du RA. La dégradation du RA se fait par un processus d'ubiquitination. L'enzyme E3 ligase, SPOP a pour substrat le RA et promeut la polyubiquitination du récepteur. Une mutation inactivant SPOP ou son co-activateur NCOA3 (*Nuclear receptor coactivator 3*) empêche la liaison au RA et donc sa dégradation, ce qui conduit à l'accumulation du récepteur[126,169]. Ainsi l'ensemble de ces modifications permet aux cellules tumorales, d'être plus sensibles à des faibles taux d'androgènes ce qui contribue à leur prolifération en condition de suppression androgénique[170].

3. Mutations activant le récepteur des androgènes ou élargissant son spectre de ligands

Au stade de résistance à la castration, les mutations du RA sont fréquentes (**Figure 8.4**). La majorité de ces altérations étant des mutations ponctuelles localisées dans le NTD ou le LBD[125,149]. Des études récentes ont montré que 15 à 20% des biopsies de tumeurs prostatiques réfractaires à la castration présentent des mutations activatrices dans la région LBD. Les altérations les plus courantes sont : T878A, H875T/Y, W742C et L702H. Cette région constitue un point chaud mutationnel[171]. Les altérations touchant la région charnière et le LBD conduisent à une augmentation de l'activation du récepteur associé à une baisse de spécificité pour le ligand. Suite à une déprivation androgénique prolongée, la fréquence de la mutation T878A est plus élevée chez les patients hormonorésistants comparé à celles des patients hormono-sensibles[172,173]. Dans des conditions d'inhibition du CYP17A1, la production de DHEA et de testostérone est bloquée. Cependant la concentration de progestérone augmente. La mutation T878A va conférer des propriétés agonistes à la progestérone sur le RA et conduire à l'activation de cette voie. Cette mutation renforce la liaison du ligand au récepteur et augmente la sensibilité aux hormones stéroïdiennes[174]. Une autre mutation ponctuelle, L702H, peut conduire à diminuer la spécificité de ligand du RA et permettre son activation par les glucocorticoïdes (**Figure 8.5**). L'utilisation concomitante d'Abiratérone avec soit la prednisone ou la dexaméthasone (un anti-inflammatoire) conduit à favoriser l'émergence du RA portant la mutation L702H. Ce qui a pour conséquence de permettre la prolifération tumorale en dépit du traitement à l'Abiratérone[175]. Les mutations peuvent aussi convertir les effets antagonistes de certaines molécules en fonctions agonistes[176]. Lors d'un traitement prolongé avec de l'Enzalutamide, la mutation F877L (autrement appelée F876L) du RA, transforme l'anti-androgènes en agoniste du récepteur, ce qui contribue au maintien de la signalisation androgénique malgré l'hormonothérapie[177]. Cette mutation et ce phénomène de conversion des antagonistes en agonistes se retrouvent aussi bien dans les lignées résistantes à l'Enzalutamide, que chez des patients traités avec l'Enzalutamide, l'Abiratérone ou l'Apalutamide (un anti-androgène homologue de l'Enzalutamide)[166,178].

4. Surexpression de co-activateurs du récepteur des androgènes

Les co-régulateurs sont des protéines impliquées dans la stimulation ou l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du RA[179] (**Figure 8.6**). Ces enzymes vont permettre de moduler l'activité d'autres protéines à travers des processus de phosphorylation, ubiquitination, méthylation ou

acétylation[180,181]. Il existe plus de 300 molécules différentes, identifiées comme étant des co-activateurs ou des co-répresseurs du RA. Lorsque le RA interagit avec un co-activateur, cela induit une stimulation du récepteur, entraînant une augmentation de son activité transcriptionnelle. Une étude a démontré que FKBP51 (*FK506-binding protein 51*), un gène cible et un co-activateur du RA, était surexprimé dans la lignée de tumeur de la prostate LAPC-4 provenant de souris castrées. La protéine FKBP51 contribue à la formation d'un complexe chaperon via le recrutement de la protéine co-chaperonne p23 à la molécule Hsp90 lié à ATP. Cette dernière protéine va permettre de maintenir la conformation du RA et augmenter son affinité pour la liaison de ligands[182]. Un autre exemple de mécanisme peut conduire à la stimulation du RA. Le récepteur ROR-γ (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ*) est surexprimé et amplifié dans les CPRC. Il est capable d'induire le recrutement des co-activateurs SRC1 et SRC3 pour stimuler la transcription du RA. Et l'utilisation d'un antagoniste de ROR-γ aboli l'expression du RA et de son variant RA-V7 dans les lignées de CaP[183].

La surexpression des co-activateurs, corrélée à une diminution des protéines co-répressives, conduit à favoriser l'activité transcriptionnelle du récepteur et donc la prolifération des cellules tumorales.

5. Expression de variants d'épissage du récepteur des androgènes : cas du variant RA-V7

Notre étude considérera l'implication des variants d'épissage (V-RA), plus particulièrement du variant RA-V7, en tant que principale cause dans l'émergence de l'insensibilité à l'Enzalutamide (**Figure 8.3**).

a) Caractéristiques des variants d'épissage

Les V-RA sont des formes tronquées du RA, dépourvus de LBD et seulement constitués des régions NTD et DBD. Cette particularité donne une importance clinique aux V-RA car ces récepteurs, par leur activation constitutive, peuvent induire la transcription des gènes cibles du RA, indépendamment de la liaison aux androgènes[184–187]. Il existe 24 V-RA connus à ce jour (**Figure 9**)[188]. Certains d'entre eux sont constitutivement actifs, comme RA-V7 ou RA^{v567es}, tandis que d'autres V-RA ont une activité conditionnelle. Par exemple, RA-V1 et RA-V9 ont une activité génomique indépendante du ligand dans la lignée LNCaP mais ces isoformes demeurent inactives dans la lignée PC-3. Par ailleurs, bien que tronqués au niveau de l'extrémité C-terminale, tous les variants n'ont pas nécessairement une activation constitutive.

En effet, seuls ceux possédant un signal de localisation nucléaire (NLS) sur la protéine présentent cette caractéristique. Le variant RA-V7 constitue une exception car il est dépourvu de NLS, de plus, il est localisé dans le noyau et il possède une activité constitutive indépendante du ligand[189,190].

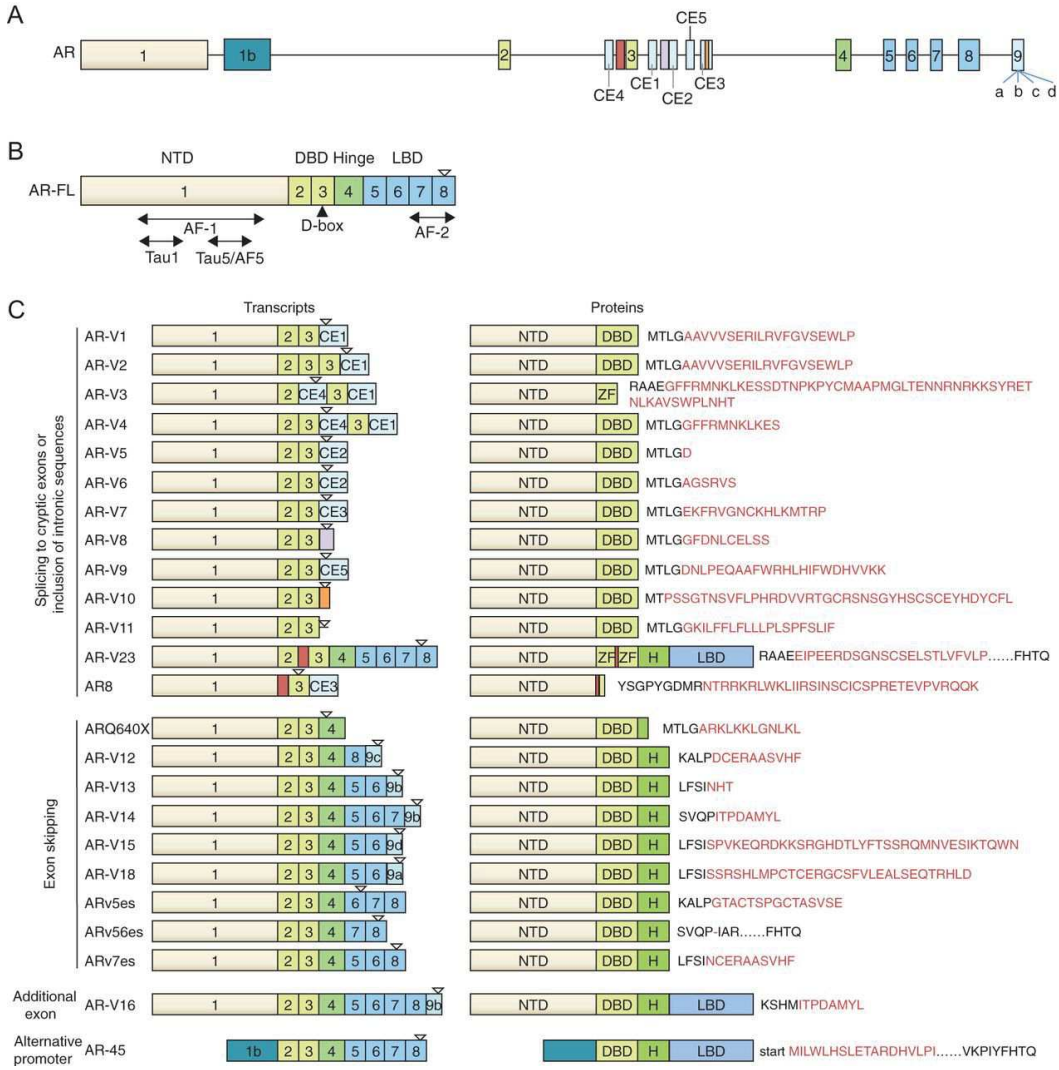


Figure 9 : *Le récepteur des androgènes et ses variants d'épissage*

A. Structure du gène du RA avec ses exons canoniques et cryptiques. **B.** Structure de l'ARNm du RA-e (RA non tronqué). AF-1, Tau1, Tau5/AF-5 et AF-2 sont les domaines fonctionnels d'activation. La D-box est la région régulant la dimérisation lors d'interaction entre RA-e/RA-e, RA-e/V-RA, VR-A/V-RA. **C.** Structures des ARNm et des protéines des V-RA. Les séquences peptidiques propres aux VR-A sont indiquées en rouge. Les triangles inversés blancs indiquent la position de codon stop. L'exon 9 possède 4 sites cryptiques d'épissage indiqués comme 9a, 9b, 9c et 9d.

CE : Exon cryptique. NTD : Domaine N-terminal. DBD : Domaine de liaison à l'ADN. Hinge : Région charnière. LBD : Domaine de liaison du ligand. AR-V : Variants d'épissage.

Par ailleurs, les V-RA, similairement au RA-e (RA entier/non tronqué), passent par un processus de dimérisation pour pouvoir agir en tant que facteur de transcription. Les différentes interactions des domaines N et C terminaux ainsi que des régions D-box de chaque récepteur permettent leur association en dimères. Pour le RA-e, il a été montré que des mutations dans le domaine N-terminal ou la région D-box conduisent à la perte de son activité de régulateur transcriptionnel[191]. Dans le cas des V-RA, tels que RA-V7 ou RA^{v567es}, il a été montré qu'ils peuvent former des homodimères mais aussi des hétérodimères avec le RA-e[192]. Il a été suggéré que cette association se faisait soit au niveau de la région DBD, site D-box, soit au niveau de la partie N-terminale du RA-e sur lequel se fixe le V-RA (**Figure 10**)[66].

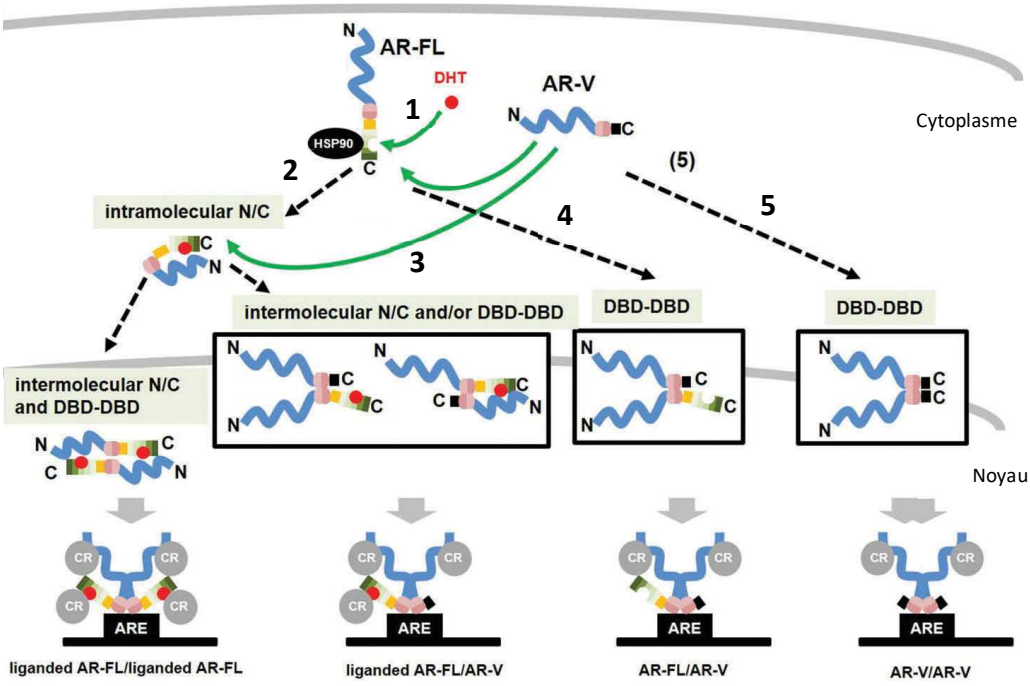


Figure 10 : Activation du RA-e et des V-RA par dimérisation des récepteurs
1. Liaison de la DHT au domaine LBD du RA-e. **2.** Formation d'homodimères du RA-e par interaction entre leurs domaines N-C terminaux, suivi de la translocation nucléaire. **3.** Liaison du V-RA avec le RA-e ayant fixé son ligand. Formation d'hétérodimères RA-e / V-RA par interaction des domaines N-C terminaux et/ou par leurs régions DBD suivi de la translocation nucléaire. **4.** Liaison du V-RA avec le RA-e sans fixation préalable de son ligand. Formation d'hétérodimères RA-e / V-RA par interaction des régions DBD suivi de la translocation nucléaire. **5.** Formation d'homodimères de V-RA par leurs régions DBD suivi de la translocation nucléaire.
AR-FL : RA-e. AR-V : V-RA. DHT : Dihydrotestostérone. DBD : Domaine d'interaction avec l'ADN. ARE : Éléments de Réponse aux Androgènes. CR : Co-régulateurs

Les conséquences d'une telle association est fonctionnelle, la dimérisation conduit à une colocalisation des différents récepteurs aux régions génomiques cibles et donc à l'activation des cibles transcriptionnelles du RA. Ainsi les homo/hétérodimères du RA-e/V-RA peuvent avoir une influence sur les thérapies par leur implication dans l'instauration de la résistance à la castration à travers leur activité transcriptionnelle[193,194]. De plus, cette interaction entre les

récepteurs peut aussi influer sur le ciblage du RA : l'association de l'hétérodimère n'est pas perturbée par un traitement avec de l'Enzalutamide et participe donc à la résistance à ce traitement[193].

b) Mécanismes moléculaires à l'origine des V-RA

Le mécanisme principal à l'origine des V-RA est l'épissage alternatif. Ce processus permet des modifications post-transcriptionnelles sur l'ARNm afin de générer des transcrits alternatifs, qui vont coder pour des isoformes de protéines pouvant être structurellement et fonctionnellement différents. Ce processus cellulaire est à l'origine de la diversité du protéome pour lequel, 20 000 gènes peuvent coder pour environ 95 000 protéines uniques[195]. Ainsi le RA peut subir plusieurs évènements d'épissage alternatifs donnant sa variété d'isoformes. Le RA-e est composé de 8 exons canoniques, auxquels sont associés des exons cryptiques, situés dans les introns 2 et 3. Durant le processus de maturation de l'ARNm, les sauts d'exons 2, 3 ou 7 et la rétention de l'exon 6 sont les phénomènes d'épissages connus pour générer les V-RA[184]. Dans le cas du variant RA-V7, celui-ci est issu de la rétention des trois premiers exons canoniques du RA et de l'intégration d'un exon cryptique, situé dans l'intron 3 : l'exon CE3. L'épissage de cet exon CE3 est suivi de l'ajout de 16 acides aminés puis la traduction de l'ARNm se termine prématurément. Ainsi, l'épissage alternatif produit une isoforme du RA composée des exons 1/2/3/CE3 correspondant aux régions NTD, DBD et à une séquence C-terminale dérivant de l'exon CE3 (**Figure 11**)[196].

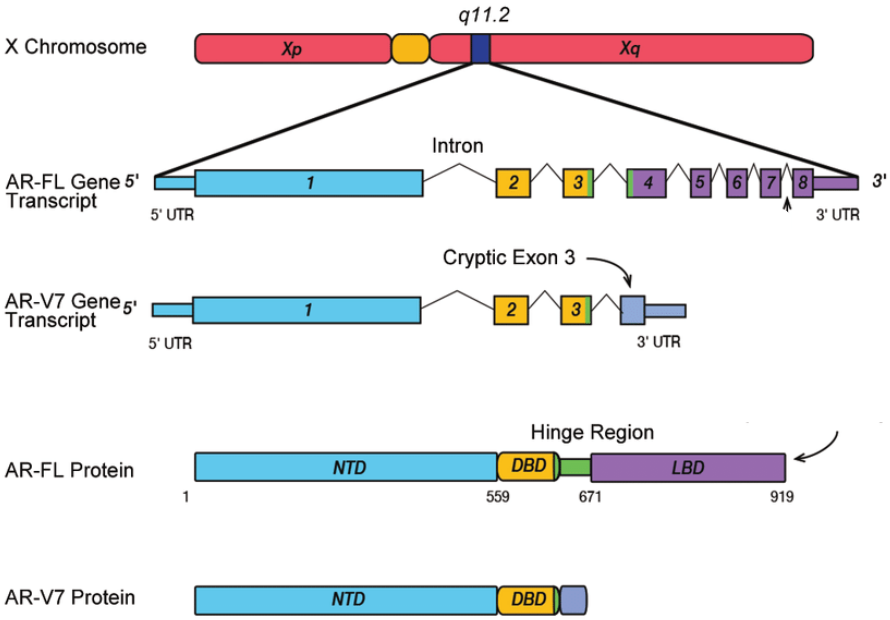


Figure 11 : Le RA-e et son variant RA-V7

Le RA-e est constitué de 8 exons codant pour le NTD (bleu), le DBD (jaune), la région charnière (vert) et le LBD (violet). Le variant RA-V7 est constitué des 3 premiers exons canoniques du RA-e et d'un exon cryptique le CE3. L'épissage du CE3 est suivi d'un arrêt prématuré du processus de traduction.

AR-FL : RA-e. NTD : Domaine N-terminal. DBD. Domaine de liaison à l'ADN. Hinge region : Région charnière. LBD : Domaine de liaison au ligand.

Il est à noter qu'il existe des variations dans l'expression des V-RA comparée au RA-e. En effet, au fur et à mesure de la progression du CaP, les V-RA sont moins exprimés dans les tissus prostatiques normaux et plus exprimés dans les tissus cancéreux hormonosensibles et surtout les tissus cancéreux résistant à la castration[171,186,197]. Ces observations ont conduit à considérer que la biosynthèse de V-RA peut ne pas être seulement due à l'épissage alternatif mais à l'existence d'autres mécanismes. L'expression des V-RA peut être augmentée en cas de réarrangement du gène du RA-e. Dans les lignées CWR-R1 et 22Rv1, il y a une forte expression du RA-V7 corrélée avec des réarrangements structurels intragéniques du RA (duplication du nombre de copies du gène). De plus, ces lignées présentent une résistance aux traitements ciblant le RA. Inversement, une sous-population de CWR-R1 qui ne présente pas ces remaniements du gène RA, ont une plus faible expression du RA-V7 ainsi qu'une sensibilité aux anti-androgènes[198–200]. Une autre étude a démontré que la voie de signalisation NF-κB peut induire une variation de l'expression du RA et de ses variants. Dans des cellules LNCaP, la surexpression de composants de cette voie, tels qu'IKK2 (*Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase subunit β*) ou p52 conduit à l'augmentation de l'expression du RA et des V-RA. Inversement, l'inhibition de la voie NF-κB conduit à diminuer l'expression des V-RA[201,202]. En effet, l'extinction de l'expression des protéines hnRNP (*heterogeneous nuclear*

RiboNucleoProteins), hnRNPA1 et hnRNPA2, sous le contrôle de la voie NF-κB conduit à diminuer l'expression protéique du RA-e et du RA-V7 dans des lignées 22Rv1 et VCaP. Cette diminution d'expression des récepteurs est associée avec une augmentation de la sensibilité à un traitement avec l'Enzalutamide[203]. D'autres molécules, appartenant à la famille des hnRNPs, hnRNP1 et hnRNPH1 peuvent s'associer directement au locus du gène du RA et induire l'expression du RA-e et des V-RA, dont RA-V7[204]. Une autre étude a démontré que des facteurs d'épissage, SRSF1 (*Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1* autrement appelé ASF/SF2) et U2AF65, peuvent s'associer au pré-ARNm du RA, au niveau de l'exon CE3/3b (codant pour l'exon 3' terminal du RA-V7). Ainsi, dans des lignées LNCaP95, exprimant fortement RA-V7, l'inhibition de l'expression de ces facteurs d'épissage conduit à l'abolition de l'épissage de l'exon 3 en exon CE3, et donc à la diminution de l'expression du RA-V7[205]. Outre l'expression du RA et l'altération du processus d'épissage, d'autres mécanismes peuvent induire la synthèse de V-RA. Par exemple, une mutation non-sens, localisée dans l'exon 4 de l'ARNm du RA (ARQ640X) peut être à l'origine de la formation d'un codon stop. L'arrêt précoce de la traduction produit ainsi un variant constitutivement actif qui se localise dans le noyau[206]. Un autre mécanisme alternatif de synthèse de V-RA implique une protéase dépendante du calcium : la calpaïne 2. Cette enzyme peut induire un clivage protéolytique au niveau C-terminal du RA, ce qui peut conduire à la biosynthèse de V-RA. Or il a été montré que l'expression de calpaïne 2 est plus élevée dans les CaP métastatiques en comparaison à des CaP localisés, ce qui laisse suggérer un rôle dans la formation de V-RA[207,208].

c) Fonctions génomiques du RA-V7

Il a été démontré que le variant RA-V7 est capable de réguler à la fois des gènes cibles du RA mais aussi un ensemble de gènes à part entière (**Tableau 5**).

Récepteur	Cibles géniques communes	Cibles géniques spécifiques
RA-e V-RA : RA-V7 / AR-V^{567es}	EDN2, ETS2, FKBP5, KLK2 (HK2), KLK3 (PSA), MDH1, NKX3-1, OGDH, TMPRSS2	ETS2*, RASSF3**, SGK1 AKT1, BIRC3, CDC25B, CCNA2, EDN2, ETS2, HES1, HSP27, ORM1, SRD5A1, UBE2C

AKT1 : Protein Kinase B / **BIRC3** : Baculoviral IAP Repeat Containing 3 / **CCNA2** : Cyclin A2 / **CDC25B** : Cell Division Cycle 25B / **EDN2** : Endothelin 2 / **ETS2** : ETS Proto-Oncogene 2 / **FKBP5** : FKBP Prolyl Isomerase 5 / **HES1** : Hes Family BHLH Transcription Factor 1 / **HSP27** : Heat Shock Protein 27 / **KLK2** : Kallikrein Related Peptidase 2 / **KLK3** : Kallikrein Related Peptidase 3 / **MDH1** : Malate Dehydrogenase 1 / **NKX3-1** : NK3 Homeobox 1 / **OGDH** : Oxoglutarate Dehydrogenase / **ORM1** : Orosomucoid 1 / **SGK1** : Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1 / **RASSF3** : Ras Association Domain Family Member 3 / **SRD5A1** : Steroid 5 Alpha-Reductase 1 / **TMPRSS2** : Transmembrane Serine Protease 2 / **UBE2C** : Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 C

* Si déplétion du FT FOXA1 ** Si expression du FT FOXA1

Tableau 5 : Exemples de gènes régulés par le RA et ses V-RA

En l'absence d'androgènes, les V-RA, tels que RA-V7 et AR^{v567es}, sont capables d'induire l'expression de gènes régulés par le RA comme le PSA (KLK3)[197] ou TMPRSS2 (Sérine protéase transmembranaire), un gène pouvant fusionner avec les gènes des facteurs de transcription ETS (*E26 transformation specific*), ERG ou ETV1, favorisant le développement du CPRC[209]. En plus, de l'activation de cibles communes au RA-e, le variant RA-V7 peut aussi induire l'expression d'un sous-ensemble unique de gènes. Une étude a montré que dans la lignée LNCaP, l'expression inductible du RA-V7 était suffisante pour stimuler la transcription des gènes tels que SRD5A1 - *Steroid 5 α-Reductase 1* (une enzyme catalysant la conversion de la testostérone en DHT) ou ETS2 – *ETS Proto-Oncogene 2* (un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'apoptose)[210]. Une autre étude a montré que le RA-V7 peut aussi conduire à l'expression de gènes tels que AKT1[187] (*Protein Kinase B*) ou des gènes impliqués dans la régulation de la phase M du cycle cellulaire (CCNA2 ou UBE2C)[197,211]. Par ailleurs, le RA-e possède aussi, des cibles exclusives comme SGK1[212]. Mais il est intéressant de noter que la régulation exclusive de certains gènes peut être dépendante de certaines conditions. C'est le cas des gènes EDN2 et ETS2 qui peuvent être régulés par le RA si le facteur de transcription (FT)

FOXA1 est absent. Autrement, la présence du FT FOXA1 est requise afin que le RA puisse réguler le gène RASSF3[210].

Parmi les différentes cibles géniques, certaines études confèrent une régulation exclusive à un RA donné tandis que d'autres contredisent cette observation par la découverte d'une régulation commune (exemple des gènes END2 ou ETS2). Le contexte cellulaire d'étude et les lignées du CaP utilisées peuvent expliquer une telle disparité. En effet, les gènes régulés par le RA sont dépendants du contexte cellulaire[213]. Divers paramètres peuvent influencer le rôle des récepteurs. Tout d'abord l'environnement cellulaire, la concentration d'androgènes influence la prolifération des cellules du CaP. Quand ces dernières sont exposées à un intervalle de concentration d'androgènes allant de 0,1 à 1 nM, leur prolifération est efficacement stimulée. Cependant quand le seuil de concentration d'androgènes dépasse 10 nM, cela conduit à un effet antiprolifératif[214]. Ainsi, certains gènes sont sensibles à cette variation de concentration en androgènes. Des gènes comme UBE2C et CCNA2, peuvent être régulés par le RA-e : en cas d'appauvrissement du milieu en androgènes, UBE2C et CCNA2 seront stimulés par le RA-e alors qu'en cas de manque d'androgènes dans le milieu, le RA-e va réprimer ces gènes du cycle cellulaire[200]. Par ailleurs, il a été aussi montré que le RA-e et le RA-V7 peuvent réguler des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire (MHD1 et OGDH, réprimé par le RA-e, stimulé par le RA-V7), ce qui conduit à considérer que les cellules de CaP n'auront pas le même métabolisme en fonction du degré d'expression des différents récepteurs du RA[215,216]. Enfin, il est intéressant de noter que malgré l'induction de programmes transcriptionnels distincts entre le RA-e et le RA-V7[197], ces études suggèrent que la résistance à l'Enzalutamide médié par les V-RA, passent par la réactivation de cibles géniques du RA-e au lieu de l'induction de gènes spécifiques des V-RA[200].

L'ensemble de ces études montre que les isoformes du RA peuvent réguler différents gènes cibles communs ou exclusifs selon un contexte cellulaire précis, ce qui contribue à la complexité cellulaire de leur fonctionnement.

d) Implication dans la résistance à l'Enzalutamide

L'expression du RA-V7 est associée à l'amplification du gène du RA et/ou à son induction par la déprivation androgénique[197,217,218]. De plus, c'est le variant le plus détecté dans les tissus du CaP après traitement par hormonothérapie ou dans le cas du CPRC[219]. Ces données ont amené à la caractérisation du rôle du RA-V7 dans le CaP : est-ce que son expression est due à la pression de sélection imposée par le ciblage du RA-e ou est-ce que la synthèse de ce variant est fondamentale dans le développement de la résistance à la thérapie ? Les différentes études réalisées ont associés ce variant avec l'émergence de la résistance à l'Enzalutamide, du fait de son activation constitutive (**Figure 12**)[220]

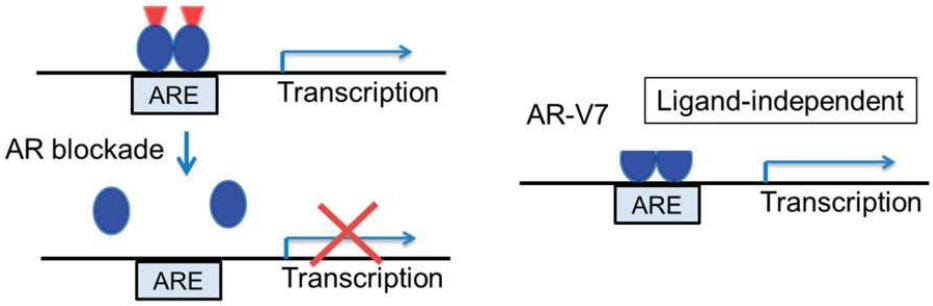


Figure 12 : Activation constitutive du RA-V7 des gènes cibles du RA
L'utilisation d'inhibiteurs du RA est inefficace pour le variant RA-V7, dont l'activation est ligand-indépendant.
AR : Récepteur des Androgènes. ARE : Élément de Réponse aux Androgènes

Une étude a démontré que l'inhibition du RA-V7, dans les lignées de CaP hormonorésistantes 22Rv1 et CWR-R1, réduisait la croissance tumorale, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* et rétablissait la sensibilité dans des conditions de déprivation androgénique[187]. Une autre étude a confirmé que l'expression du RA-V7 était suffisante pour induire la résistance à l'Enzalutamide dans la lignée 22Rv1. En effet, cette lignée cellulaire possède une capacité de croissance continue malgré les traitements avec les anti-androgènes (Enzalutamide ou Bicalutamide). Cependant une inhibition de l'expression des V-RA, dont le RA-V7, était suffisante pour rétablir la sensibilité à la déprivation androgénique et ralentir la prolifération cellulaire[200]. Par ailleurs, une autre étude s'est intéressée au ciblage du RA-e et du RA-V7. Par l'utilisation d'oligonucléotides antisens (ASOs), dirigé contre le RA-e, cela inhibait la croissance cellulaire et induisait l'apoptose dans une lignée LNCaP insensible à l'Enzalutamide. Cependant l'utilisation d'ASOs bloquant l'expression du RA-e et du RA-V7, simultanément, induisait une plus forte inhibition que celle observée par le ciblage seul du RA-e[221].

e) Évaluation en tant que biomarqueur pronostique

Une première étude, réalisée par Antonarakis *et al*, a tranché sur l'intérêt du RA-V7 en tant que biomarqueur prédictif par l'évaluation de la corrélation entre l'expression du variant et la résistance à l'Enzalutamide[222]. Les niveaux d'ARNm du RA-V7 ont été évalués dans des cellules tumorales circulantes (CTC) de deux groupes de 31 patients atteints de CPRC traités avec de l'Enzalutamide ou de l'Abiratérone. Les résultats ont montré :

- le groupe traité avec l'Abiratérone : 19% des patients exprimaient le RA-V7, sans effondrement du taux de PSA, avec une réduction de leur survie globale (HR 9.9, médiane de 10.6 mois) comparés aux patients n'exprimant pas le RA-V7 (68% de baisse de PSA post-traitement, médiane non atteinte).
- le groupe traité avec l'Enzalutamide : 39% des patients exprimaient le RA-V7 sans baisse du taux de PSA mais avec une réduction de leur survie global (HR : 4.3, médiane de 5.5 mois) comparés aux patients n'exprimant pas le RA-V7 (53% de baisse du PSA post-traitement, médiane non atteinte).

Cette étude a démontré que pour les patients exprimant le RA-V7, soit 20 à 40% des cohortes, le traitement avec l'Enzalutamide ou l'Abiratérone n'induisait aucun bénéfice, et que l'expression du variant est associée à un mauvais pronostic. Par ailleurs, la validation des premiers résultats d'Antonarakis avec une cohorte plus importante (n=202), renforce la corrélation entre la non réponse au traitement avec l'Enzalutamide et le taux d'expression du RA-V7 dans les CTC[223]. Ces données sont corroborées par les résultats d'une étude multicentrique « Prophecy », comparant les résultats de deux méthodes de mesures de l'expression du RA-V7 dans les CTC (*Johns Hopkins University AdnaTest CTC AR-V7 mRNA assay* et *Epic Sciences CTC nuclear-specific AR-V7 protein assay*), chez 118 patients atteints d'un CPRC métastatique. Chaque méthode conduit à l'association de l'expression du RA-V7 avec une réduction de la survie sans progression et de la survie globale chez les patients traités avec l'Enzalutamide et l'Abiratérone[224]. Outre les CTCs, le développement des méthodes de détection de l'expression de l'ARNm ou de la protéine du RA-V7, a permis de conduire d'autres études évaluant la réponse au traitement avec l'Enzalutamide (ou l'Abiratérone) dans des biopsies de moelle osseuse ou des échantillons de plasma[196,225,226]. Ainsi une cohorte de 60 patients présentant des métastases osseuses dues à leur CPRC a été traitée par une combinaison d'Abiratérone et d'Enzalutamide. Suite à des biopsies de moelle osseuse: 66% des patients qui

ont progressé dans les premiers mois de traitement, expriment le récepteur RA-V7, tandis que ce V-RA n'est pas détectable chez des patients répondants au traitement depuis plus de 6 mois[227]. Une autre étude prospective a confirmé ces observations, lors de l'évaluation des effets d'un traitement avec de l'Enzalutamide, chez 60 patients présentant un CPRC avec des métastases osseuses. Des biopsies de la moelle osseuse ont été réalisées avant et après traitement. L'expression du RA-V7 a été détectée dans plus de 1% des cellules tumorales. Parmi les patients, dont le CaP a progressé dans les 4 mois suivant le traitement avec l'Enzalutamide, 57% d'entre eux ont un taux détectable de la protéine RA-V7. Alors que les patients répondants à la thérapie, après 6 mois de traitement, n'avaient aucune expression du RA-V7[225]. Une autre étude s'est intéressé à l'évaluation de l'expression du RA-V7 selon la gravité du CaP par la détection de l'ARNm du RA-V7 dans différents échantillons de CaP[228]. Ainsi l'ARNm du RA-V7 a été détecté :

- 1 échantillon sur 30, de biopsies de prostatectomie totale
- 10 échantillons sur 22, de biopsies de CaP métastatique hormonosensible
- 12 échantillons sur 12, de biopsies de CPRC

Ces données suggèrent une augmentation de l'expression du RA-V7 avec la progression du CaP. D'autres résultats ont démontré que cette augmentation d'expression du RA-V7 est corrélée avec l'émergence de la résistance à la castration. Par immunohistochimie, l'expression du RA-V7 a été déterminée au sein de 358 échantillons de CaP primaires et 293 biopsies de CPRC métastatiques. Les résultats montrent que la protéine RA-V7 est très faiblement exprimée dans les échantillons de CaP primaires (<1% d'expression), cependant la fréquence de détection est beaucoup plus importante (75% d'expression) dans les échantillons précédemment traités par déprivation androgénique (Enzalutamide ou Abiratérone). Dans le cas des biopsies de CPRC, le variant est retrouvé dans 94% des cas. Cette détection du RA-V7 a été associée avec la réponse au traitement, par comparaison avec une cohorte de patients n'exprimant pas le variant[229] :

- Après hormonothérapie, le taux de PSA chutait de 100% pour les patients RA-V7 négatifs comparé à une réduction de 54% pour la cohorte exprimant le RA-V7
- Après hormonothérapie, la moyenne de survie globale était de 74,3 mois pour les patients RA-V7 négatifs vs 25.2 mois pour les patients RA-V7 positifs (HR : 0.23 ; 0.07-0.79 ; p=0.02)

L'ensemble de ces études (**Tableau 6**) montre que l'expression du RA-V7 est stimulée lors de la progression du CaP et/ou par le traitement avec l'Enzalutamide (ou l'Abiratérone). L'expression de ce variant est associée à une diminution significative de la survie sans progression et de la survie globale des patients du fait de l'émergence d'une résistance à la thérapie. Ainsi ces données renforcent le potentiel du RA-V7 en tant que biomarqueur et cible thérapeutique.

Investigateur principal	Nombre de patients / échantillons de patients	Technologie de détection du RA-V7	Année de l'étude
Sharp[229]	651 biopsies	Immunohistochimie (protéine – tissu)	2019
Zhu[230]	63 biopsies	Hybridation *in situ* d'ARN (ARNm-tissu)	2018
Seitz[231]	85 patients	RT-PCR (ARNm – sang-	2017
Del Re[232]	36 patients	PCR (ARNm – Exosomes)	2017
Saylor[228]	42 échantillons	Hybridation *in situ* d'ARN (ARNm-tissu)	2017
Qu[233]	132 patients	Droplet digital (dd) PCR (ARNm-sang)	2017
Antonarakis[223]	202 patients	RT-PCR (ARNm - sang)	2017
Scher[234]	161 patients	Immunofluorescence (protéine – sang)	2016
Usher[235]	13 patients	RT-PCR (« *cell free RNA* » - sang)	2016
Ma[236]	24 patients	ddPCR (ARNm-sang)	2016
Guedes[237]	43 biopsies	Hybridation *in situ* d'ARN (ARNm-tissu)	2016
Welti[238]	37 biopsies	Immunohistochimie (protéine - tissu)	2016
Miyamoto[239]	49 patients	RNA-Seq (ARNm – sang)	2015
Antonarakis[222]	62 patients	RT-PCR (ARNm - sang)	2014
Hörnberg[211]	40 patients	Western Blot (protéine) / RT-PCR (ARNm)	2011

Hu[186]	107 biopsies	RT-PCR (ARNm – tissu)	2009

Tableau 6 : Exemples d'études cliniques de l'expression du RA-V7

IV. La voie de signalisation de la MAPK p38

A. Les MAPKs

1. Généralités

Les MAPKs (*Mitogen-Activated Proteins Kinases*) représentent une famille de protéines kinases composée de :

- ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2*) : activée par des facteurs de croissance et des mitogènes
- JNK1/2/3 (*c-Jun N-terminal kinase*) : activée en réponse à des stress génotoxiques ou des cytokines inflammatoires
- BMK (*Big Map Kinase*) ou ERK5 : activée en réponse à des stress oxydatifs et des facteurs de croissance
- p38 : activée en réponse à des stress génotoxiques ou des cytokines inflammatoires

Ces différentes enzymes interviennent dans la régulation cellulaire. Elles permettent de produire une large gamme de réponses cellulaires après l'intégration de stimuli extracellulaires : la croissance cellulaire, la différenciation, la réponse au stress ou la réponse immunitaire[240]. L'activation de ces voies est réalisée par une série de phosphorylation due à trois protéines kinases différentes, qui vont s'activer à tour de rôle jusqu'à induire la fonction cellulaire adaptée : MAPK kinase kinase (MAP3K/MKKK) → MAPK kinase (MAP2K/MKK) → MAPK → Réponse cellulaire (**Figure 13**)[241].

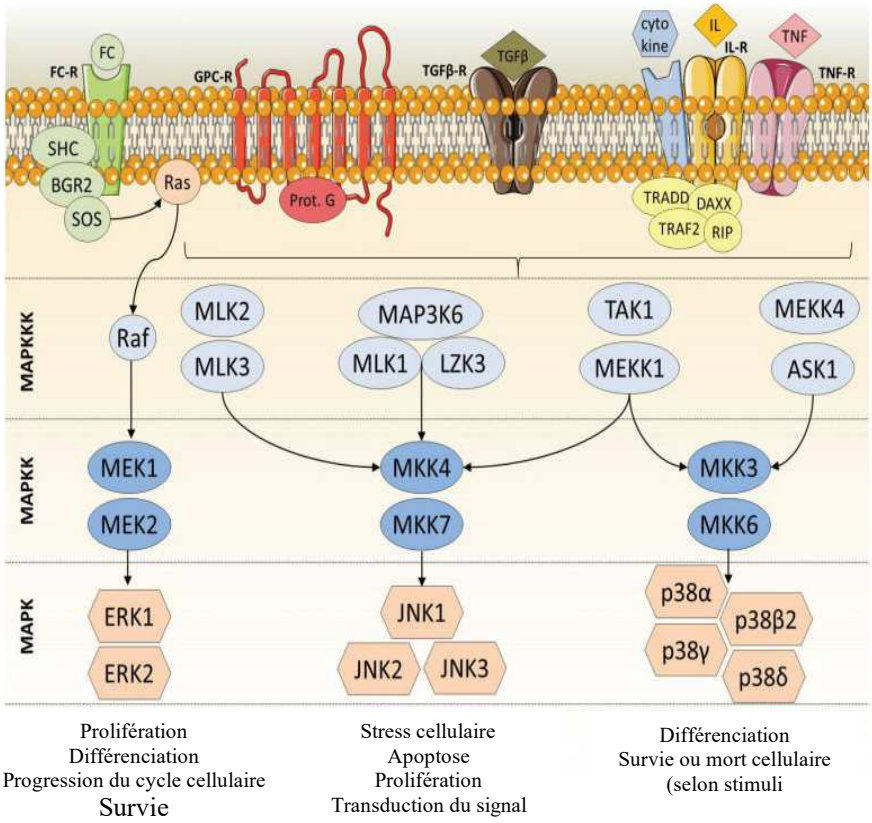


Figure 13 : Voie de signalisation simplifiée des MAPKs
Les MAPKs se divisent en trois voies de signalisation : ERK, JNK et p38. Après réception de leurs stimuli respectifs au niveau des récepteurs membranaires, la transduction du signal de chaque voie se fait par trois étapes de phosphorylation réalisée par les MP3K → MP2K → MPK.
ERK (Extracellular Signal regulated Kinase). JNK (c-Jun NH2-terminal kinase). MP3K (MAPK Kinase Kinase). MP2K (MAPK Kinase)

Les MAPKs sont activées par la détection d'un signal (stress, cytokines, hormones, neurotransmetteurs) par leurs récepteurs membranaires (Tyrosine kinase). Cette liaison provoque un changement de conformation du récepteur conduisant à son autophosphorylation. Par la suite, le signal se propage sous forme de phosphorylations en série, dans la boucle d'activation d'autres protéines, au niveau de résidus thréonine (Thr) ou tyrosine (Tyr). La séquence en acides aminés de cette boucle d'activation varie selon les MAPKs : un motif Thr-Glu-Tyr (ERK1/2, BMK), un motif Thr-Pro-Tyr (JNK), et un motif Thr-Gly-Tyr (p38)[242].

2. Les MAPKs p38

Les MAPKs p38 constituent une famille de kinases phosphorylant les résidus sérine/thréonine de divers substrats. L'ensemble des kinases p38 comprend quatre isoformes issues de différents gènes[243–246]: p38α (MAPK14), p38β (MAPK11), p38γ (MAPK12) et p38δ (MAPK13). Les isoformes p38α et p38β partagent 75% d'homologie tandis que p38γ et p38δ ont 70%

d'homologie[243,247]. De plus, les quatre isoformes de la MAPK p38 ont une expression différentielle selon le tissu[248,249] (**Tableau 7**)[250].

Isoforme	**p38α**	**p38β**	**p38γ**	**p38δ**
Expression tissu-spécifique	Ubiquitaire	Cerveau, thymus, rate	Muscles squelettiques	Pancréas, intestins, glandes surrénales, rein, cœur
MKK activatrice	MKK3, MKK6 et MKK3	MKK6	MKK3, MKK6	MKK3, MKK6
Similarité de séquence (%)	100	75	63	63
Fonctions	Réponse au stress, différentiation, inflammation, cycle cellulaire, prolifération, myogénèse[251]	Réponse au stress, inflammation, prolifération[251]	Prolifération, régulation des microtubules[247]	Différentiation kératinocytes[252], Prolifération, apoptose[247]

Tableau 7 : Comparaison des différentes isoformes de la MAPK p38

Les quatre isoformes de p38 sont caractérisées par la présence d'un motif de phosphorylation Thréonine-Glycine-Tyrosine situé dans leur boucle d'activation [253].

B. Régulation de la voie de signalisation des MAPKs p38

1. Activation des MAPKs p38

La MAPK p38 fait partie de la famille des *Stress Activated Protein Kinases* (SAPK), des protéines activées par un stress. Elle est impliquée dans la réponse à un large éventail de stimuli (stress oxydatif, stress osmotique, cytokines, facteurs de croissance…)[254]. L'activation des récepteurs de cette voie de signalisation conduit au recrutement de GTPases de la famille Rho qui stimulent des MKKK : ASK1 (*Apoptosis Signal regulating Kinase 1*), TAO1/2 (*Thousand-And-One amino acid 1/2*), DLK1 (*Dual-Leucine zipper-bearing Kinase 1*), MLK3 (*Mixed Lineage Kinase 3*) et MEK Kinase (MEKK)[255]. La cascade d'activation se poursuit par l'action des MKKK, qui vont induire la phosphorylation des MKK. Les protéines MKK activées vont phosphoryler les différentes isoformes de p38[256,257] (**Tableau 7**) :

- MKK6 est le principal activateur de p38 en phosphorylant toutes les isoformes de p38
- MKK3 phosphoryle p38α, p38γ et p38δ et son action est moins efficace sur l'isoforme p38β

- MKK4 peut stimuler, conditionnellement, l'isoforme p38α

L'action des MKK se fait sur un motif de phosphorylation conservé dans les isoformes de p38 : un motif Thréonine-Glycine-Tyrosine (TGY). À la suite de leur activation, les protéines p38 peuvent transloquer dans le noyau où elles phosphorylent les résidus sérine/thréonine de leurs nombreux substrats[258].

Il est à noter qu'en plus de cette voie classique d'activation, la MAPK p38 est capable d'induire son autophosphorylation et donc sa propre activation à travers deux mécanismes alternatifs (**Figure 14**) :

- L'activation du récepteur TCR-CD3 (*T-cell receptor-Cluster of Differentiation 3*) stimule la protéine ZAP70 (*Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70*) qui va conduire à la phosphorylation de p38 sur son résidu Tyrosine323[259].
- La MAPK p38 peut être activé sans avoir recours à MKK3/4/6, par son interaction avec TAB1 (*Transforming growth factor* (TGF)-*Activated protein kinase 1-Binding protein 1*)[260,261]

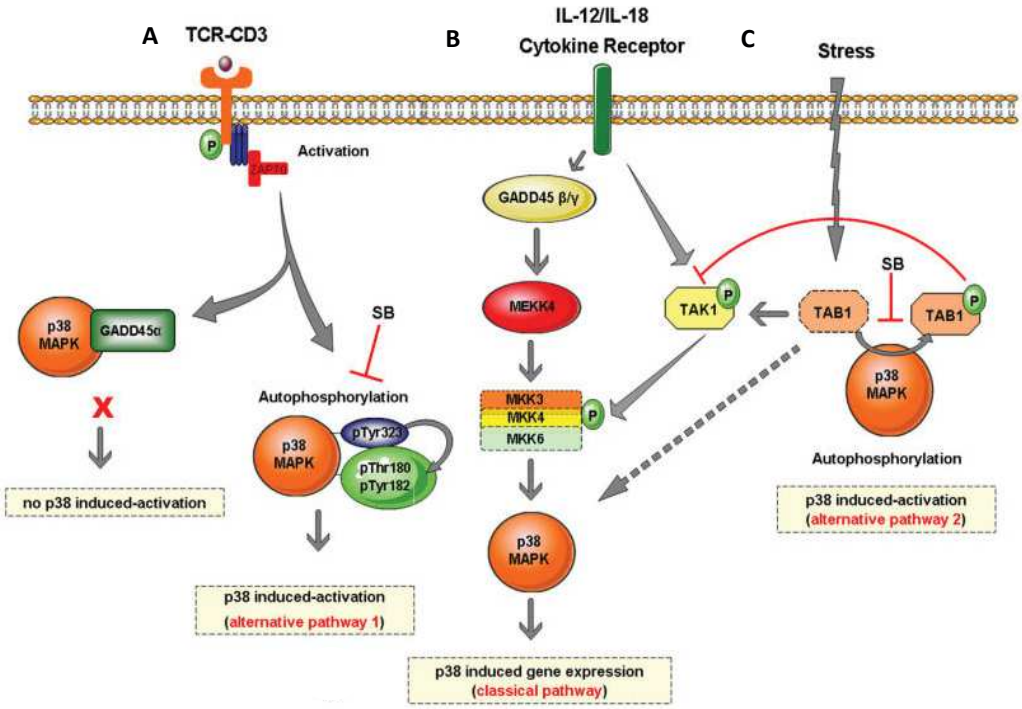


Figure 14 : Activation de la voie de la MAPK p38

A. La voie de la MAPK p38 comporte une première voie d'activation alternative induite par le T-Cell Receptor (TCR). La MAPK p38, phosphorylé au niveau de son résidu Tyr323, va stimuler son autophosphorylation. **B.** L'activation classique est faite par une double phosphorylation des résidus Thr180 et Tyr182 de la MAPK p38. Cette voie peut être activée par l'IL-12/IL-18 si le cycle cellulaire doit être arrêté. **C.** La deuxième voie d'activation alternative implique TAB1, stimulée par TAK1. La protéine TAB1 active MKK3/MKK6 conduisant à la stimulation de la voie de la MAPK p38 et à son autophosphorylation. *MKK: MAPK kinase. MKKK: MAPK kinase kinase. TAK1: Transforming growth factor-β Activated Kinase-1. TAB1: TAK1-binding protein. SB: Inhibiteur de p38*

2. Inhibition des MAPKs p38

a) Inhibition par les phosphatases

La MAPK p38 est activée par une double phosphorylation au niveau de sa boucle d'activation, sur ses résidus Thréonine 180 et Tyrosine 182 du motif TGY. Par conséquent, la déphosphorylation de ces sites constitue le moyen le plus rapide pour stopper l'activation de cette voie de signalisation. Ce rôle est rempli par les membres de la famille des phosphatases, les DUSP (*Dual-Specificity Phosphatases*, notamment les MKP (*MAPK Phosphatases*) : MKP1/4/5/7. Ces enzymes peuvent agir aussi bien au niveau des protéines p38 que des protéines MKK[262]. Ainsi l'interaction de la MKP avec la MAPK p38 induit un changement de conformation de l'enzyme, ce qui stimule son activité phosphatase. De plus, ces phosphatases peuvent être activées par divers stimuli, y compris ceux qui activent p38[263].

D’autres phosphatases peuvent aussi inactiver la MAPK p38 : les membres de la famille PP2 des sérine-thréonine. En effet, les protéines PP2C (*Serine/threonine protein phosphatase 2C*) et Wip1 (*Wild-type p53-induced phosphatase 1*) sont capables d’inactiver la MAPK p38 par la déphosphorylation de son résidu Thr180 ou par l’inhibition des MKK[264,265]. Une autre phosphatase, PP2A (*Protein phosphatase 2*) peut interagir directement avec la forme active de p38 pour désactiver la kinase[266].

b) Inhibition pharmacologique

Les inhibiteurs de kinases sont divisés en cinq classes distinctes : les inhibiteurs de type I, de type I½ , de type II, de type III et de type VI[267]. Les molécules ciblant la MAPK p38 appartiennent aux classes d’inhibiteurs de type I et II. Ces inhibiteurs vont se lier au niveau du site de fixation de l’ATP et empêcher l’activité catalytique de phosphorylation de la kinase. L’inhibiteur de type I est une molécule se liant dans la poche ATP de la protéine kinase ayant adopté une conformation active (exposition de la boucle d’activation contenant le motif « DFG », acide aspartique-phénylalanine-glycine, essentiel au transfert de phosphate[268]). Tandis que l’inhibiteur de type II est un composé se fixant au site de liaison de l’ATP de la protéine kinase adoptant une conformation inactive[269]. Ces différentes molécules vont se loger dans la poche ATP de la protéine kinase, au niveau du résidu Thr106, induisant l’inhibition de l’activité de la MAPK p38. Il est à noter que ces composés ne ciblent que les isoformes alpha et bêta car les isoformes p38γ et p38δ possèdent une méthionine à la place de l’acide aminé Thr106, ce qui crée un encombrement allostérique, empêchant l’accès à la poche ATP pour les inhibiteurs[270].

De nombreux inhibiteurs de la MAPK p38 ont été développés du fait de son implication dans l’inflammation[253,271,272]. Ces différentes études ont abouti à la mise en place d’essais cliniques pour le traitement de maladies inflammatoires majoritairement (**Tableau 8**).

Nom	Fournisseur	Pathologies évaluées
AMG-548	Amgen	Arthrite rhumatoïde, maladie pulmonaire obstructive chronique[273]
ARRY-614 (Pexmetinib)	Array Biopharma	Syndromes myélodysplasiques[274]
ARRY-797	Array Biopharma	Douleurs dentaires, arthrite rhumatoïde, cardiomyopathie[275–278]
AVE-9940	Sanofi-Aventis	Arthrite rhumatoïde[279]
AZD-6703	Astra Zeneca	Arthrite rhumatoïde[280]
BIRB796	Boehringer Ingelheim	Spondylarthrite ankylosante, arthrite rhumatoïde, psoriasis, maladie de Crohn[281–283]
BMS582949	Bristol Myers Squibb	Spondylarthrite ankylosante, psoriasis, arthrite rhumatoïde, athérosclérose[284–286]
GSK-610677	GlaxoSmithKline	Maladie pulmonaire obstructive chronique[287]
KC706	Kemia	Psoriasis[288]
Losmapimod	GlaxoSmithKline	Infarctus, maladie pulmonaire obstructive chronique, athérosclérose[289–291]
LY2228820 (Ralimetinib)	Eli Lilly	Cancer du sein[292]
Pamapimod	Roche	Spondylarthrite ankylosante[293]
PH-797804	Pfizer	Arthrite rhumatoïde, maladie pulmonaire obstructive chronique, douleurs neuropathiques[294–297]
RO3201195	Roche	Spondylarthrite ankylosante, Arthrite rhumatoïde[298,299]
SB-681323	GlaxoSmithKline	Arthrite rhumatoïde, maladie pulmonaire obstructive chronique, douleurs neuropathiques[300,300–306]
SB-85635	GlaxoSmithKline	Arthrite rhumatoïde, maladie pulmonaire obstructive chronique[307]
SC80036	Pfizer	Arthrite rhumatoïde[308]
SCIO-469	Scios Inc, Johnson and Johnson	Spondylarthrite ankylosante, ischémie cérébrale, syndromes myélodysplasiques, arthrite rhumatoïde[309–314]
TAK-715	Takeda	Arthrite rhumatoïde[306]
VX-702	Vertex	Arthrite rhumatoïde, syndrome coronarien aigu[315,316]
VX-745	Vertex, EIP Pharma	Arthrite rhumatoïde, maladie d'Alzheimer[317–319]

Tableau 8 : Liste des inhibiteurs de la MAPK p38 utilisés dans des essais cliniques

C. Implication de la MAPK p38 dans le cancer de la prostate

1. Expression dans le cancer de la prostate

Les protéines MAPK p38 sont exprimées dans les cellules basales et épithéliales de la prostate[320]. En cas de néoplasie ou d'hypertrophie bénigne de la glande, il y a une augmentation de leur phosphorylation[321]. Une autre étude a confirmé cette sur-activation chez des souris TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*), un modèle animal d'étude du cancer de la prostate[322]. Le suivi de l'expression et de l'activation de la MAPK p38, par western blot et par immunohistochimie, montre que ces protéines sont exprimées et/ou activées de façon différentielle pendant la progression du cancer de la prostate. En effet, l'activation de la kinase est plus importante dans les cellules tumorales comparées aux cellules saines. De plus, cette augmentation de l'activité de la MAPK p38 est associée à la progression tumorale car les cellules cancéreuses ont une prolifération plus importante[323]. D'autres études ont montré que différentes protéines kinases de la voie de signalisation de la MAPK p38 sont surexprimées dans le CaP[321,323]. Parmi ces kinases, une des protéines activatrices de p38, MKK6 est surexprimée. En effet, différents tissus prostatiques ont été analysés : 20 échantillons de tissus normaux, 47 échantillons de tissus hypertrophiques et 27 échantillons de tissus cancéreux. Le but de l'étude étant de comparer le niveau d'expression des protéines MKK6 et p38. Les résultats montrent une augmentation de l'expression de ces kinases jusqu'à être plus importante dans le tissu cancéreux[324]. Cette surexpression est corrélée à l'implication de deux facteurs stimulant la voie de la MAPK p38 : la cytokine IL-1 (Interleukine-1) activant la kinase PAK-1 qui va phosphoryler MKK6. Et la cytokine TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-α*) conduisant à la phosphorylation de MKK6 par la kinase ASK-1. L'ensemble de cette cascade d'activation conduit à la stimulation de la prolifération des cellules tumorales.

2. Implication dans la progression tumorale et la résistance au traitement

Différentes études ont démontré l'implication de la voie de signalisation de la MAPK p38 dans la progression tumorale par la stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire mais aussi par son implication dans la réponse au traitement.

La voie de signalisation de la MAPK p38 est impliquée dans la survie cellulaire. Une étude a montré que dans une lignée LNCaP, la protéine kinase p38 inhibe le phénomène d'apoptose dépendant de la cytokine TNF-α. En effet, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de TNF-α et d'inhibiteurs de p38. Les résultats ont montré que le processus d'apoptose augmentait avec la concentration de TNF-α. Mais que cette augmentation était plus importante avec l'utilisation d'un inhibiteur de p38[325]. D'autres études ont corrélé l'expression du PSMA (*Prostate Specific Membrane Antigen*) à l'activation de la MAPK p38. Le PSMA est une protéine fortement exprimée dans le CaP. De plus, son expression stimule la prolifération, la migration et la survie des cellules cancéreuses[326–329]. Or, l'inhibition de la protéine PSMA, dans une lignée LNCaP, a conduit à réduire le niveau de phosphorylation de la MAPK p38 provoquant la diminution de la migration et de la viabilité cellulaire. Ces mêmes effets ont été constatés lors de l'inhibition de la protéine kinase avec le SB203582 : il y a une réduction de la prolifération, de la migration et la survie des cellules LNCaP[330]. Ces données tendent vers une stimulation de la progression tumorale par le PSMA via la voie de signalisation de la MAPK p38. Une autre étude a démontré que l'activation de la MAPK p38 était une réponse au phénomène d'hypoxie conduisant à la mise en place du processus d'hypoxie-réoxygénation et à l'augmentation de l'activité du RA indépendante la liaison des androgènes. Cet ensemble de phénomènes conduit à promouvoir la progression tumorale. Mais l'inhibition de l'expression de la MAPK p38 provoque la diminution de la survie cellulaire et le potentiel invasif des cellules tumorales[331]**.**

La MAPK kinase p38 peut interagir avec le RA, responsable de la progression tumorale dans le CaP[39]. Nous avons évoqué son interaction indirecte avec le RA, par la phosphorylation de l'HSP27 conduisant à la stimulation de l'invasion tumorale[75–77]. Mais la protéine kinase est aussi capable de phosphoryler directement le RA, sur son résidu S650. Cette phosphorylation conduit à moduler la localisation cellulaire et l'activité transcriptionnelle du RA[104]**.** Cette modulation du RA par la MAPK p38 a été associée à des mécanismes pro-tumoraux dans le cancer de la prostate. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation mTOR/CD1 dépendante de p38 permet de stimuler la prolifération tumorale par l'interaction entre le RA et l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*)[332]**.**

La MAPK kinase p38 est aussi impliquée dans la résistance aux traitements. Une étude a comparé l'expression de la protéine kinase dans une lignée de CaP, DU145, résistante à un

traitement avec de l'acide zolédronique par rapport à une lignée DU145 non traitée. Les résultats ont indiqué une plus forte activation de la MAPK p38 dans la lignée résistante. De plus, cette lignée présentait un phénotype plus agressif et plus invasif du fait de l'expression de marqueurs du TEM et d'oncoprotéines (IL-12, MMP-9 ou c-Myc). Or l'inhibition de la MAPK p38 conduisait à une diminution de l'expression de ces marqueurs ainsi qu'au rétablissement de la sensibilité à l'acide zolédronique dans cette lignée résistante[333]. Une autre étude a comparé la sensibilité de trois lignées cellulaires du CaP à un traitement avec du Docetaxel : LNCaP, DU145 et PC3. La lignée LNCaP démontre la plus grande résistance avec une augmentation significative du niveau de phosphorylation de p38. Or l'utilisation d'un inhibiteur chimique (SB203580) ou d'un siRNA dirigé contre la MAPK p38 conduit à augmenter la sensibilité des cellules LNCaP au Docetaxel[334]. Par ailleurs, nous avons aussi observé, dans nos propres études, cette implication de l'activation de la protéine kinase p38 dans la résistance aux traitements. En effet, nous avons montré qu'un traitement avec le SN38 (métabolite actif de l'Irinotécan) d'une lignée cancéreuse colorectale, HCT116 conduisait à l'activation de la voie de signalisation de la MAPK p38[335]. De plus, dans une autre de nos études, des clones résistants au SN38 (dérivant des lignées colorectales HCT116 et SW48), présentaient une augmentation de la phosphorylation de la MAPK p38. Nous avons supposé une implication de cette voie de signalisation dans la résistance à ce traitement. Ainsi l'inhibition *in vitro* et *in vivo* de la MAPK kinase p38 conduisait à rétablir la sensibilité aux thérapies basées sur l'Irinotecan[336].

Il est intéressant de noter que l'étude de la MAPK p38 peut conduire à des résultats opposés. Par exemple, c'est le cas pour son implication dans le processus d'apoptose. D'une part, dans différentes lignées de CaP et sous diverses conditions, cette voie de signalisation p38 peut favoriser le processus d'apoptose par l'intermédiaire de différentes molécules: le 2-méthoxyestradiol[337], la mélatonine[338], le raloxifène[339], le carprofène[340], ou la protoapigénone[341]. D'autre part, la MAPK p38 inhibe ce phénomène d'apoptose dépendant du TNF-α[325]. Cependant les variations obtenues ne sont que le reflet de la complexité de la voie de signalisation de la MAPK p38 ainsi que de l'importance du contexte et du système cellulaire d'étude. Ainsi pour notre étude, l'ensemble des résultats évoqués, renforce l'intérêt de la MAPK p38 en tant que potentiel cible thérapeutique, par son implication dans le développement du CaP ainsi que l'émergence de la résistance au traitement.

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Depuis la démonstration des bénéfices cliniques de la castration chirurgicale ou chimique, par Huggins et Hodges[342], la déprivation androgénique demeure une des stratégies thérapeutiques majeures pour le traitement du CaP[343]. Cette thérapie conduit à limiter la biodisponibilité des androgènes, responsables de l'activation du récepteur des androgènes (RA), qui, par son activité de facteur de transcription, conduit à promouvoir la croissance tumorale[190,344,345]. Ainsi la suppression de la synthèse des androgènes peut ralentir ou inhiber la progression des CaP dépendants aux hormones chez les patients. Cependant le phénomène d'échappement hormonal est inévitable, et le plus souvent associé à la réactivation du RA[39,168,343], progressant vers un stade de « résistance à la castration ». Du fait de l'émergence d'une telle insensibilité à cette première thérapie de manipulation hormonale, des inhibiteurs ciblant le RA, comme l'Enzalutamide, ont été développés[346]. L'Enzalutamide est un anti-androgènes, de seconde génération, utilisé chez les patients présentant un cancer de la prostate résistant à la castration, avant ou après chimiothérapie utilisant des taxanes. Cette molécule a permis d'augmenter les bénéfices de survie des patients[52,53]. Cependant bien qu'efficaces, les thérapies ciblant le RA ne sont pas curatives, dans le cas de l'Enzalutamide, il y a l'émergence d'une résistance, ce qui pose un problème thérapeutique majeur[178,200].

Le but de ce projet de thèse est d'améliorer le traitement utilisant l'Enzalutamide en potentialisant ses effets thérapeutiques ou en surmontant la résistance à cette thérapie. Pour cela, nous avons émis l'hypothèse que des voies de signalisation cellulaires sont activées après un traitement avec l'Enzalutamide. Ces voies pourraient conduire à l'identification de potentielles cibles thérapeutiques par leur implication dans la résistance ou dans la sensibilité cellulaire à l'Enzalutamide. Ainsi le ciblage de ces voies par des inhibiteurs de kinases en association avec un traitement à l'Enzalutamide, permettrait de conduire à un effet antitumoral. Nous avons découvert que la protéine p38 est activée par le traitement avec l'Enzalutamide et que l'inhibition de cette MAP kinase, durant ce traitement, a un effet synergique.

Par ailleurs, à la suite de l'identification de l'effet synergique et cytotoxique de l'association d'Enzalutamide et d'inhibiteur de p38, nous avons cherché à en comprendre le mécanisme d'action. Parmi les différents mécanismes de résistance connus dans le CaP, l'existence d'un variant d'épissage constitutivement actif, le RA-V7, est tout particulièrement associé à la résistance à l'Enzalutamide[157]. Ainsi, étudier les effets de notre combinaison de médicaments

sur l'expression d'un variant dont l'implication clinique en tant que biomarqueur pronostique a été prouvé[196,222,223,228], renforcerait l'intérêt de notre étude.

À terme, le but de ce projet est de pouvoir conduire à l'établissement d'un essai clinique avec la combinaison de traitement identifié et caractérisé ce qui permettrait d'ouvrir la voie à de nouvelles alternatives thérapeutiques pour le traitement du cancer de la prostate résistant à la castration.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

I. Culture cellulaire

A. Lignées cellulaires du cancer de la prostate

La lignée LNCaP (*Lymph Node Cancer Prostate*) est obtenue à partir d'une biopsie d'un ganglion lymphatique sous-claviculaire d'un patient atteint d'un cancer de la prostate résistant à la castration. Cette lignée exprime le récepteur des androgènes muté dans son domaine de liaison au ligand (mutation T878A)[347]. Ainsi ce récepteur de la lignée LNCaP peut être activé par les androgènes ainsi que d'autres ligands alternatifs tels que le 17β-estradiol (E2), les œstrogènes ou la progestérone[348–350] (**Tableau 9**).

La lignée 22Rv1 est établie à partir de xénogreffes successives de cellules tumorales humaines CWR22 dans des souris nude[351]. Cette lignée exprime le récepteur des androgènes mutés (mutation H874Y). Cette mutation rend possible l'activation du récepteur par des ligands alternatifs comme le DHEA ou l'E2[352]. De plus, cette lignée cellulaire exprime le variant d'épissage RA-V7 et présente une résistance aux antiandrogènes[200] (**Tableau 9**).

La lignée VCaP est obtenue à partir de la biopsie d'une lésion métastatique d'une vertèbre lombaire d'un patient atteint d'un cancer de la prostate résistant à la castration[353]. Ces cellules expriment le récepteur des androgènes naturel (*Wild-Type* : WT) ainsi que des variants d'épissage dont le RA-V7[186,187,344] (**Tableau 9**).

La lignée PC3 est établie à partir d'une biopsie de métastase osseuse d'un patient atteint d'un cancer de la prostate. Cette lignée n'exprime pas le récepteur des androgènes et est insensible aux androgènes[354] (**Tableau 9**).

La lignée DU145 est issue d'une biopsie d'une métastase cérébrale d'un patient atteint d'un cancer de la prostate. Cette lignée n'exprime pas non plus le récepteur des androgènes[355] (**Tableau 9**).

Lignées	LNCaP	22Rv1	VCaP	PC3	DU145
Origine	Métastase ganglionnaire	Xénogreffe de la lignée CWR22	Métastase vertèbre lombaire	Métastase osseuse	Métastase cérébrale
RA	RA muté (T878A/T877A)	RA muté (H875Y/H874Y)	RA WT	-	-
Variants RA	RA-V7 (expression faible voir indécelable), RA^{v567es}	RA-V1, RA-V2, RA-V3, RA-V4 RA-V5, RA-V6, RA-V7, RA-V9, RA-V12, RA-V13, RA-V14	RA-V3, RA-V7, RA-V8, RA-V9, RA-V10, RA-V11, RA^{v567es}	-	-
PSA	+	+	+	-	-
PTEN	Déplété / Muté	WT	WT	Déplété	WT / Déplété
TP53	WT / Déplété	Muté	Muté	Déplété / Muté	Muté

Tableau 9 : Caractéristiques des lignées cancéreuses de la prostate utilisées

B. Conditions de culture

Les lignées LNCaP, 22Rv1 et VCaP sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) contenant du Glutamax et les lignées DU145 et PC3 sont cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Les milieux sont supplémentés avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Toutes les lignées sont maintenues en culture dans des flasques de 75cm^2, dans un incubateur saturé à 90% d'humidité et contenant 5% de CO2. Les cellules sont régulièrement contrôlées pour la présence de mycoplasmes.

II. Test de cytotoxicité cellulaire à la Sulforhodamine B

Ce test repose sur la capacité de la sulforhodamine B (SRB) à lier des composants protéiques cellulaires, donnant une coloration rouge mesurable et représentative de la biomasse cellulaire (nombre de cellules). Les cellules sont ensemencées, en duplicat, avec un volume de 100µL de milieu de culture, dans les puits d'une plaque 96 puits : 2000 cellules pour la lignée LNCaP, 2500 cellules pour la lignée 22Rv1, 15000 cellules pour la lignée VCaP et 3000 cellules pour les lignées DU145 et PC3. Ensuite, 48h après ensemencement, les cellules sont traitées par différentes concentrations croissantes de médicaments. Les puits servant de contrôle, sont les puits contenant les cellules avec du milieu de culture seulement. 96h après incubation, le milieu est retiré puis les cellules sont fixées par l'ajout de 200µL de TCA (Acide trichloroacétique) 10% préparé avec de l'eau milli-Q. Pour la fixation, les cellules sont incubées avec le TCA, au

moins 4h et à 4°C. Après fixation, le TCA est éliminé, les puits sont lavés trois fois avec de l'eau milli-Q et la plaque est séchée. Par la suite, les cellules sont incubées avec 50µL de SRB (0,4% dans de l'acide acétique 1%) pendant au moins 20 min, à l'abri de la lumière. La plaque est de nouveau lavée, trois fois avec de l'acide acétique 1% puis séchée. Le séchage est suivi de l'ajout de 100µL de Tris base 10mM dans les puits. La plaque est mise sous agitation pendant 5 min. L'absorbance de la SRB est mesurée à 560nm grâce à un lecteur de plaques (Pherastar).

III. Test de combinaison de médicaments

Le principe du test de cytotoxicité cellulaire avec la SRB est utilisé afin de tester une combinaison de médicaments. Les cellules sont ensemencées, au même nombre qu'évoqué précédemment, puis après 48h, une combinaison de deux médicaments est déposée dans la plaque, à différentes concentrations (50µL d'une solution 4X de chaque composé) pour 96h d'incubation. Le premier médicament est déposé de gauche à droite de la plaque et le deuxième produit est déposé de bas en haut de la plaque. Ainsi chaque puit contient un ratio de concentration unique pour la combinaison de médicaments (**Figure 15**).

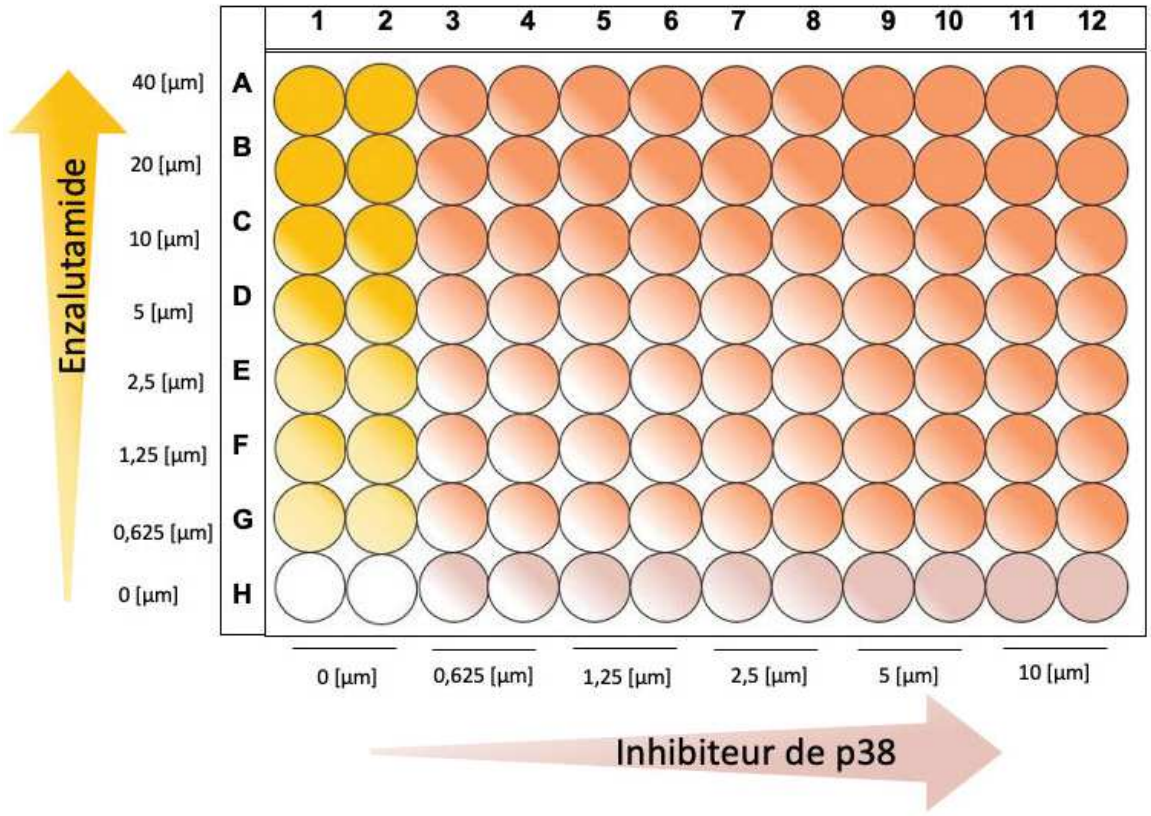


Figure 15 : Principe du test de cytotoxicité cellulaire à la Sulforhodamine B

L'effet synergique ou antagoniste de ces associations médicamenteuses est évalué par une méthodologie développée par le Dr D. Tosi au sein de notre équipe de recherche[356]. Cette analyse de « Matrices de synergie » permet de déterminer si l'effet d'une combinaison de deux médicaments (ou plus) est synergique, indépendant ou antagoniste à l'aide d'un algorithme spécifiquement élaboré. Cette approche a été dérivée de la méthode Lehár[357–359] et utilise l'équation de Bliss afin d'estimer l'effet, en cas d'indépendance, de chaque composé à partir de leurs courbes dose-réponse obtenues individuellement. L'algorithme permet de comparer les matrices en prenant en compte les effets estimés et les effets observés, il est possible d'obtenir

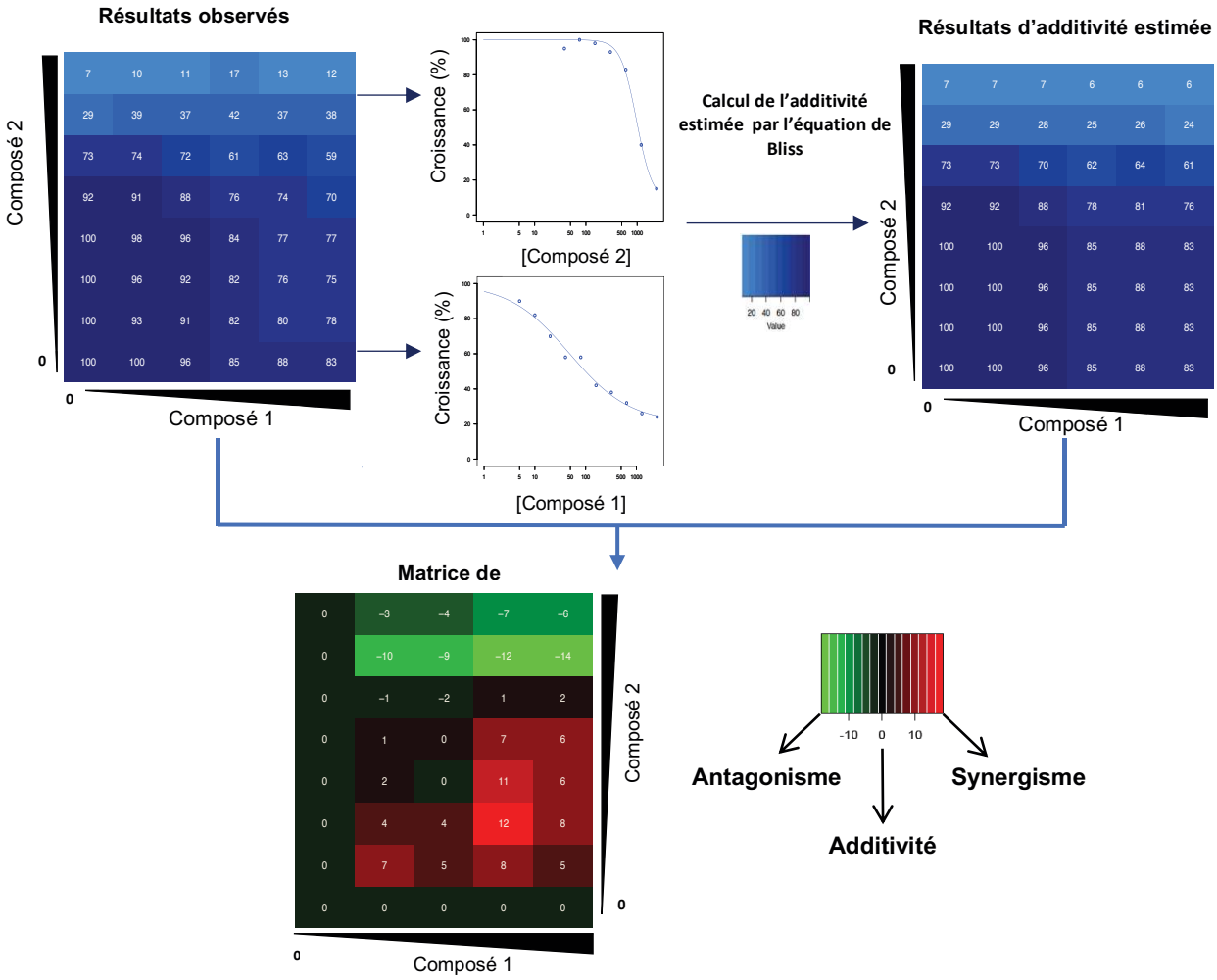


Figure 16 : Traitement des données de cytotoxicité par des « Matrices de synergie »
Détermination de la synergie, de l'indépendance ou de l'antagonisme d'une combinaison de médicaments. Cette analyse est dérivée de la méthode de Lehár pour l'estimation de l'effet en cas de d'indépendance des deux médicaments (matrice rouge) à partir de l'équation de Bliss traitant les données du test à la SRB pour les deux composés utilisés seuls (matrice bleue). La différence entre les deux matrices conduit à délimiter des zones d'antagonisme (vert), d'indépendance (noir) et de synergie (rouge).

une évaluation de l'effet de la combinaison pour chaque point de concentration : effet synergique (différence > 0, couleur rouge) ; effet indépendant (différence nulle, couleur noire) ou effet antagoniste (différence < 0, couleur verte) (**Figure 16**).

IV. Médicaments et inhibiteurs de p38 utilisés

Comme évoqué dans les objectifs, mon travail de thèse vise à améliorer le traitement avec l'Enzalutamide, par son association avec d'autres molécules. Dans le cadre de ce projet, divers composés sont testés afin d'approfondir la compréhension de notre problématique mais aussi afin d'explorer les perspectives thérapeutiques de nos découvertes pour le traitement du CaP (**Tableau 10**) :

Composé	Fonction	Fournisseur
Abiratérone	Anti-androgènes	SelleckChem
Apalutamide	Anti-androgènes	SelleckChem
Enzalutamide	Anti-androgènes	Astellas
Arry-614 (Pexmetinib)	Inhibiteur de p38 : [IC50 p38α]=35nM et [IC50 p38β]=26nM[360] Inhibiteur de Tie-2 : [IC50 Tie-2]=1nM[361,362]	Array Biopharma
Ly2228820 (Ralimetinib)	Inhibiteur de p38 : [IC50 p38α]=5.3nM et [IC50 p38β]=3.2nM[363]	Eli Lilly
SB202190	Inhibiteur de p38 : [IC50 p38α]=50nM et [IC50 p38β]=100nM [364]	Sigma Aldrich

Tableau 10 : Liste des médicaments et des inhibiteurs de p38 utilisés pour les différentes approches expérimentales

V. Extraction protéique

L'extraction protéique est réalisée sur glace (4°C) à partir d'un nombre fixe de cellules pour chaque condition. La lyse cellulaire est réalisée dans un volume de tampon Laemmli 2X (4% *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), 20% Glycérol, 1% 2-β-mercapto-éthanol, 0,004% de bleu de bromophénol, 0,125M Tris HCL) : 1µL de tampon Laemmli 2X pour 10 000 cellules. Après ajout du tampon de lyse, utilisation d'une raclette pour décrocher les cellules du puits. Récupération et transfert du lysat dans un tube eppendorf d'1,5mL suivi d'un dépôt de Benzonase (0,2µL pour 100µL de lysat) afin de lyser l'ADN. Par la suite, le tube est chauffé pendant 5min à 95°C puis mis dans la glace afin de refroidir. Les échantillons sont prêts à être déposés sur gel d'acrylamide.

VI. Western Blot

Le transfert de protéines se fait sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE à 10% composé d'un gel de séparation et d'un gel de concentration dont voici la composition (**Tableau 11**) :

Produits	Gel de séparation (10%)	Gel de concentration (5%)
H20	4.8 mL	3.6 mL
Acrylamide 40%	2.5 mL	630 µL
Tris 1M	2.5 mL (pH 8.8)	625 µL (pH 6.8)
SDS	100 µL	50 µL
APS	100 µL	50 µL
Temed	8 µL	5µL

Tableau 11 : Composition des gels de séparation et de concentration

La migration est réalisée dans des cuves BioRad dans du tampon de migration (200mL de Tampon Tris-Glycine SDS 10X, 800 ml H20) et à voltage constant (80 Volts) jusqu'à formation et séparation des bandes de migration de l'échelle de poids moléculaire. Par la suite le voltage est augmenté jusqu'à 120 volts jusqu'à la fin de la migration. Le transfert des protéines sur membranes de Nitrocellulose est réalisée par le kit de transfert « Trans-Blot Turbo Transfer System » de BioRad en suivant les recommandations du constructeur. À la fin du transfert, la membrane de Nitrocellulose est incubée avec du Rouge Ponceau, afin de vérifier la qualité et l'homogénéité du transfert (5 min sous agitation). La membrane est ensuite rincée dans du PBS Tween 0.1%, jusqu'à dissipation de la coloration, avant d'être incubée 1h à température ambiante, sous agitation, dans du Lait 5% + PBS Tween 0.1%. L'anticorps primaire est ensuite ajouté à la concentration recommandée par le fournisseur puis la membrane est incubée à 4°C, sous agitation, toute la nuit. Les anticorps utilisés sont détaillés ci-après (**Tableau 12**) :

Anticorps Primaires	Espèce	Poids Moléculaire (kDa)	Fournisseur	Référence	Dilution
Récepteur des Androgènes	Lapin	110	Cell signaling Technology	D6F11	1:2000e
RA-V7	Lapin	80	Abcam	Ab198394	1:1000e
p38 (α) MAPK Kinase	Souris	40	Cell signaling Technology	L53F8	1:1000e
Phospho-p38 MAPK Kinase	Lapin	43	Cell signaling Technology	D3F9	1:1000e
GAPDH	Lapin	37	Cell signaling Technology	14C10	1:1000e
β-Tubulin	Souris	55	Sigma-Aldrich	T4026	1:5000e

Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés pour le Western Blot

Le lendemain de l'incubation avec l'anticorps primaire, la membrane est lavée trois fois pendant 5 min avec du tampon PBS Tween 0.1% puis elle est incubée avec du lait 5% PBS Tween 0.1% contenant l'anticorps secondaire (anti-lapin ou anti-souris couplés à la peroxydase HRP) dilué au 1:5000e pendant 45 min minimum, à température ambiante, sous agitation. Par la suite, les membranes sont de nouveau rincées trois fois avec du tampon PBS Tween 0.1% pendant 5 min. À la fin des lavages, la révélation des membranes se fait avec le révélateur ECL (*Enhanced ChimiLuminescent*) d'Ozyme : Revelblot Plus ou RevelBlot intense. La membrane est déposée puis révélée grâce à la machine GBox (Syngene). Le temps d'exposition est dépendant de l'intensité des bandes d'intérêt.

VII. Analyse par phosphoprotéomique (PamGene Assay)

L'appareil « PamStation », produit par PamGene, est une plate-forme de profilage permettant de mesurer l'activité des kinases en temps réel[365,366]. L'évaluation de l'activité des kinases est réalisée grâce aux puces de la machine. Chaque puce contient 4 puits, tapissé par 144 peptides, immobilisés sur une membrane céramique poreuse. Les séquences peptidiques (de 13 acides aminés de long) contiennent des sites de phosphorylation (pour les tyrosines kinases et les sérine-thréonines kinases) et peuvent être phosphorylés par une ou plusieurs kinases en amont. La détection de la phosphorylation se fait par des anticorps phospho-spécifiques, marqués par fluorescence. La PamStation permet de réaliser trois analyses indépendantes simultanément (**Figure 17**).

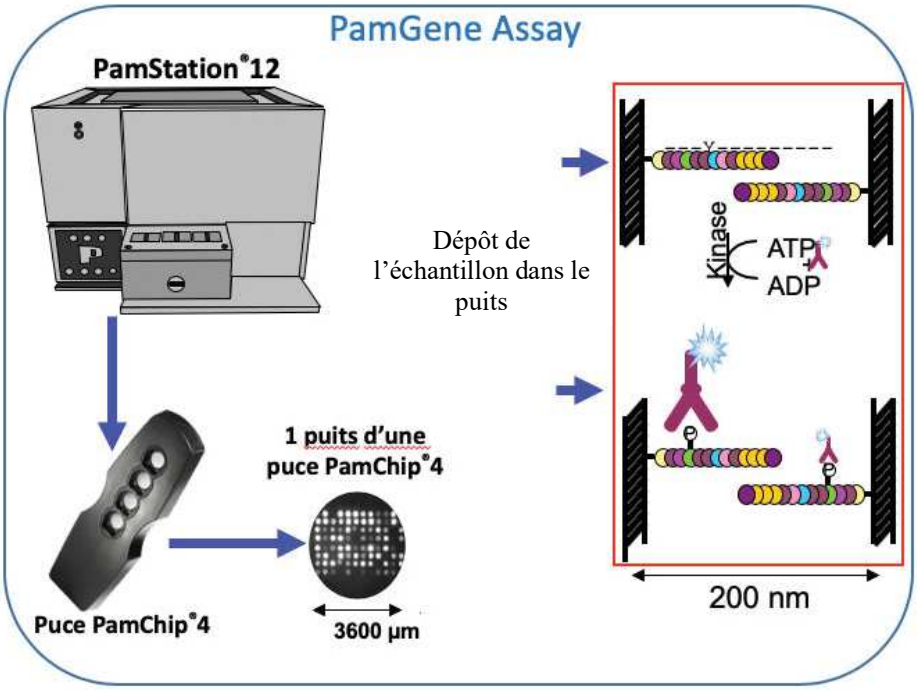


Figure 17 : Schéma de l'analyse phosphoprotéomique par PamStation
ATP : Adénosine Tri-Phosphate. ADP : Adénosine Di-Phosphate

Des cellules LNCaP sont ensemencées dans une plaque 6 puits (2.10^5 cellules par puits). Le lendemain, les cellules sont traitées avec 50µM d'Enzalutamide pendant 24h. Par la suite, les cellules sont préparées selon les indications du constructeur puis déposés dans les puits de la puce pour analyse par la PamStation. Ainsi les kinases, présentes dans les lysats cellulaires, phosphorylent les substrats peptidiques puis leur activité est détecté à l'aide d'anticorps marqués par fluorescence. Les résultats obtenus sont ensuite traités via le logiciel constructeur « Bionavigator »[367] dans le but de déterminer quelles cibles ont été différentiellement phosphorylées suite au traitement par Enzalutamide.

VIII. Caractérisation de l'effet des combinaisons de médicaments par Celigo

Le Celigo est un système d'imagerie et d'analyse type cytomètre (Nexcelom Biosciences®). Cet appareil fournit des images du puits entiers pour de l'analyse en champ clair et en fluorescence. Ainsi il est possible d'étudier une population cellulaire donnée directement dans leurs boites de culture avec différentes applications de la machine (**Figure 18**).

A. Estimation du nombre de cellules et de la viabilité cellulaire

Les cellules sont traitées comme évoqué dans les « Tests de combinaisons de médicaments ». Les cellules sont ensemencées selon le protocole de « Test de combinaison de médicament » puis au bout de 96h de traitement, 50µL de milieu est retiré de chaque puits de la plaque afin d'incuber les cellules pendant 20 min à 37°C avec :

- Iodure de Propidium (IP) [1:250e]. C'est un agent intercalant des acides nucléiques et une molécule fluorescente permettant de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire[368].
- Hoechst 33342 [1:250e]. C'est une molécule fluorescente marquant l'ADN grâce à sa perméabilité cellulaire[369].

Après incubation, la plaque est analysée au Celigo par son application « *Cell counting and Viability* », permettant de déterminer le nombre de cellules totales ainsi que le nombre de cellules mortes dans chacun des puits aux différents ratios de concentration de médicaments.

B. Évaluation de la synthèse d'ADN

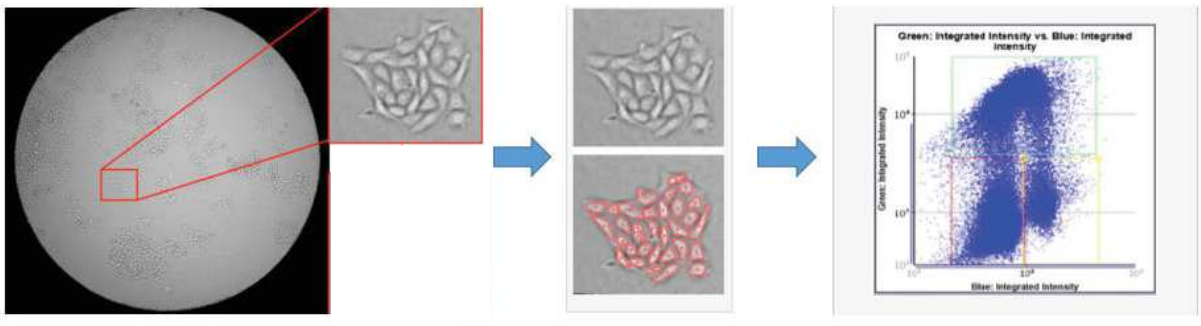


Figure 18 : Principe d'analyse par le système d'imagerie du Celigo.
A. L'appareil permet de scanner l'intégralité du puits avec une illumination constante. **B.** L'analyse des images obtenues permet de faire de la segmentation, de distinguer les cellules. **C.** Le traitement de la segmentation permet de discriminer les populations cellulaires selon divers paramètres morphologiques ou selon les marqueurs utilisés. Le Celigo possède différentes applications permettant d'obtenir des données chiffrées pour un critère particulier.

Les cellules sont traitées comme indiqué dans les « Tests de combinaisons de médicaments ». Avant la fin du temps de traitement de 96h, les cellules sont incubées avec du Hoechst 33342 (1/250e), un marqueur fluorescent bleu du noyau des cellules, et avec du 5-Ethynyl-2′-deoxyuridine (EdU), un marqueur fluorescent vert, analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en division[370]. L'EdU est incubée pendant 16h avant la lecture de la plaque au Celigo avec son application « *DNA synthesis* ». Ce mode d'analyse permet de distinguer, dans chaque puits, le nombre de cellules totales ainsi que le nombre de cellules ayant incorporé l'EdU basé sur la détection du signal émis par l'EdU.

C. Mesure du diamètre et estimation de la viabilité cellulaire des sphéroïdes

Pour la formation de sphéroïdes, un volume de 100 µL contenant une densité de 200 à 500 cellules, est déposé dans chaque puits d'un plaque 96 puits à fond rond et à très faible adhérence (Corning® 7007, Sigma Aldrich). La plaque est incubée durant 3 jours à 37°C, 5% CO2 et 95% d'humidité. Par la suite, les cellules sont traitées avec différentes concentrations de combinaisons de médicaments puis incubées pendant 7 jours.

L'utilisation du logiciel du Celigo et de son application « *Tumorosphere* », nous permet d'évaluer différents paramètres :

- L'évolution du diamètre des sphéroïdes dans les différents puits est observée puis mesuré par observation en champ clair de la plaque de culture au Celigo au cours du temps de traitement (**Figure 19**).

- La mort cellulaire a été évaluée par l'ajout d'IP (1µg/ml en concentration finale) dans chaque puits suivi d'une incubation de la plaque pendant 30 min à 37°C**.** Le logiciel d'analyse du Celigo permet de mesurer l'intensité de l'IP au niveau de chaque sphéroïde conduisant à une estimation de la mortalité cellulaire.

- La viabilité cellulaire est déterminé en suivant les recommandations du fabriquant pour le kit « *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* » (kit G7570 Promega). Après ajout du réactif (CellTiter-Glo® Reagent) directement dans les puits et vérification de la lyse complète du sphéroïde (1 heure d'incubation), la plaque est analysée au Celigo afin de déterminer l'effet global des combinaisons de médicaments sur la viabilité cellulaire (effet cytotoxique ou effet cytostatique).

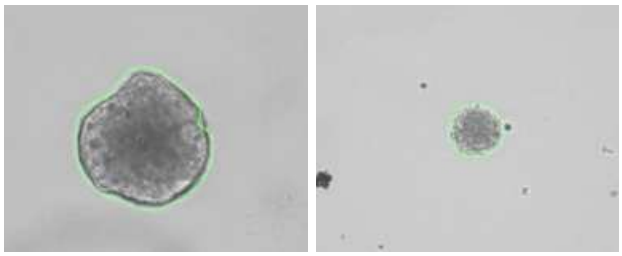


Figure 19 : Segmentation des sphéroïdes par l'application « Tumorosphere » du Celigo

IX. Étude *in vivo* de l'effet de l'effet de la combinaison de médicaments

Xénogreffes : 24 souris mâles NOD/SCID immunodéprimés ont reçu une injection sous-cutanée de cellules LNCaP ($3x10^6$ cellules) contenues dans du matrigel. Les tumeurs sont détectées par palpation et la mesure de leur taille est faite à l'aide d'un pied à coulisse. Dès que le volume tumoral atteint 100 à 200 mm^3, les souris sont traitées avec les médicaments.

Répartition des souris en quatre de groupes de traitement :

- Souris non-traitées (n=6) : gavage 5 fois/semaine ; 100µl/souris/j d'huile de carthame
- Souris traitées avec l'Enzalutamide (n=6) : gavage 5 fois/semaine ; [25 mg/kg/j] ; 100µl/souris/j
- Souris traitées avec l'inhibiteur de p38 - SB202190 (n=6) : Intrapéritonéale, 5 fois/semaine ; [0,05µmol/kg/j] - 100µl/souris/j
- Souris traitées avec « Enzalutamide + SB202190 » (n=6) : gavage 5 fois/semaine ; [25 mg/kg/j] ; 100µl/souris/j + intrapéritonéale, 5×/semaine ; [0,05µmol/kg/j] - 100µl/souris/j

Les tumeurs sont mesurées en 3D, 1 fois par jour et les souris sont pesées. Les traitements sont arrêtés à J13 puis repris à J18. Les souris sont sacrifiées à J22 afin de récupérer les tumeurs (pour inclusion en paraffine d'une moitié et congélation de l'autre).

X. Évaluation de l'effet des médicaments sur l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes

En collaboration avec l'équipe du Dr P. Balaguer, un modèle cellulaire de bioluminescence a été utilisé afin de pouvoir évaluer l'effet des différents traitements sur l'activité transcriptionnelle du RA. Pour cette expérience, la lignée cellulaire choisie est la lignée HELN-AR. C'est une lignée HeLa transfectée avec un plasmide permettant l'expression constitutive d'un gène rapporteur, la Luciférase Firefly, sous le contrôle des Éléments de Réponse aux Œstrogènes (ERE), conférant une résistance à la Néomycine (HeLa-ERE-Luciférase-Néomycine)[371,372]. De plus, les cellules HELN sont transfectées avec un second plasmide induisant l'expression du récepteur des androgènes dont le domaine de liaison à l'ADN a été remplacé par celui du récepteur des estrogènes α (ERα DBD) et attribuant une résistance à la Puromycine. Les cellules sont ensemencées en plaque, à raison de 80 000 cellules par puits, dans 200 µL de milieu DMEM, supplémenté avec 5% de sérum déstéroïdé et 1% d'antibiotique. Afin de suivre l'activité transcriptionnelle du RA, un androgène de synthèse, ligand du RA est ajouté : le R1881 (Méthyltrienolone)[373]. Ainsi la liaison du R1881 conduit à la stimulation de l'activité génomique du RA qui va se fixer au niveau des ERE, conduisant à l'expression de la Luciférase, dont la mesure de la luminescence sera représentative de l'activité transcriptionnelle. Avant la lecture de la plaque pour la mesure de la Luciférase, les cellules sont incubées avec les différents médicaments (anti-androgènes et/ou inhibiteurs de p38) durant 16h à 24h. Les données obtenues sont traitées afin de pouvoir comparer une courbe de valeurs mesurées avec une courbe de valeurs théoriques / calculées. La courbe « théorique » correspond à la comparaison de l'effet de chaque composé utilisé individuellement (E^A et E^B) par rapport à l'effet de la combinaison des deux médicaments (E^{AB}) selon l'équation de Bliss : Ea + Eb – (Eab)[374]. *E^A : Effet du médicament A / E^B : Effet du médicament b / E^{AB} : effet de la combinaison de médicaments A et B.*

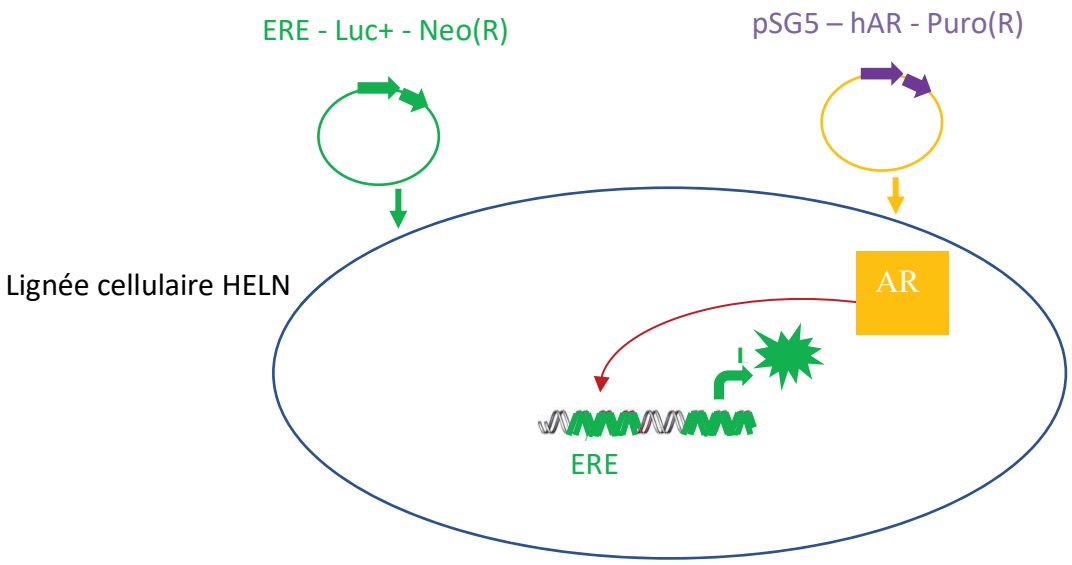


Figure 20 : Schéma du modèle cellulaire de bioluminescence pour le suivi de l'activité transcriptionnelle du RA

ERα-Luc+-Neo: Plasmide codant l'expression de la luciférase sous le contrôle des éléments de réponse aux œstrogènes et conférant une résistance à la Néomycine / pSG5-hAR-Puro(R) : vecteur psG5 permettant l'expression du récepteur des androgènes humain (dont le domaine de liaison à l'ADN est modifié) et contenant un gène de sélection conférant une résistance à la puromycine.

Neo : Néomycine. hAR : Récepteur aux Androgènes humain. Puro : Puromycine. L : Luciférase. AR : Récepteur des Androgènes. ERE : Éléments de Réponse aux Œstrogènes.

Résultats

Résultats

I. La MAPK p38 est activée par l'Enzalutamide

L'émergence d'une résistance à une thérapie est le résultat de l'implication de multiples voies de signalisation cellulaire, dans un processus d'adaptation des cellules tumorales[375]. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules du CaP vont activer des voies de signalisation spécifiques en réponse à un traitement avec de l'Enzalutamide. Afin de vérifier cette hypothèse et d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques, nous avons réalisé une analyse phosphoprotéomique par PamGene Assay.

Des cellules de la lignée LNCaP ont été traitées avec [50µM] d'Enzalutamide pendant 24h. À la fin du temps d'incubation, les cellules sont lysées et analysées par la PamStation afin de déterminer les kinases activées par le traitement avec de l'Enzalutamide (**Figure 21.A**). Les résultats de trois expériences, réalisées indépendamment, ont conduit à l'identification de 34 protéines kinases (**Annexe 1**) présentant une augmentation de leur activité enzymatique. Parmi elles, sept protéines (p706S6k, RAF1, PKACa, ZC4, ZC1, p38γ et PRKX) ont une stimulation de leur activité kinase avec un indice de confiance élevé ($p<0.05$) et 27 autres ont une variation de leur activation, avec un indice de confiance plus faible ($p>0.05$). Pour toutes les protéines, cette augmentation de leur activité enzymatique est, au moins, deux fois plus importante avec le traitement avec l'Enzalutamide comparée aux cellules non traitées. Dans cet ensemble de protéines, les quatre isoformes de la MAPK p38 présentent une stimulation de leur activité par le traitement avec l'Enzalutamide.

À la suite de cette analyse phosphoprotéomique, nous avons confirmé ces observations par Western Blot (**Figure 21.B**). Deux lignées, LNCaP et 22Rv1, ont été traitées avec [35µM] d'Enzalutamide pendant 24h. Les observations confirment les résultats de l'analyse par PamGene Assay : l'Enzalutamide induit une plus forte augmentation de la phosphorylation de la MAPK p38 comparée à la condition non traitée. Cette stimulation de la phosphorylation de p38 est observable dans les deux lignées du CaP. De plus, la lignée LNCaP a aussi été traitée avec l'Abiratérone, un autre anti-androgène de seconde génération comme l'Enzalutamide, ([10µM] pendant 24h) (**Figure 21.B**). Ces résultats indiquent qu'une autre molécule, l'Abiratérone, active aussi fortement la MAPK p38.

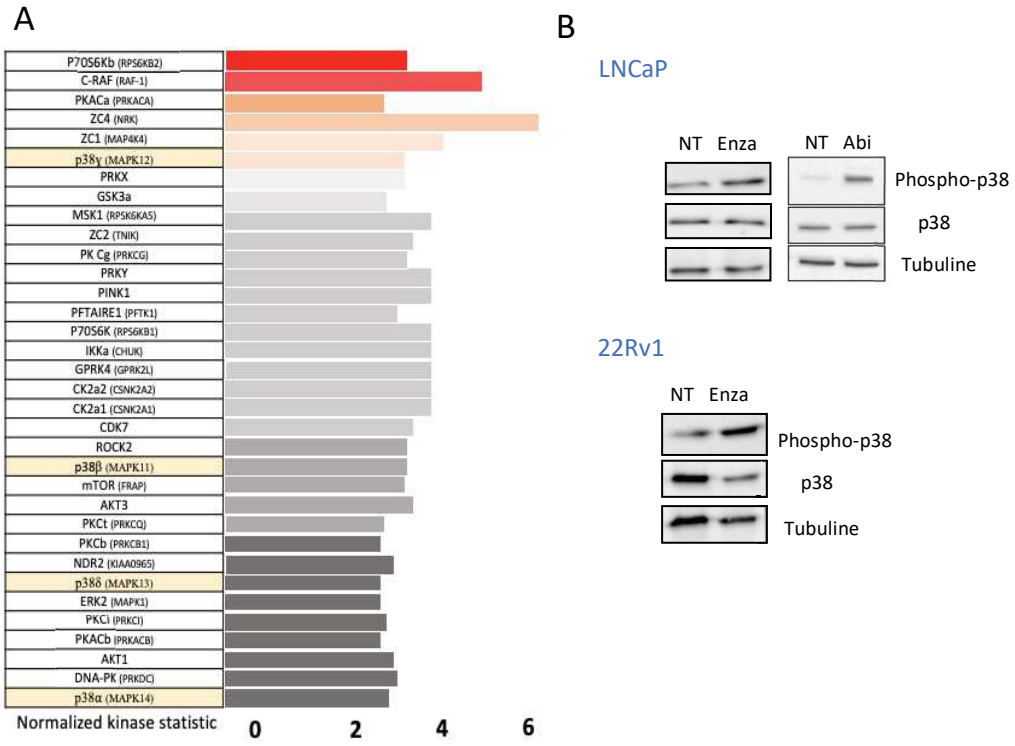


Figure 21 : Activation de la MAPK p38 par le traitement à l'Enzalutamide et à l'Abiratérone

A. Liste des sérine/thréonine kinases identifiées par lors du PamGene Assay **B.** Évaluation de la phosphorylation de la MAPK p38 par Western Blot. *NT : Non traité. Enza : Enzalutamide. Abi : Abiratérone*

Par ailleurs, d'autres voies de signalisation peuvent être impliquées dans l'activation indépendante des androgènes du RA[376–378]. Ainsi, nous avons évalué, l'activation des voies AKT et ERK, dans deux lignées, LNCaP et 22Rv1, après un traitement de 24h avec [35µM] d'Enzalutamide (**Figure 22**). Les résultats montrent que l'Enzalutamide n'induit aucune variation de l'état de phosphorylation des protéines AKT et ERK.

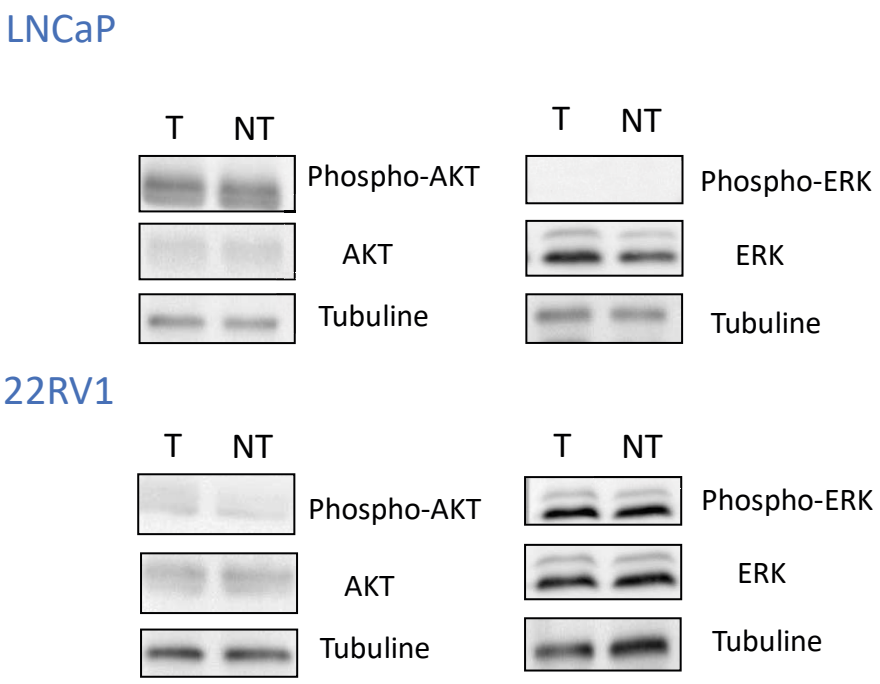


Figure 22 : Détermination des voies de signalisation activées par l'Enzalutamide par Western Blot

Le traitement avec de l'Enzalutamide n'active pas les voies de signalisation AKT et ERK. *T : Traité avec [35µM] d'Enzalutamide durant 24h. NT : Non traité*

L'ensemble de nos résultats montre que le traitement avec de l'Enzalutamide ou de l'Abiratérone, conduit à une activation spécifique de la MAPK p38 en réponse à ces traitements. Or il est à rappeler que d'autres études ont déjà mis en avant l'activation de la voie de signalisation de la MAPK p38 en réponse à d'autres traitements avec de l'acide zolédronique ou avec du Docétaxel dans les cellules du CaP[333,334]. En effet, la stimulation de cette protéine kinase conduit à l'émergence de la résistance à ces composés ainsi qu'à l'acquisition d'un phénotype invasif pour ces cellules cancéreuses.

II. Test de la combinaison de médicaments sur des lignées du CaP

A. La combinaison de traitements Enzalutamide et inhibiteur de p38 a un effet synergique sur les lignées de CaP en 2D

Du fait de l'activation de la MAPK p38 lors de l'utilisation d'Enzalutamide, des inhibiteurs de p38 ont été testés afin de déterminer l'effet de leur utilisation sur des cellules du CaP. Dans ce but, des lignées 22Rv1 et LNCaP ont été traitées avec une combinaison d'un inhibiteur de la MAPK p38, SB202190, utilisé seul ou en association avec l'Enzalutamide. Les résultats ont été traités sous forme de matrice de synergie afin d'évaluer l'effet de l'association de ces différents composés. S'il y a un effet antagoniste de la combinaison, la voie de signalisation identifiée est

possiblement impliquée dans l'action de l'Enzalutamide. À l'inverse, s'il y a un effet synergique de l'association de médicament, la MAPK p38 est possiblement associée à la résistance au traitement et donc par son inhibition, cette kinase devient un candidat pour l'élaboration d'une potentielle stratégie thérapeutique. Nous avons donc testé l'effet de l'Enzalutamide seul (7 concentrations différentes), de l'inhibiteur de p38 seul (5 concentrations différentes) et de la combinaison des deux médicaments dans deux lignées de CaP : LNCaP et 22RV1 (**Figure 23**). La première combinaison testée est l'association de l'Enzalutamide avec l'inhibiteur de p38, SB202190[364] (**Figure 23.A**). La matrice de synergie (matrice rouge) indique que l'association des deux médicaments a un effet synergique dans les deux lignées de CaP. Cette synergie est corrélée avec une diminution de la survie cellulaire (matrice bleue) au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration des médicaments. Cette combinaison démontre qu'inhiber la MAPK p38 améliore l'effet du traitement avec l'Enzalutamide. Suite à ce résultat et du fait que l'inhibiteur de p38, SB202190, n'est pas utilisé en clinique, nous avons testé l'association de l'Enzalutamide avec deux inhibiteurs de p38, utilisés dans des essais cliniques : LY2228820 (Ralimetinib)[292,363] (**Figure 23.B**) et ARRY-614 (Pexmetinib)[274,360] (**Figure 23.C**). Les matrices de synergie montrent que l'association de l'Enzalutamide avec les différents inhibiteurs de p38 est synergique à faibles doses. La zone de synergie est plus importante pour la lignée 22Rv1 comparée à la lignée LNCaP. Cependant, la lignée LNCaP possède une sensibilité plus importante, car comme indiqué sur la matrice bleue, la population cellulaire diminue dès les premières doses de combinaison de médicaments. Ainsi, en termes d'effet synergique, la combinaison « Enzalutamide + SB202190 » semble être la meilleure : la zone de synergie est la plus étendue dans les cellules LNCaP et les valeurs de l'effet sont plus fortes pour la lignée 22Rv1. Cependant, bien que les associations « Enzalutamide + LY228820/ARRY-614 » soient moins synergique et présentent même des points d'antagonismes pour les deux lignées de CaP, ces deux combinaisons présentent un effet plus important sur la viabilité cellulaire. Dans la lignée LNCaP, la combinaison « Enzalutamide + LY2228820 » induit la réduction la plus importante à la plus forte concentration des médicaments : il ne reste que 5% de cellules vivantes (22% avec SB202190 et 18% avec ARRY-614). Le même effet est visible pour la lignée 22Rv1 où cette combinaison ne laisse que 7% de cellules vivantes à la plus haute concentration des composés (12% avec SB202190 et 19% avec ARRY-614). Dans l'objectif d'améliorer le traitement utilisant l'Enzalutamide, avoir une combinaison ne présentant pas d'antagonisme est important pour l'effet thérapeutique, cependant la synergie n'est pas l'unique critère à prendre en compte, dans la mesure où

l'association de médicaments peut avoir un effet antitumoral, en dépit d'une faible synergie, comme c'est le cas pour la combinaison « Enzalutamide + LY2228820 ».

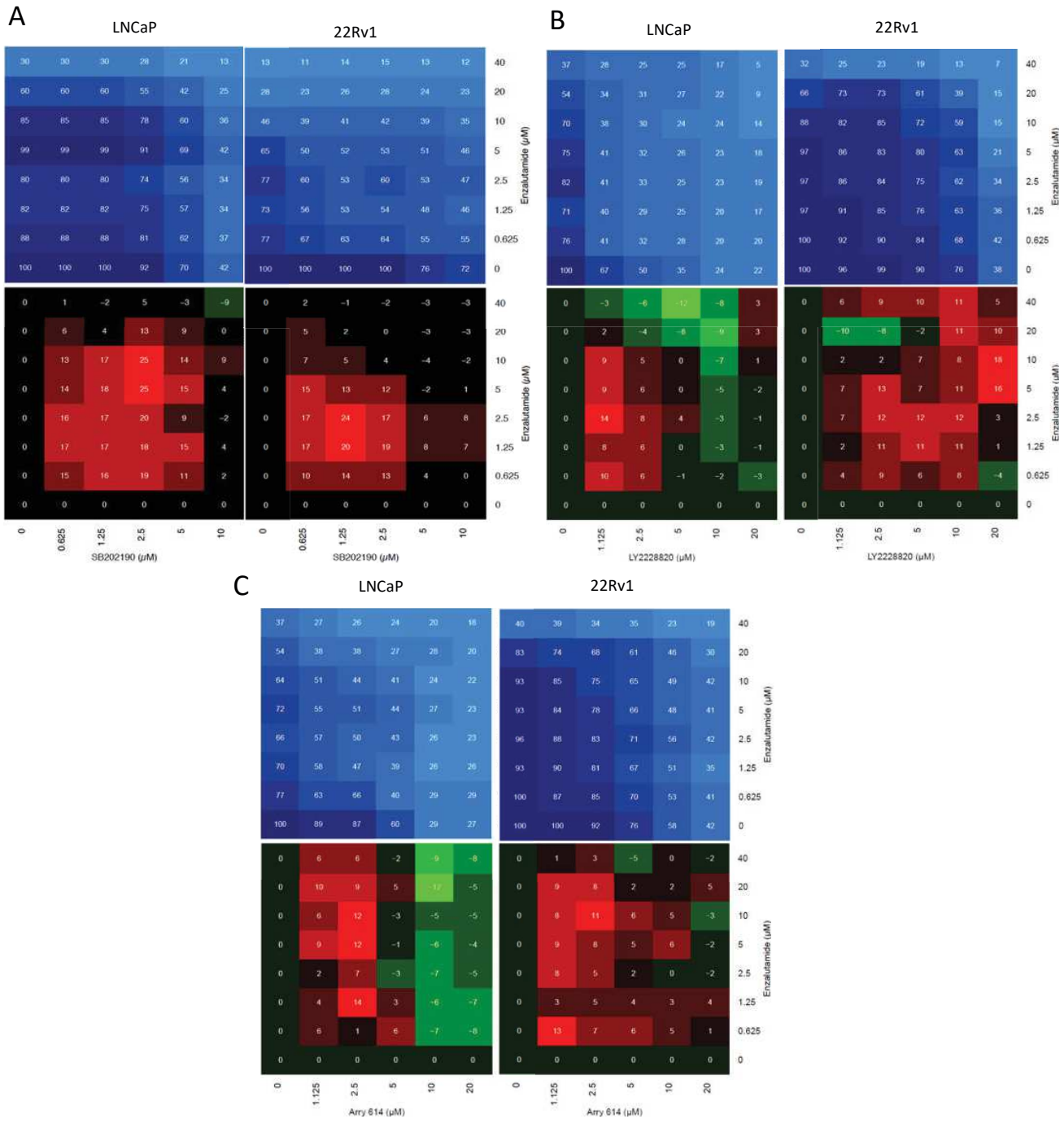


Figure 23 : Matrices de synergie montrant l'effet synergique de la combinaison de médicaments : Enzalutamide + Inhibiteur de p38 dans des lignées de CaP

A. Test de cytotoxicité Enzalutamide + SB202190. **B.** Test de cytotoxicité Enzalutamide + LY2228820. **C.** Test de cytotoxicité Enzalutamide + Arry-614. *La cytotoxicité est évaluée par la sulforhodamine B*

Suite à la mise en évidence de l'activation de la MAPK p38 par l'Abiratérone, nous avons testé les effets de l'association de cet anti-androgène avec l'inhibiteur de p38, SB202190, dans les lignées LNCaP et 22Rv1. Cette combinaison démontre un effet synergique associé à une

réduction de la viabilité cellulaire, en fonction de l'augmentation de la concentration de médicaments. Les résultats de cette expérience suggèrent que l'association d'un inhibiteur de p38 avec l'Abiratérone pourrait constituer une piste thérapeutique supplémentaire à développer (**Figure 24**).

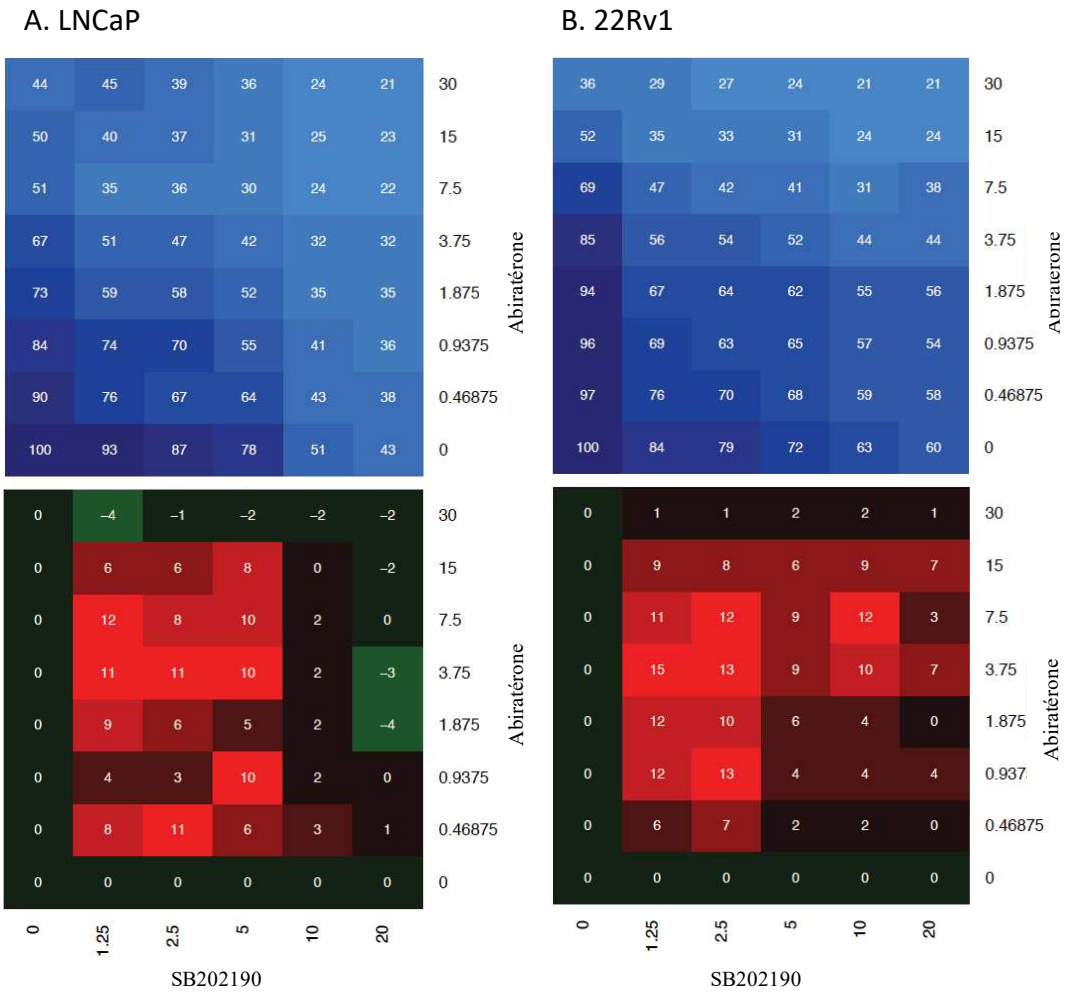


Figure 24 : Matrices de synergie montrant l'effet synergique de la combinaison de médicaments : Abiratérone + SB202190 dans des lignées de CaP
A. Test de cytotoxicité Abiratérone + SB202190 dans la lignée LNCaP. **B.** Test de cytotoxicité Abiratérone + SB202190 dans la lignée 22Rv1. *La cytotoxicité est évaluée par la sulforhodamine B*

Nos précédentes expériences ont été réalisées avec des lignées du CaP exprimant le RA. Il est à rappeler que ce récepteur, cible de l'Enzalutamide, possède un rôle majeur dans la promotion du développement tumoral. Cependant certaines cellules cancéreuses peuvent proliférer, indépendamment de la présence du RA. Ainsi nous avons testé la combinaison « Enzalutamide + SB202190 », sur les lignées cellulaires DU145 et PC3, qui n'expriment pas le RA, afin de déterminer l'effet de nos traitements (**Figure 25**). Les matrices de synergie montrent un effet antagoniste de cette combinaison dans les deux lignées de CaP. L'antagonisme est associé avec une faible réduction de la population cellulaire, sauf aux fortes concentrations de la

combinaison de médicaments. Ces résultats tendent à considérer la nécessité d'avoir l'expression du RA pour obtenir un potentiel effet thérapeutique de la combinaison de médicaments.

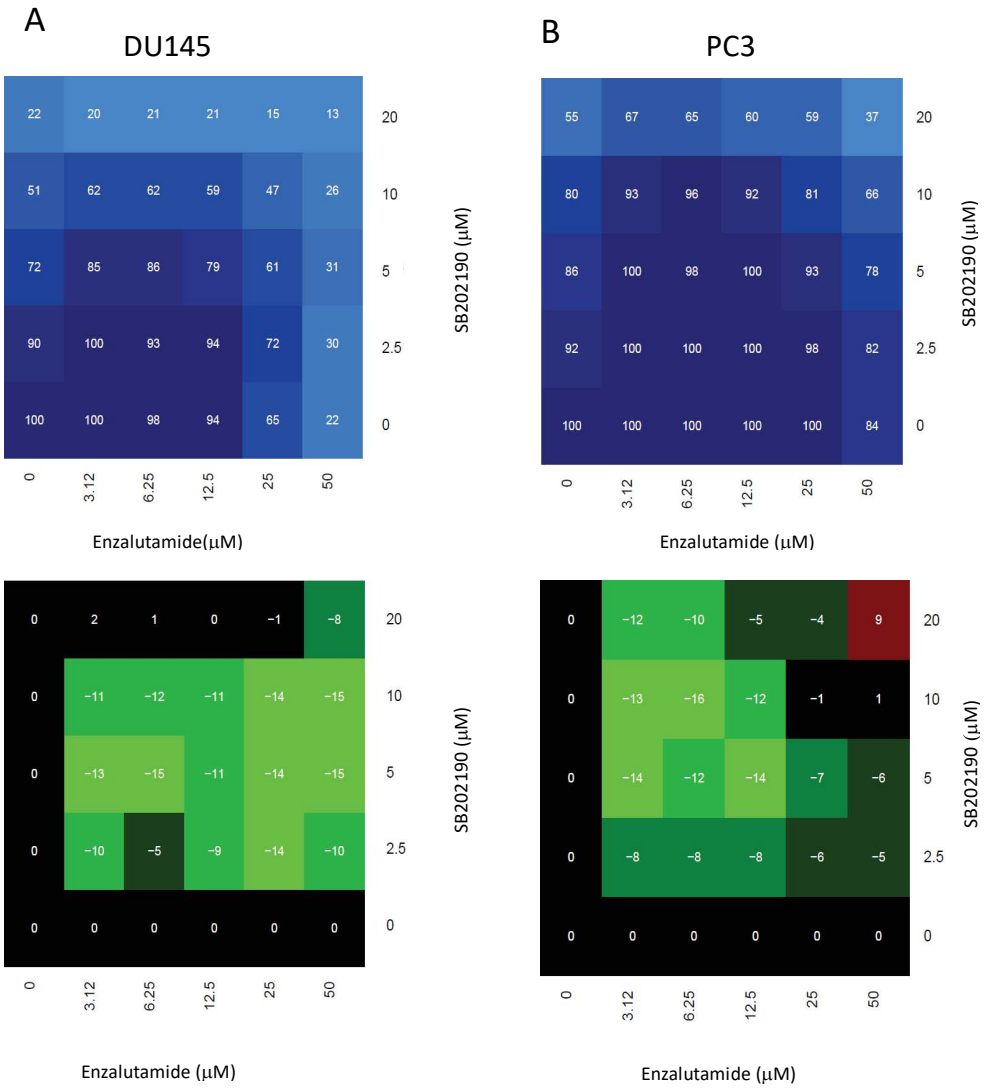


Figure 25 : Matrices de synergie de la combinaison de médicaments : Enzalutamide + SB202190 dans des lignées de CaP

A. Test de cytotoxicité Enzalutamide + SB202190 dans la lignée DU145. **B.** Test de cytotoxicité Enzalutamide + LY2228820 dans la lignée PC3. *Les cellules sont ensemencées dans une plaque 96 puits. Les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes d'Enzalutamide (0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 µM) et/ou d'inhibiteur de p38 (0, 2.5, 5, 10, 20 µM). La cytotoxicité est évaluée par la sulforhodamine B*

Par ailleurs, nos précédentes expériences sont réalisées dans des milieux de culture avec une concentration inconnue d'androgènes. Or l'activité du RA est dépendante de la quantité d'androgènes disponible dans l'environnement cellulaire[379]. En effet, une concentration en androgènes de [0.01-0.1nM][380–382] peut suffire à stimuler la croissance tumorale, tandis qu'une concentration d'androgènes de [1-100nM] peut inhiber la prolifération des cellules. De ce fait, l'influence de la concentration d'androgènes sur l'effet de la combinaison « Enzalutamide + SB202190 » a été évalué (**Figure 26**). Pour cette expérience, des cellules 22Rv1 ont été

cultivées avec différents milieux : un milieu RPMI, appauvri en androgènes par l'utilisation de DCC (*Dextran Coated Charcoal*) 5% (**Figure 26.A**), un milieu RMPI + DCC 5% avec du R1881 (ligand de synthèse du RA) (**Figure 26.B**) et un milieu RPMI contenant 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) correspondant à un milieu riche. Les résultats montrent que le traitement « Enzalutamide + SB202190 » a un effet synergique significatif quand la concentration d'androgènes augmente (**Figure 26.B** et **26.C**). En effet, une zone de synergie plus étendue, avec des valeurs plus importantes, est visible aux faibles concentrations.

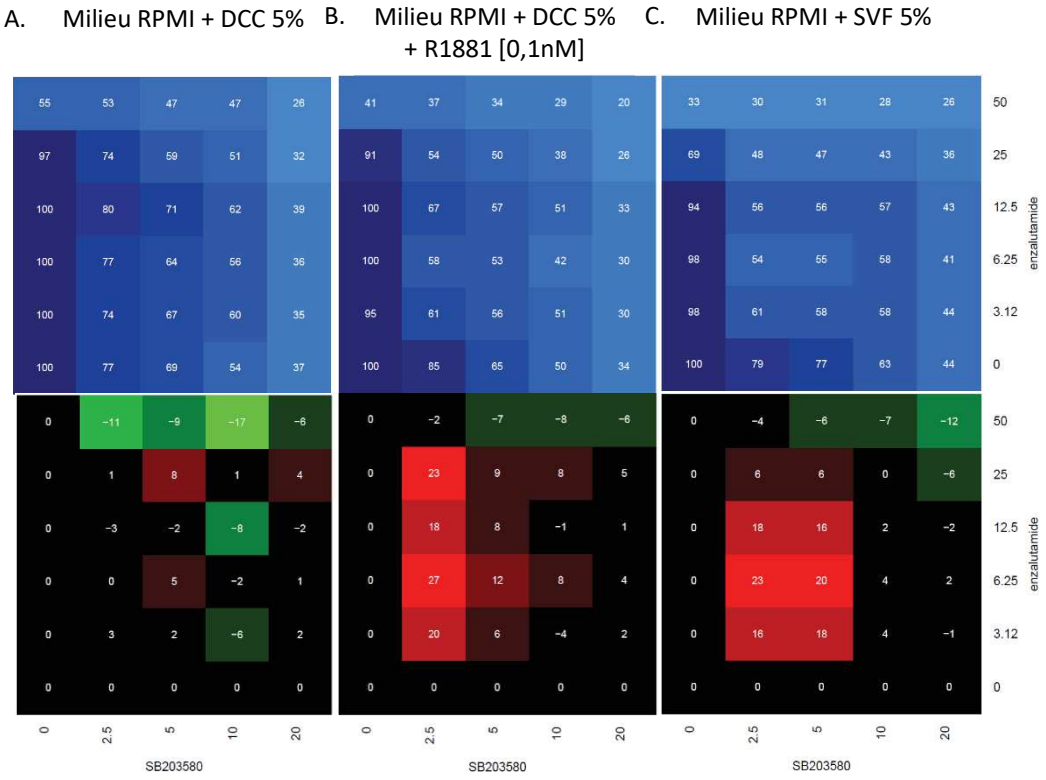


Figure 26 : Matrices de synergie de la combinaison Enzalutamide + SB202190 dans la lignée 22Rv1
Différentes conditions sont testées afin de voir l'influence de la stimulation androgénique sur l'effet de nos traitements. **A.** Incubation des cellules avec un milieu complémenté par 5% de sérum déstéroïdé (DCC : *Dextran Coated Charcoal*). **B.** Milieu complémenté par 5% de sérum déstéroïdé contenant 0.1 nM de R1881, ligand synthétique du RA. **C.** Milieu complémenté avec du Sérum de Veau Fœtal (SVF). *La cytotoxicité est évaluée par un test à la sulforhodamine B*

De plus, nous avons aussi testé la combinaison « Abiratérone + SB202190 » dans les lignées LNCaP et 22Rv1 (**Figure 27**). L'Abiratérone est un anti-androgènes ayant une cible différente de l'Enzalutamide, car elle inhibe la synthèse des androgènes. Les données indiquent que cette combinaison a une meilleure synergie comparée à la combinaison « Enzalutamide + SB202190 ». L'effet synergique s'étend à presque toutes les concentrations dans la lignée LNCaP, tandis que seulement les plus fortes concentrations de médicaments ([7,5µM] d'Abiratérone minimum) provoquent de la synergie dans la lignée 22Rv1. Il est à noter que l'effet synergique de la combinaison « Abiratérone + SB202190 » est meilleure que la

combinaison « Enzalutamide + SB202190 », en particulier dans la condition « RPMI+DCC ». Nous supposons que l'utilisation de l'Abiratérone, ciblant la synthèse d'androgènes, conduit à empêcher la stimulation autocrine des cellules du CaP.

Ainsi, l'ensemble de ces expériences indique qu'il y a bien une influence de la quantité d'androgènes dans le milieu sur l'effet synergique de nos associations de traitements : la taille de la zone de synergie et les valeurs associées sont meilleurs avec l'augmentation de la concentration d'androgènes. Cependant à de plus faibles concentrations d'androgènes, un effet synergique est visible notamment avec l'utilisation d'Abiratérone.

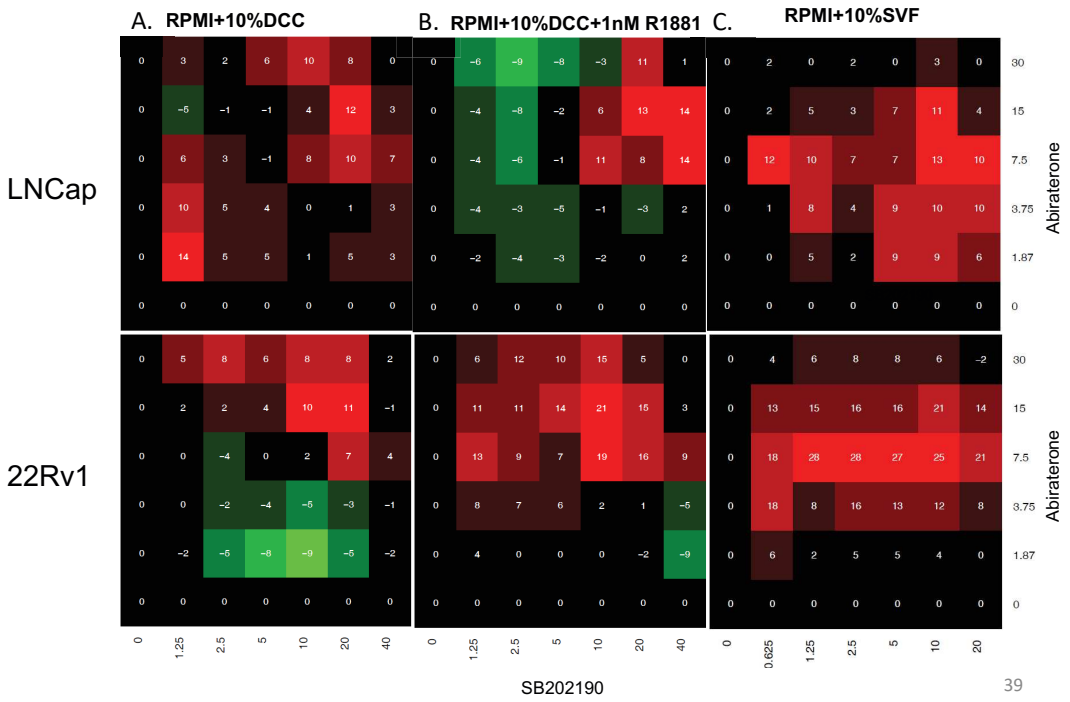


Figure 27 : Matrices de synergie pour évaluer l'effet de la combinaison « Abiratérone + SB202190 » sur des lignées LNCaP et 22Rv1

Différentes conditions sont testées afin de voir l'influence de la stimulation androgénique sur l'effet de nos traitements. **A.** Incubation des cellules avec un milieu complémenté par 10% de sérum déstéroïdé (DCC). **B.** Milieu complémenté par 10% de sérum déstéroïdé (DCC : *Dextran Coated Charcoal*) contenant 1 nM de R1881, ligand de synthèse du RA. **C.** Milieu complémenté avec du Sérum de Veau Fœtal (SVF). *La cytotoxicité est évaluée par un test à la sulforhodamine B*

B. La combinaison de médicaments Enzalutamide + inhibiteur de p38 a un effet synergique sur les lignées de CaP en 3D

À la suite des tests de cytotoxicité réalisés en 2D, nous avons poursuivi la caractérisation de l'effet de nos combinaisons de médicaments sur des sphéroïdes. Grâce à la culture en 3D et à la formation de sphéroïdes, les conditions d'études sont proches de celles observées *in vivo* sur

des modèles de xénogreffes (par exemple par l'établissement d'un gradient d'oxygène et de nutriment…)[383]. Ainsi, nous avons testé trois lignées de CaP : LNCaP, 22Rv1 et VCaP. La lignée VCaP a été incluse dans nos expériences car comparée aux deux autres lignées, elle possède un RA naturel (exempt de mutations)[186,187,344]. Après ensemencement, les cellules sont traitées avec les différents médicaments seuls ou en combinaison au 3e jour. Au bout de 7 jours d'incubation, la plaque est analysée au Celigo pour une capture d'image en fond clair afin d'évaluer l'effet des traitements sur le diamètre des sphéroïdes (**Figure 28**). Les résultats montrent qu'il y a une réduction de la taille des sphéroïdes avec l'augmentation de la concentration des combinaisons « Enzalutamide + inhibiteur de p38 » comparée à la condition non traitée de chaque plaque. Cette diminution de la taille des sphéroïdes avec les différentes combinaisons est aussi visible pour la lignée 22Rv1 (**Annexe 1**).

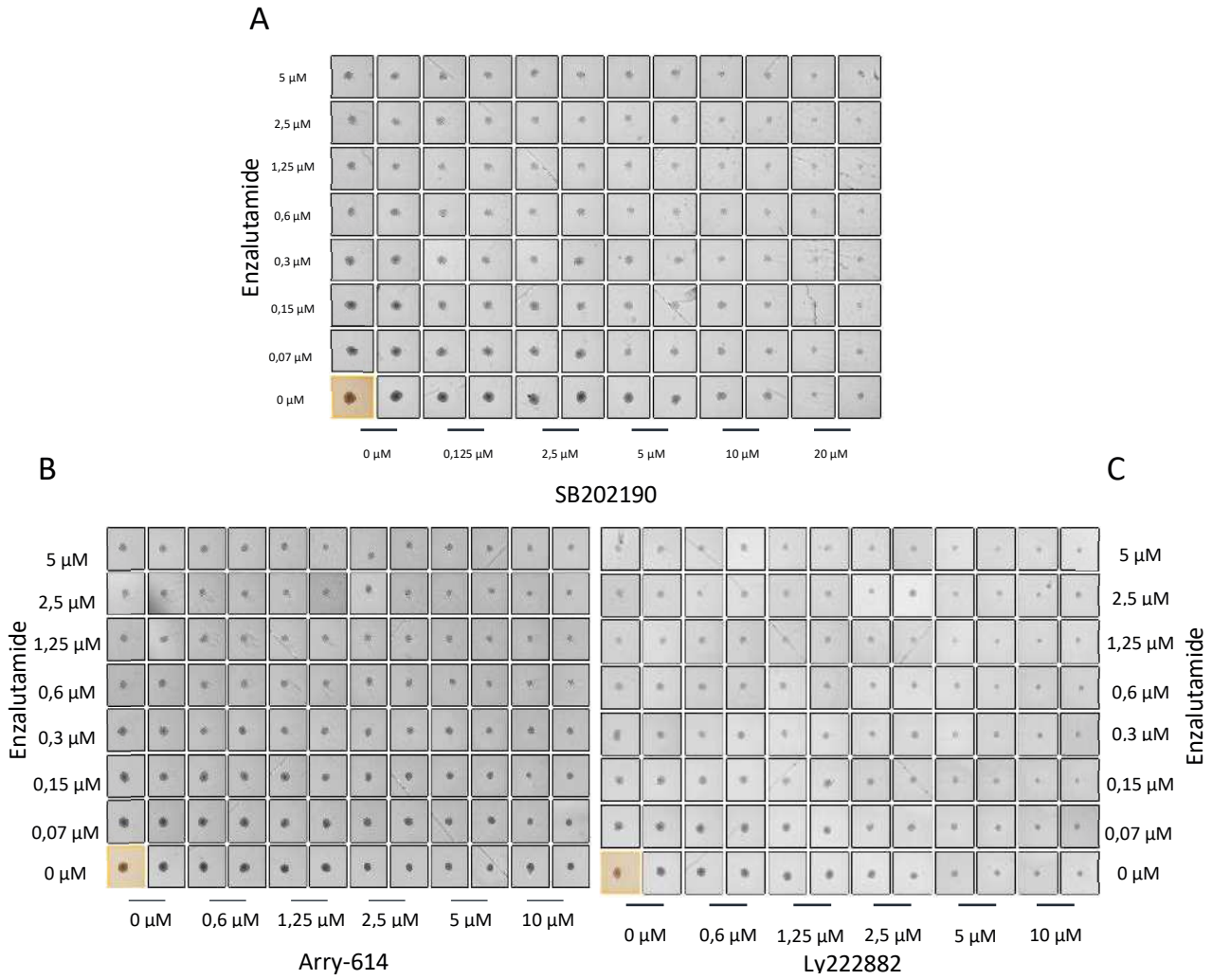


Figure 28 : Diminution du diamètre des sphéroïdes par la combinaison de traitement Enzalutamide et inhibiteurs de p38 pour la lignée LNCaP

A. Traitement de la lignée LNCaP avec la combinaison Enzalutamide + SB202190. **B.** Traitement de la lignée LNCaP avec la combinaison Enzalutamide + Arry-614. **C.** Traitement de la lignée LNCaP avec la combinaison Enzalutamide + Ly228820. *Capture d'image des puits des plaques 96 puits, observés en champ clair par Celigo*

Par la suite, l'effet de la viabilité cellulaire a été déterminé par un kit CellTiter-Glo (Promega), permettant de d'évaluer le nombre de cellules viables dans chaque puits, à partir de la quantification de l'ATP, en tant qu'indicateur des cellules métaboliquement actives. Les données du test de viabilité cellulaire ont été traitées sous forme de matrices de synergie (**Figure 29**). Dans toutes les lignées cellulaires, il y a un effet synergique de la combinaison « Enzalutamide + SB202190 » (**Figure 29.A**). Le traitement induit une réduction du diamètre des sphéroïdes dans la lignée LNCaP. Cette observation est corrélée avec la diminution du nombre de cellules à mesure de l'augmentation de la concentration des médicaments lors du test de viabilité cellulaire. De plus, il y a une zone de synergie plus étendue qu'avec les autres lignées, cependant celle-ci est plus faible en termes de valeurs. On retrouve un effet similaire pour la lignée VCaP où le traitement conduit à réduire la viabilité des cellules mais les zones de synergie se retrouvent principalement aux plus fortes concentrations pour ces cellules. La lignée 22Rv1 affiche aussi une diminution du diamètre des sphéroïdes lors de l'observation de la plaque en champ clair (données non montrées). Cependant le test de viabilité montre que cette réduction de taille n'est pas associée à une diminution de la viabilité cellulaire car le nombre de cellules ne chute qu'aux fortes concentrations. Les points de concentrations, correspondant à la baisse du nombre de cellules, sont associés à une zone de synergie. Il est à noter que malgré l'effet sur la taille des sphéroïdes, la combinaison « Enzalutamide + SB202190 » n'altère pas la survie de la lignée 22Rv1 sauf à de fortes concentration, comparé à ses effets lors des tests de cytotoxicité en 2D (**Figure 23.A**). La combinaison « Enzalutamide + ARRY-614 » affiche une zone de synergie plus étendue, avec des valeurs plus hautes globalement, pour les différentes lignées cellulaires comparée aux effets obtenus avec le SB202190 (**Figure 29.B**). Les effets sur la viabilité cellulaire des lignées LNCaP et VCaP sont comparables aux résultats de la combinaison avec le SB202190. Cependant il y a une plus forte réduction de la viabilité cellulaire pour la lignée 22Rv1 associée à une synergie suivant l'augmentation de la concentration des médicaments. La combinaison « Enzalutamide + LY2228820 » affiche une zone de synergie plus large que la combinaison « Enzalutamide + SB202190 », mais les valeurs de synergie sont généralement plus faibles qu'avec ARRY-614 (**Figure 29.C**). Sauf pour la lignée 22Rv1 où l'effet de cette association avec LY2228820 montre la plus forte synergie. Pourtant, malgré cet effet de la combinaison de drogue, la viabilité cellulaire diminue moins qu'avec l'inhibiteur ARRY-614, mais reste plus basse qu'avec le SB202190.

L'observation de la variation du diamètre des sphéroïdes (**Figure 28**) ne permettait pas de caractériser les effets de chaque combinaison. Or l'estimation de la viabilité cellulaire avec le CellTiter-Glo, nous permet d'observer l'effet global de nos associations de médicaments. Ainsi la comparaison de l'ensemble des combinaisons montre que les inhibiteurs de p38, ARRY-614 et LY2228820, ont les meilleures synergies, en termes d'étendue et de valeurs, dans toutes les lignées du CaP. Cependant, en observant les effets pour chaque lignée, nous constatons que dans la lignée LNCaP, la combinaison « Enzalutamide + LY228820 » induit la meilleure réduction de la survie cellulaire malgré une synergie plus faible que les deux autres combinaisons. De plus, la lignée VCaP, bien que sensible aux effets de chaque combinaison, comme en témoigne la synergie et la réduction de la viabilité, conserve le même pourcentage de cellules vivantes sauf à la plus forte concentration de médicaments. Les résultats avec la lignée 22Rv1 diffèrent pour chaque combinaison. Lors de l'association de l'Enzalutamide avec le SB202190, nous avons une diminution de la taille des sphéroïdes, cependant l'estimation de la viabilité cellulaire indique qu'il n'y a pas de réduction du nombre de cellules viables sauf à des fortes concentrations. La combinaison avec LY2228820 conduit au meilleur effet synergique, cependant la diminution de la viabilité cellulaire est plus faible qu'avec ARRY-614. En effet, ce dernier conduit à une diminution, légèrement plus importante, du nombre de cellules vivantes.

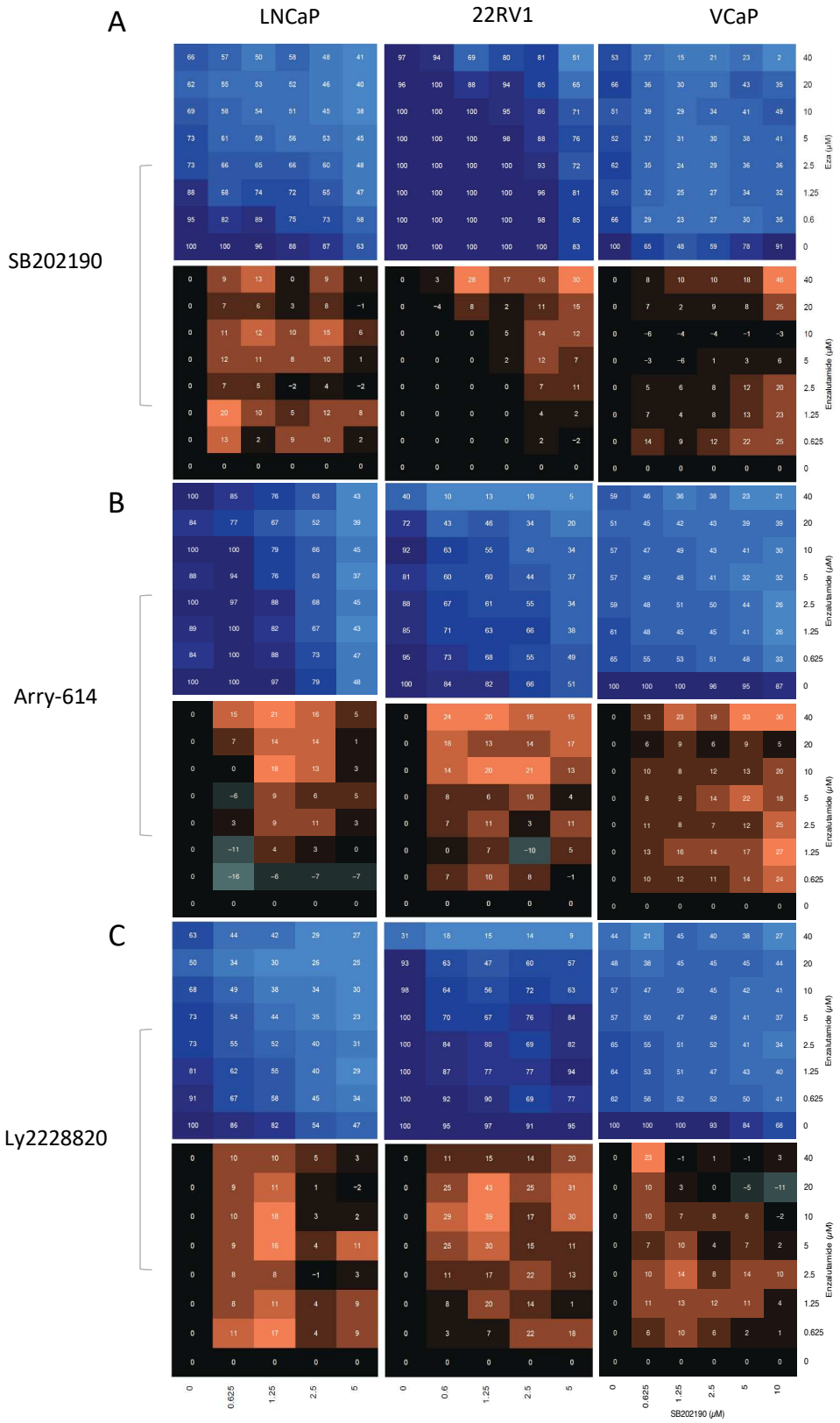


Figure 29 : Effet synergique de la combinaison Enzalutamide + SB202190 sur des sphéroïdes de lignées de CaP
A. Évaluation de la viabilité cellulaire après traitement avec Enzalutamide + 202190. **B.** Évaluation de la viabilité cellulaire après traitement avec Enzalutamide + ARRY-614. **C.** Évaluation de la viabilité cellulaire après traitement avec Enzalutamide + LY228820. *Matrices de synergies obtenues par des tests de viabilité cellulaire avec le CellTiter-Glo*

Les combinaisons de médicaments sont synergiques en 3D, avec des valeurs de synergie plus importantes qu'en 2D. De plus, elles induisent une diminution de la taille des sphéroïdes au fur et à mesure de l'augmentation des concentrations. L'ensemble de nos résultats indiquent que les combinaisons associant l'Enzalutamide à LY228820 ou à ARRY-614 présentent les meilleurs effets dans les différentes lignées (**Tableau 13**).

Lignées Cellulaires	Enzalutamide + SB202190	Enzalutamide + LY2228820	Enzalutamide + ARRY-614
Effet de la combinaison en 2D			
LNCaP	**Synergie +++** Diminution de la viabilité cellulaire + (22% de cellules vivantes à la plus forte concentration)	Synergie + Antagonisme aux concentrations élevées. **Diminution de la viabilité cellulaire +++** (5% de cellules vivantes à la plus forte concentration)	Synergie ++ Antagonisme aux concentrations élevées. Diminution de la viabilité cellulaire + (18% de cellules vivantes à la plus forte concentration)
22Rv1	Synergie ++ Diminution de la viabilité cellulaire + (12% de cellules vivantes à la plus forte concentration)	**Synergie +++ Diminution viabilité cellulaire +++** (7% de cellules vivantes à la plus forte concentration)	Synergie ++ Diminution de la viabilité cellulaire + (19% de cellules vivantes à la plus forte concentration)
Effet de la combinaison en 3D			
LNCaP	Diminution du volume +++ Synergie + Diminution de la viabilité cellulaire +	Diminution du volume +++ Synergie + **Diminution de la viabilité cellulaire ++**	Diminution du volume +++ Synergie + Diminution de la viabilité cellulaire +
22Rv1	Diminution du volume ++ Synergie + Diminution de la viabilité cellulaire +	Diminution du volume ++ Synergie ++ Diminution de la viabilité cellulaire ++	Diminution du volume +++ Synergie ++ **Diminution de la viabilité cellulaire +++**
VCaP	Diminution du volume +++ Synergie + Diminution de la viabilité cellulaire ++	Diminution du volume +++ Synergie ++ Diminution de la viabilité cellulaire ++	Diminution du volume +++ **Synergie +++** Diminution de la viabilité cellulaire ++

Tableau 13 : Effets des combinaisons de médicaments sur les lignées cellulaires du CaP

III. Caractérisation de l'effet de la combinaison de médicaments sur des lignées du CaP

A. La combinaison Enzalutamide + SB202190 a un effet cytostatique sur les lignées de CaP

Nous avons vu que l'association de nos différents traitements a un effet synergique en culture 2D et en culture 3D sur différentes lignées de CaP. À la suite de ces résultats, nous avons souhaité caractériser le mécanisme d'action de cette combinaison. Cependant le test de cytotoxicité à la sulforhodamine B ou l'évaluation de la viabilité cellulaire par le kit CellTiter-Glo ne nous permet pas de distinguer l'inhibition de la prolifération et l'induction de la mort cellulaire. Ainsi, par analyse au Celigo, nous avons déterminé si l'effet de notre combinaison est cytostatique ou cytotoxique. Pour cela, après traitement avec la combinaison « Enzalutamide + SB202190 », les cellules ont été marquées avec de l'Hoechst 33342 (marquage de tous les noyaux cellulaire) et de l'Iodure de Propidium (marquage des cellules mortes) afin de permettre le décompte du nombre total de cellules et l'estimation de la mortalité cellulaire (**Figure 30.A**). Pour notre expérience, nous avons ensemencé des cellules LNCaP, dans deux plaques 96 puits, l'une est utilisée pour un test de cytotoxicité à la Sulforhodamine B (**Figure 30.B.1**), et l'autre plaque est analysée au Celigo (**Figure 30.B.2 et 30.B.3**). Les résultats du test de cytotoxicité, avec la sulforhodamine B, montrent que l'Enzalutamide ou le SB202190, utilisés seuls, diminuent la survie cellulaire mais à de fortes concentrations (20µM d'Enzalutamide et 5µM de SB202190). Cependant, la combinaison des deux médicaments conduit à réduire la survie cellulaire dès la première concentration, et cet effet est corrélé avec une zone de synergie étendue (**Figure 30.B.1**). L'analyse au Celigo confirme les précédentes observations : chaque composé, seul, induit une diminution du nombre de cellules à des concentrations élevées. Cependant la combinaison des deux médicaments conduit à une réduction de la population cellulaire, à des doses faibles. De plus, la réduction de la survie cellulaire observée dans le test à la sulforhodamine B est associée à une réduction du nombre total de cellules dans les puits, au fur et à mesure de l'augmentation des concentrations des médicaments (**Figure 30.B.2**). Cependant, cette chute du nombre de cellules n'est pas associée à une augmentation du nombre de cellules mortes (**Figure 30.B.3**). Ainsi la combinaison « Enzalutamide + SB202190 » a un effet cytostatique dans la lignée LNCaP.

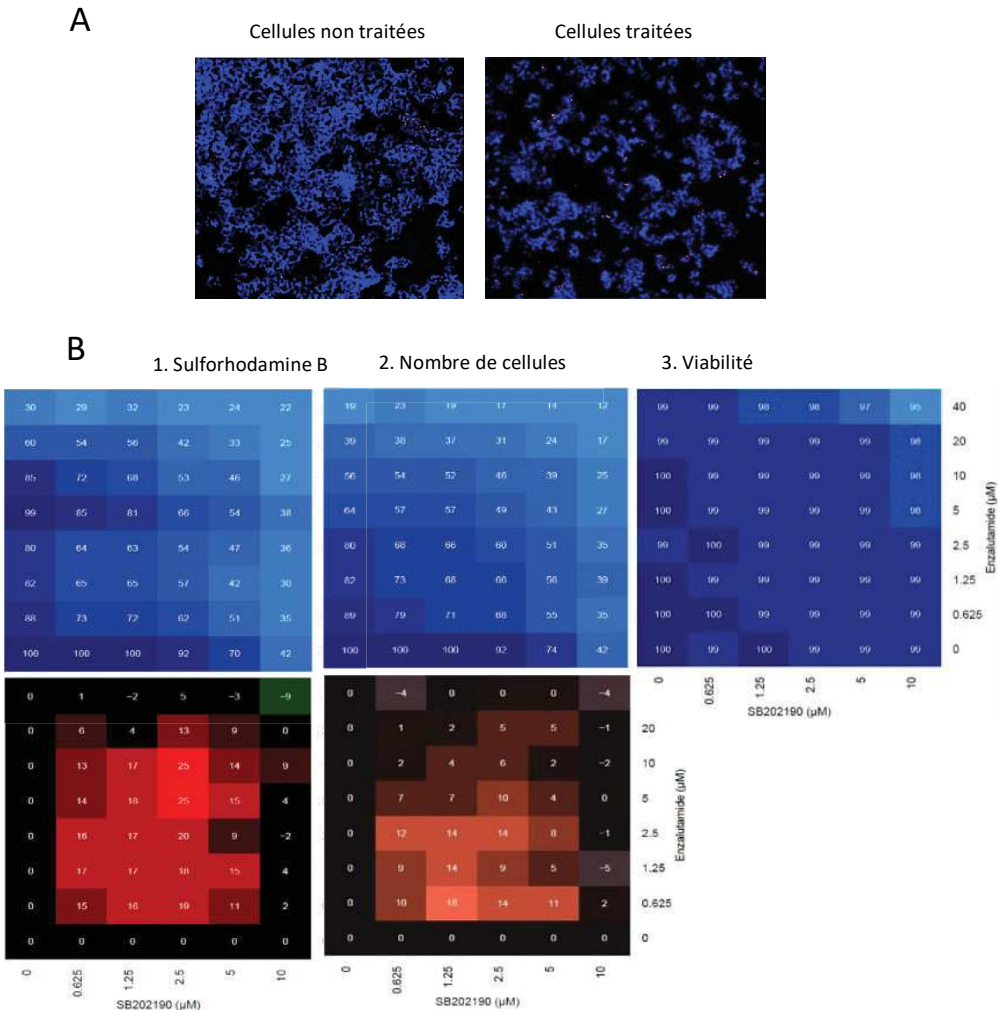


Figure 30 : Effet cytostatique de la combinaison « Enzalutamide + SB202190 » sur la lignée LNCaP
A. Capture d'images de l'application « Cell counting and Viability » du Celigo. L'Hoechst 33342 (marqueur bleu) colore les noyaux de toutes les cellules. L'Iodure de Propidium (marqueur rouge) colore les cellules mortes ayant perdu l'intégrité de leur membrane plasmique. **B. 1.** Sulforhodamine B : Matrices de synergie obtenues après un test de cytotoxicité à la sulforhodamine B. **2.** Nombre de cellules totales : Décompte obtenu après lecture de la plaque au Celigo et prise en compte de la fluorescence de l'Hoechst. **3.** Viabilité : Estimation du nombre de cellules vivantes dans chaque puits après lecture au Celigo et prise en compte du nombre de cellules mortes.

Cette combinaison « Enzalutamide + SB202190 » a aussi été testée dans la lignée 22Rv1. Les résultats confirment les précédentes observations (**Figure 23**) : la lignée 22Rv1 est moins sensible à cette association de médicaments que la lignée LNCaP (**Figure 31**). Seul l'Enzalutamide, utilisé seul et à forte concentration induit une diminution significative de la survie cellulaire (une réduction de 73% à 29% de viabilité cellulaire avec [20µM] d'Enzalutamide). L'inhibiteur de p38 seul n'atteint pas l'IC50 aux concentrations utilisées. L'association des deux médicaments diminue la viabilité cellulaire, cependant cet effet a lieu pour des doses élevées (**Figure 31.A**). L'analyse de la plaque au Celigo corrèle cette diminution

de la viabilité cellulaire avec une réduction du nombre total de cellules (**Figure 31.B**) sans augmentation du nombre de cellules mortes (**Figure 31.C**). Ainsi la combinaison « Enzalutamide + SB202190 » a un effet cytostatique dans la lignée 22Rv1.

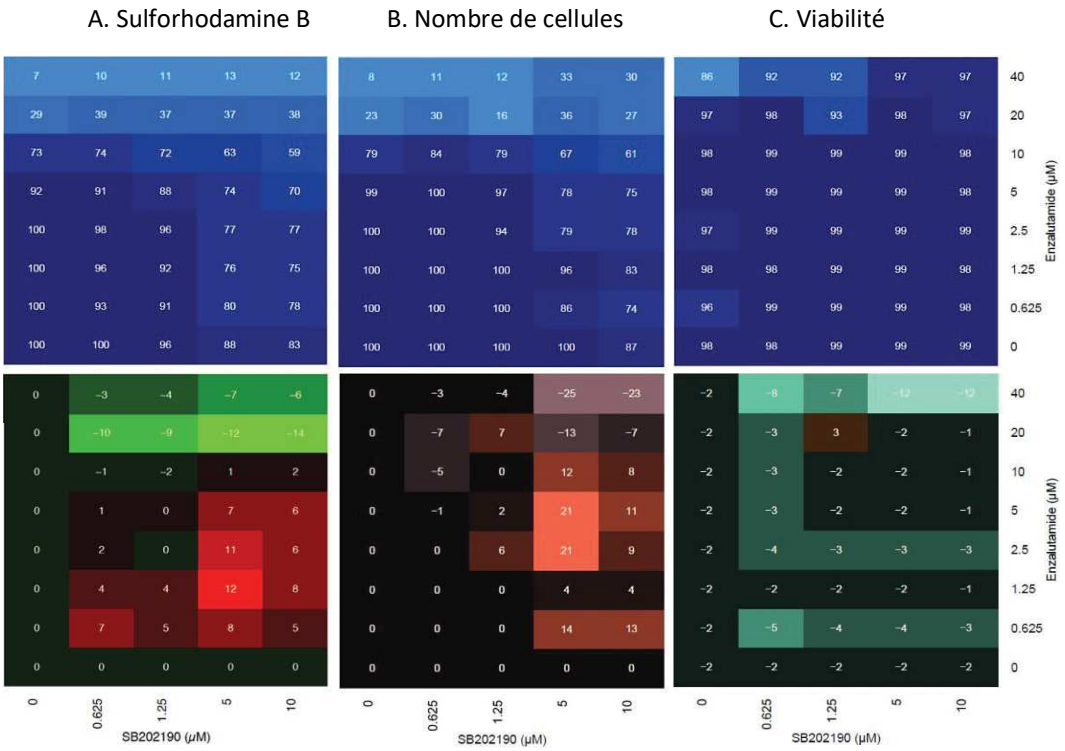


Figure 31 : Effet cytostatique de la combinaison « Enzalutamide + SB202190 » sur la lignée 22Rv1
A. Sulforhodamine B : Matrices de synergie obtenues après un test de cytotoxicité à la sulforhodamine **B.** Nombre de cellules totales : Décompte obtenu après lecture de la plaque au Celigo et prise en compte de la fluorescence de l'Hoechst. **C.** Viabilité : Estimation du nombre de cellules vivantes dans chaque puits après lecture au Celigo et prise en compte du nombre de cellules mortes

B. Les combinaisons « Enzalutamide + LY2228820 » et « Enzalutamide + ARRY-614 » ont un effet cytostatique et cytotoxique sur les lignées du CaP.

Il est à rappeler que l'objectif de ce travail est de pouvoir aboutir à un essai clinique par le développement d'une combinaison de traitement associé à l'Enzalutamide. Or l'effet de l'Enzalutamide avec le SB202190, bien que synergique, demeure cytostatique. L'utilisation de cette combinaison de médicaments conduirait à inhiber la prolifération tumorale mais n'éradiquerait pas complètement les cellules cancéreuses, ce qui serait désavantageux dans le traitement du patient. De plus, cet inhibiteur n'est pas utilisé en clinique, ainsi d'autres inhibiteurs de p38, LY2228820 et ARRY-614, acceptés en essai clinique, ont été testés, afin de caractériser leur effet dans la lignée cellulaire 22Rv1 (**Figure 32**). Nous avons traité les cellules avec des concentrations croissantes de chaque inhibiteur de p38 afin d'évaluer, au Celigo, le

nombre total de cellules et la mortalité cellulaire (**Figure 32.A**). Les résultats indiquent qu'il y a une diminution du nombre totale de cellules dépendante de la concentration d'inhibiteur de p38 utilisée. Cependant à de fortes concentrations (>10 μM), il y a une augmentation du nombre de cellules mortes, induite par les inhibiteurs LY2228820 (16%) et ARRY-614 (12%) comparé au SB202190 (4%). Ces inhibiteurs, utilisés seuls, ont un effet cytostatique et cytotoxique. Par la suite, l'effet des inhibiteurs de p38 a été évalué mais en combinaison avec l'Enzalutamide. Les résultats sont présentés sous forme de matrices de mortalité cellulaire (**Figure 32.B**). Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de médicaments. Afin d'évaluer la mortalité cellulaire, les cellules mortes ont été marquées avec du PI et la plaque a été analysée au Celigo. Les résultats montrent que la combinaison de LY2228820 ou d'ARRY-614 avec l'Enzalutamide, conduit à augmenter le nombre de cellules marquées par le PI, dès la première concentration de médicaments. Il y a une diminution du nombre total de cellules, qui est associée à une augmentation du nombre de cellules mortes avec les concentrations croissantes d'Enzalutamide associé avec le LY2228820 ou avec l'Arry-614.

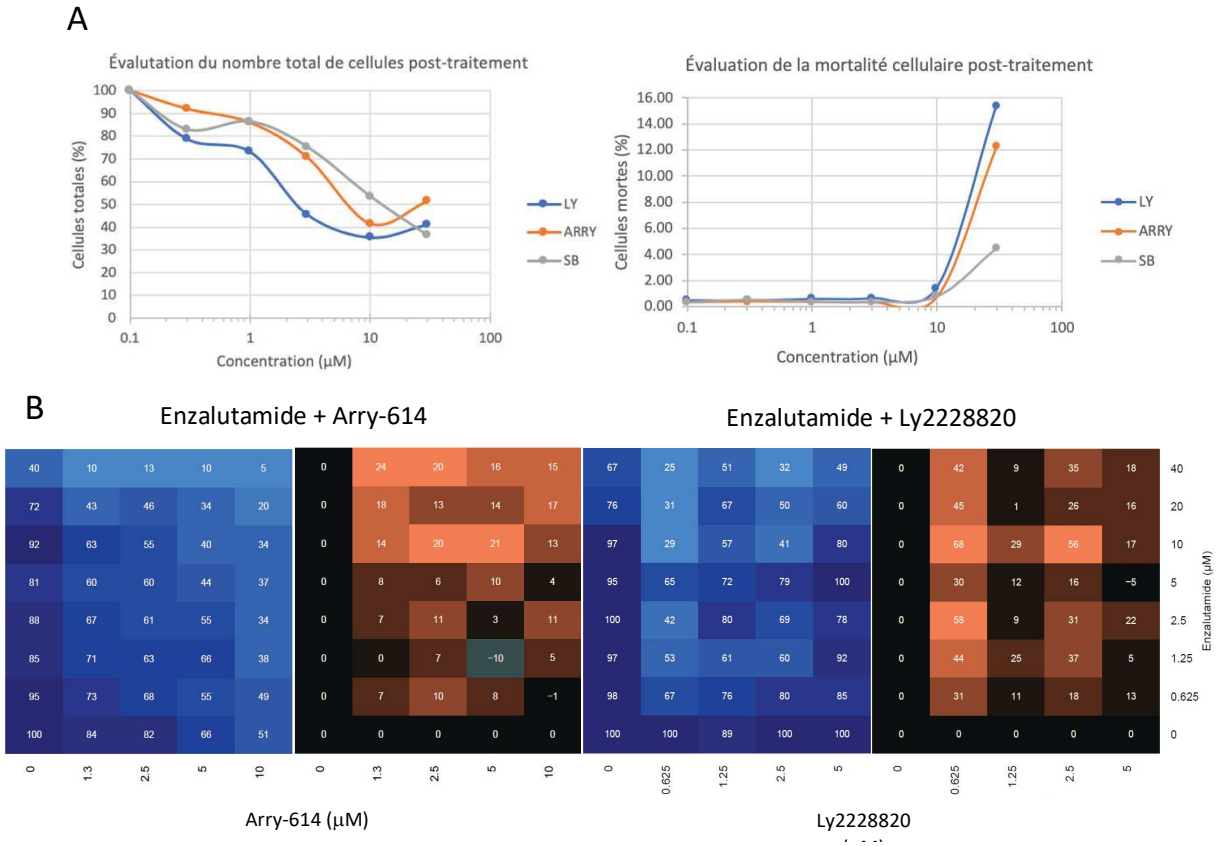


Figure 32 : Caractérisation des effets antitumoraux des inhibiteurs de p38 dans une lignée 22Rv1
A. Évaluation par Celigo du nombre total de cellules et de la mortalité cellulaires après traitement avec chaque inhibiteur. **B.** Matrices de synergie pour la mortalité cellulaire (marquage à l'Iodure de Propidium) pour les combinaisons de médicaments « Enzalutamide + Arry-614 » et « Enzalutamide + Ly2228820 ». *LY : LY2228820. ARRY : ARR-614. SB : SB202190.*

Ainsi, avec les inhibiteurs LY2228820 et ARRY-614, nous avons des combinaisons de traitements ayant un effet synergique en culture 2D et 3D, caractérisé par un effet cytostatique mais aussi un effet cytotoxique à hautes concentrations.

III.3. La combinaison « Enzalutamide + SB202190 » induit une inhibition de la synthèse d'ADN

Afin de caractériser l'effet cytostatique de la combinaison « Enzalutamide + SB202190 », des cellules de la lignée LNCaP ont été analysées au Celigo : par son mode d'analyse « *DNA synthesis application* », la synthèse *de novo* d'ADN a été évaluée par l'utilisation du 5-Ethynyl-2′-deoxyuridine (EdU). Cet analogue de la Thymidine s'incorpore dans l'ADN des cellules en phase S et peut être détecté par l'émission d'une fluorescence verte[370]. Afin de quantifier la synthèse d'ADN, nous avons associé celle-ci au nombre de cellules ayant incorporées l'EdU.

Les cellules LNCaP ont été traitées comme dans un test de cytotoxicité normal. Cependant l'EdU y a été incorporé 16h avant la fin du temps de traitement avec les différents médicaments (**Figure 33.A**). Les résultats montrent que l'utilisation de SB202190 seul, n'affecte pas le nombre de cellules ayant intégré l'EdU. Cependant le traitement avec l'Enzalutamide conduit à diminuer, de façon dose-dépendante, le nombre de cellules EdU-positives (14% de cellules ayant incorporé l'EdU à la concentration de 20 µM d'Enzalutamide) (**Figure 33.B**). Après analyse au Celigo, les résultats ont été traités sous forme de matrices de synergie (**Figure 33.C**). Les données montrent que lorsque les différents composés sont combinés, il y a une réduction du nombre de cellules EdU-positives dès la première concentration (0.625µM d'Enzalutamide et de SB202190) La diminution est associée avec une zone de synergie étendue, à de nombreuses concentrations de la combinaison de médicaments. Ainsi l'Enzalutamide seul, contrairement au SB202198, peut induire une diminution de l'incorporation d'EdU dans les cellules. Mais cet effet est potentialisé par l'ajout de l'inhibiteur de p38. Ces résultats suggèrent donc que cette combinaison a un effet cytostatique, qui se caractérise par l'inhibition de la synthèse de l'ADN.

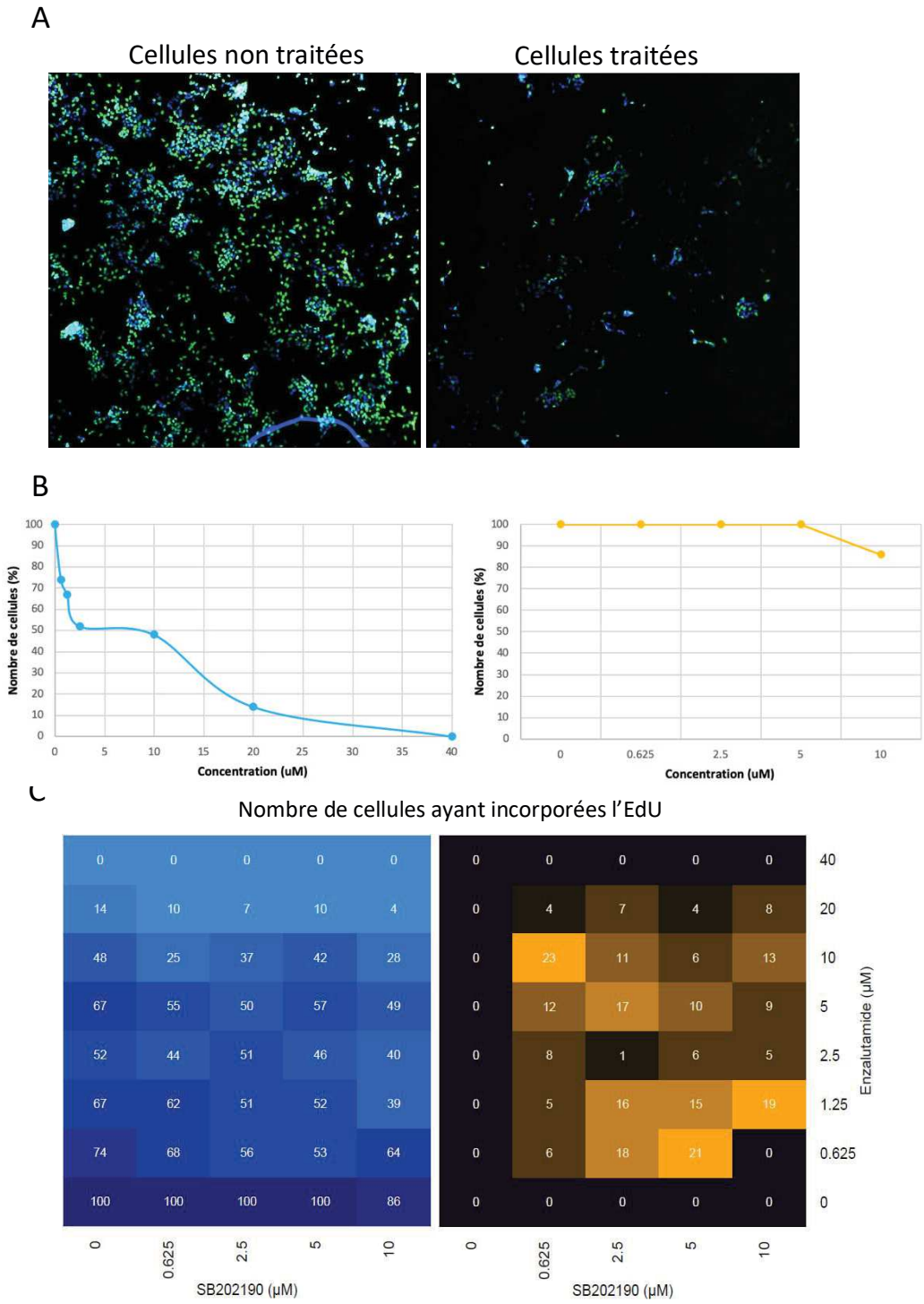


Figure 33 : Évaluation de la synthèse d'ADN par le décompte des cellules LNCaP EdU positives.
A. Capture d'images de l'application « DNA Synthesis » du Celigo. L'Hoechst 33342 (marqueur bleu) colore les noyaux de toutes les cellules. L'EdU (marqueur vert) est un analogue de la thymidine, permettant de marquer les cellules synthétisant de l'ADN. **B.** Courbes représentant la diminution de la population cellulaire en fonction du traitement avec l'Enzalutamide (Bleue) ou l'inhibiteur SB202190 (Jaune) **C.** Matrice de synergie évaluant l'effet de la combinaison « Enzalutamide + SB202190 » sur le nombre de cellules ayant incorporées l'EdU. *EdU : 5-Ethynyl-2´-deoxyuridine, analogue de la Thymidine*

IV. La combinaison « Enzalutamide + SB202190 » a un effet synergique *in vivo*

Les différentes combinaisons de médicaments conduisent à un effet synergique se manifestant par la diminution du volume des sphéroïdes et/ou la réduction de la viabilité cellulaire en culture 3D. Nous avons poursuivi notre étude par l'évaluation de l'effet *in vivo* de l'Enzalutamide et de l'inhibiteur de p38 en association ou non. Des cellules de la lignée LNCaP ont été injectées en sous-cutanée dans des souris mâles NOD/SCID ($3x10^6$ cellules/injection). Différents groupes de souris ont été formés : le groupe non traité (n=6), le groupe traité avec l'Enzalutamide (n=6), le groupe traité avec l'inhibiteur SB202190 (n=6) et le groupe traité par la combinaison de chaque médicament. L'efficacité de chaque traitement est comparée par le suivi de l'évolution du volume tumoral (**Figure 34**). Les souris ont été traitées de J0 à J13. Les résultats montrent que le groupe de souris n'ayant reçu aucun traitement (courbe bleue) ont la plus fort croissance tumorale (>250 u.a à J13). Le traitement avec l'Enzalutamide (courbe organe) ou l'inhibiteur SB202190 (courbe jaune) maintient le volume tumoral à une taille moins importante comparé au groupe non traité (<200 u.a à J13). La combinaison d'Enzalutamide et de SB202190 (courbe jaune) induit le plus faible volume tumoral avec une stabilisation de celui-ci jusqu'à l'arrêt des traitements. Cela confirme l'effet cytostatique observé dans les expériences avec les cultures cellulaires en 2D et en 3D. De plus, l'arrêt du traitement entre J13 et J18 provoquent la reprise de la croissance tumorale pour tous les groupes de souris. Par ailleurs, les souris sont sacrifiées à J22.

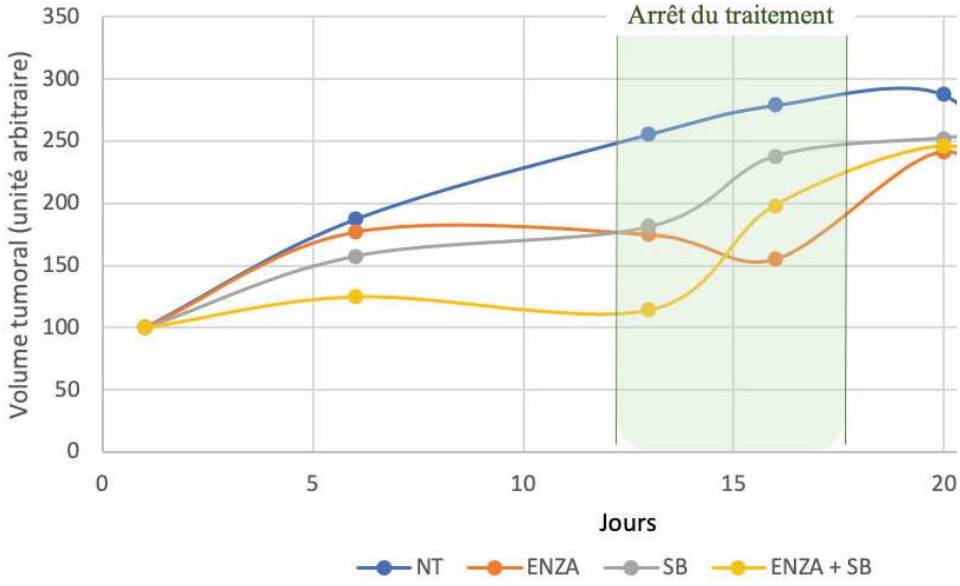


Figure 34 : Suivi de l'évolution du volume tumoral *in vivo* avec des traitements avec l'Enzalutamide et/ou l'inhibiteur de p38 SB202190
NT : Non traité. ENZA : Enzalutamide. SB : SB202190. ENZA + SB : Enzalutamide + SB202190

Par ailleurs, la même expérience a été réalisée en testant des traitements avec l'Abiratérone et/ou le SB202190 (**Figure 35**). Selon le même procédé que dans l'expérience précédente, des souris greffées avec des cellules LNCaP ont été organisées en groupes, recevant différents traitements. Cependant la durée de suivi de suivi de la croissance tumorale n'a pu être similaire, du fait d'un problème de dilution de l'Abiratérone et à cause d'une grande perte de poids des souris. Ainsi l'administration des médicaments a été arrêtée au bout du 6e jour. Cependant les mesures réalisées de la taille des tumeurs, au cours de la première semaine, montrent que le volume tumorale augmente le plus rapidement pour les souris non traitées ou traitées avec chaque médicament, utilisé seul. Mais la combinaison « Abiratérone + SB202190 » conduit à la plus faible augmentation du volume tumorale.

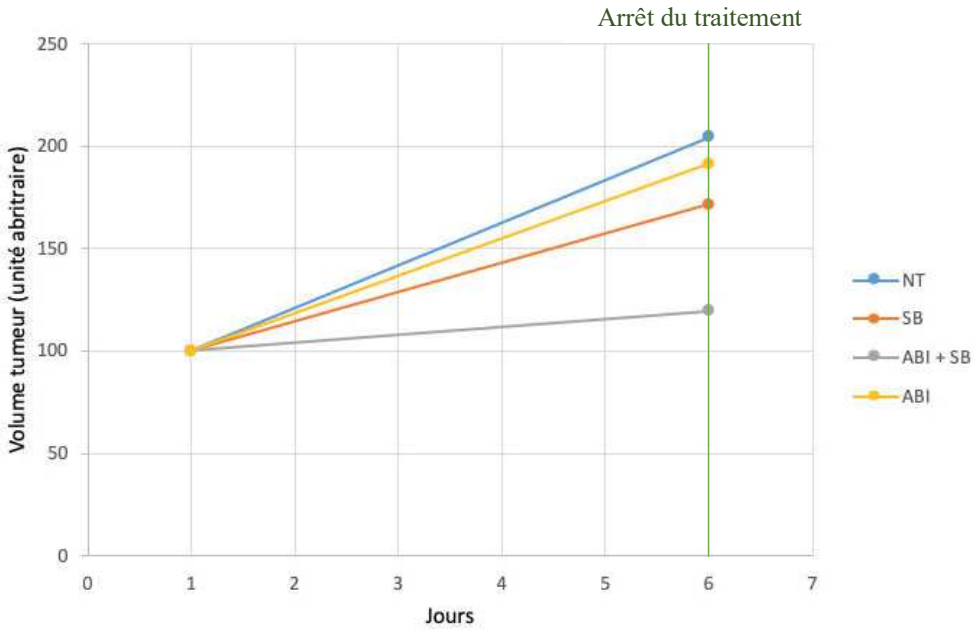


Figure 35 : Suivi de l'évolution du volume tumoral *in vivo* avec des traitements avec l'Abiratérone et/ou l'inhibiteur de p38 SB202190
NT : Non traité. ABI : Abiratérone. SB : SB202190. ABI + SB : Enzalutamide + SB202190

Nos tests de combinaisons *in vivo* confirment l'effet synergique de l'association anti-androgène + inhibiteur de p38 est meilleur que l'effet de chaque médicament utilisé seul.

V. Évaluation de l'effet des médicaments sur l'activité transcriptionnelle du RA

A. Les inhibiteurs de p38 inhibent l'activité transcriptionnelle du RA

Nous avons vu précédemment que le traitement avec l'Enzalutamide conduit à la phosphorylation de p38. De plus, une combinaison d'Enzalutamide avec un inhibiteur de cette kinase a un effet synergique. Cette association de médicaments peut exercer un effet cytostatique, à faible concentration et un effet cytotoxique à plus forte concentration. Ces résultats démontrent ainsi l'importance de la MAPK p38 pour la cellule cancéreuse en réponse au traitement avec l'Enzalutamide. En effet, il a été prouvé que la MAPK p38 est capable de phosphoryler le RA, conduisant à la régulation de sa localisation et de sa transcription[74]. Or, le RA est aussi la cible de l'Enzalutamide[39]. Ainsi, nous avons entrepris d'étudier l'effet de nos médicaments sur l'activité transcriptionnelle du RA. En collaboration avec l'équipe du Dr P. Balaguer, un modèle cellulaire de bioluminescence a été utilisé afin d'évaluer l'effet des différents médicaments sur l'activité transcriptionnelle du RA. Nous avons donc choisi la lignée cellulaire HELN-AR, exprimant constitutivement la Luciférase Firefly[371] et dans laquelle, un plasmide, codant pour l'expression du RA, a été transfecté. Ainsi, après stimulation du RA, par un ligand synthétique (R1881)[373], son activité transcriptionnelle est quantifiable grâce à l'expression de la Luciférase. À partir de ce modèle, nous avons incubé les cellules avec les différents inhibiteurs de p38, pendant 16h à 24h avant lecture de la plaque pour la mesure de la bioluminescence. Dans cette expérience, nous avons testé trois conditions. Tout d'abord, nous avons testé les inhibiteurs de p38, seuls, afin de vérifier que ces molécules ne sont pas des agonistes du RA. Ensuite, deux concentrations différentes de R1881 ont été utilisées : [10^{-9}M] induisant l'activation du RA à 60% et [10^{-7}M] stimulant le RA à 100%. Nous voulions évaluer les conséquences du niveau d'activation du RA sur un potentiel effet des inhibiteurs de p38. Les résultats ont montré que les inhibiteurs de p38, utilisés seuls, n'induisaient pas d'expression de la Luciférase et donc ils ne stimulaient pas l'activité transcriptionnelle du RA, ce qui confirme que ce ne sont pas des agonistes du récepteur (**Figure 36** courbes bleue). Lorsque le RA est activé par l'ajout du R1881, les inhibiteurs provoquent une diminution de l'activité transcriptionnelle du RA qui est dépendante de la concentration de ces inhibiteurs (**Figure 36** courbes rouges et vertes). En présence de R1881 10^{-7}M, l'activité du RA est réduite de 50%. En présence de R1881 10^{-9}M, l'activité est réduite de 20%. Les résultats de cette expérience démontrent que les trois inhibiteurs de la MAPK p38 utilisés sont capables d'inhiber l'activité transcriptionnelle du RA, ce qui pourrait justifier l'effet synergique de la combinaison « Enzalutamide + inhibiteur de p38 ».

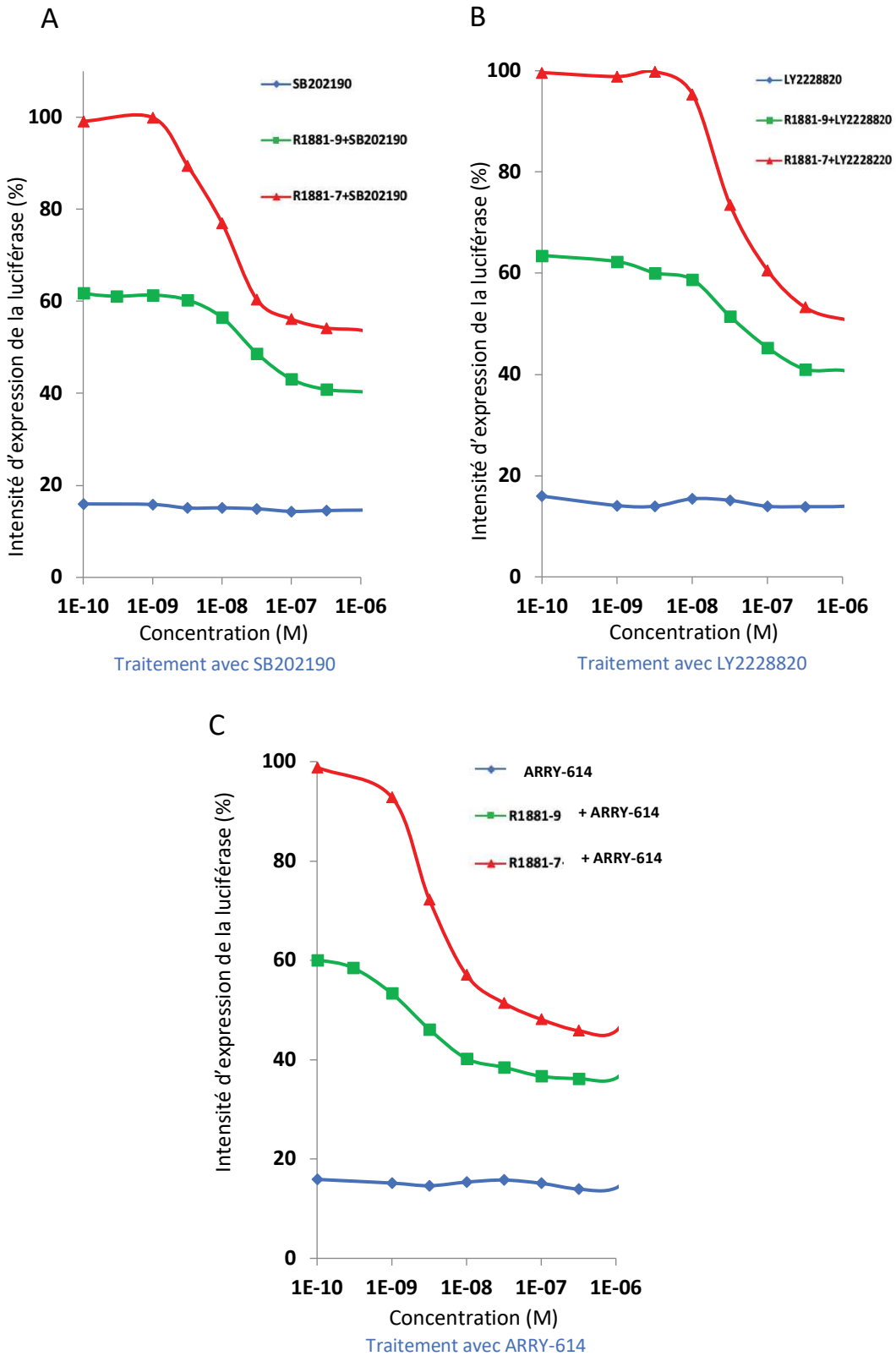
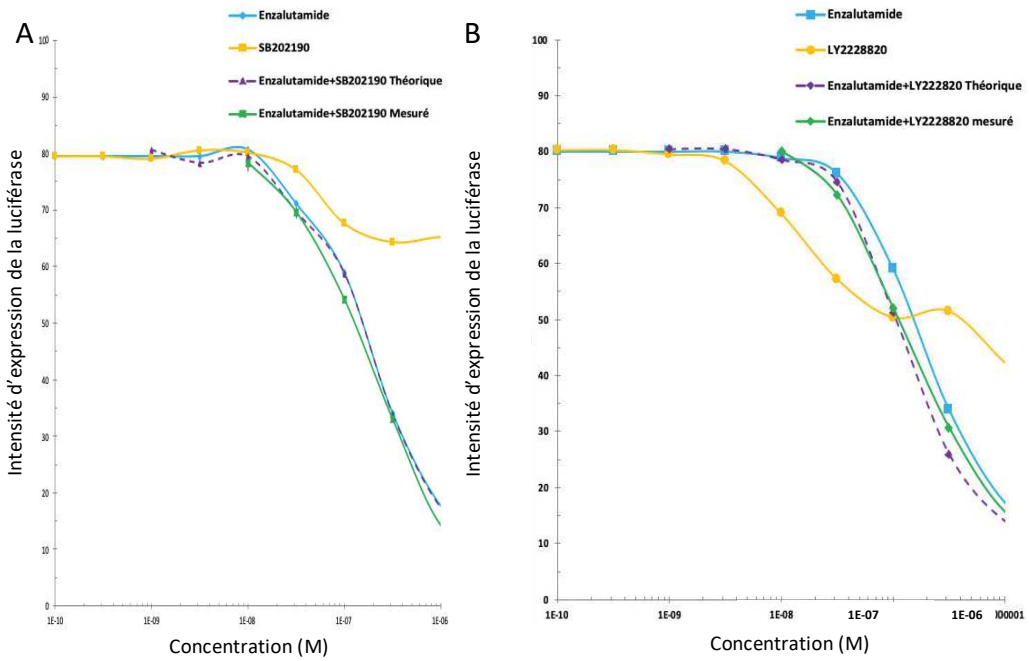


Figure 36 : Évaluation de l'activité transcriptionnelle du RA post-traitement avec inhibiteur de p38
A. Traitement avec SB202190. **B.** Traitement avec LY2228820. **C.** Traitement avec Arry-614. *Lignée cellulaire testée : HLEN. Gène rapporteur : Luciférase. Temps de traitement : 16h à 24h.*

B. L'association de l'Enzalutamide avec un inhibiteur de p38 potentialise son inhibition de l'activité transcriptionnelle du RA

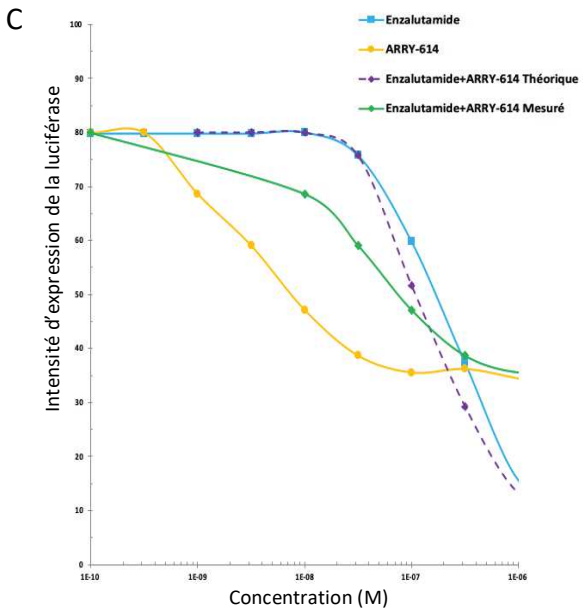
L'utilisation des trois inhibiteurs de p38 individuellement a provoqué la réduction de l'activité transcriptionnelle du RA. Sachant que nos précédents résultats montrent que l'effet des deux médicaments est meilleur en combinaison qu'isolé, nous avons testé l'effet d'une association de l'Enzalutamide avec un inhibiteur de p38 (**Figure 37**). Pour cela, nous avons traité les cellules avec chacun des composés seuls et en association. Une seule dose de ligand a été utilisée, qui correspond à une activation du RA à 80%. Les résultats montrent, de nouveau, que les différents inhibiteurs de p38, seuls, induisent une réduction de l'intensité de la luciférase et donc de l'activité transcriptionnelle du RA (**Figure 37** courbes jaune). De plus, l'utilisation de l'Enzalutamide, seule, provoque une réduction de l'activité transcriptionnelle du RA plus importante qu'avec les inhibiteurs de p38 seuls (<20% d'activité restant à la concentration [1.10^{-6}M] d'Enzalutamide) (**Figure 37** courbes bleue). Cet effet était attendu, du fait du mécanisme d'inhibition du récepteur de cet anti-androgène[39]. Par ailleurs, le plus notable est que l'association des différents composés provoque une réduction de l'expression de la luciférase, mais à des concentrations plus faibles, par rapport à la courbe de traitement avec l'Enzalutamide seul (**Figure 37** courbes verte). Cet effet est plus important pour la combinaison « Enzalutamide + ARRY-614 » : avec l'Enzalutamide seul, à [1.10^{-8}M], l'activité transcriptionnelle est à 80% tandis que l'association avec ARRY-614 diminue l'activité génomique à 70% pour la même concentration. Par ailleurs, à partir de l'estimation de l'allure de la courbe théorique, à partir de l'équation de Bliss, (**Figure 37** courbes violette) et de la comparaison de celle-ci avec la courbe des valeurs mesurées, nous avons déterminé que l'effet de la combinaison de nos médicaments est additif. Bien que l'association de traitement conduise à un effet plus rapide dans la diminution de l'activité transcriptionnelle, l'IC50 théorique et mesuré pour chaque combinaison est atteinte à une concentration équivalente.

Ces données montrent que les inhibiteurs de p38 permettent de catalyser l'effet de l'Enzalutamide en réduisant la concentration d'anti-androgènes nécessaire. Cette combinaison de médicaments a un effet additif, qui provoque une inhibition plus rapide de l'activité transcriptionnelle du RA.



Traitement avec Enzalutamide et/ou SB202190

Traitement avec Enzalutamide et/ou LY2228820

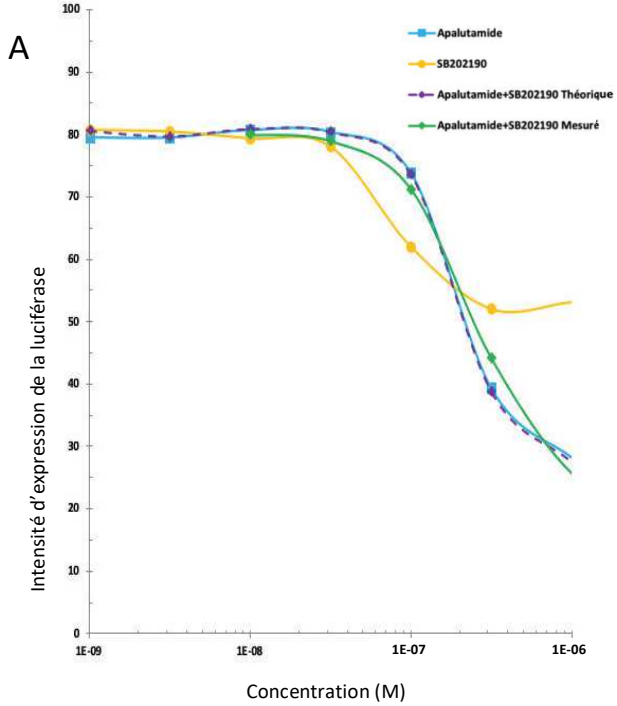


Traitement avec Enzalutamide et/ou Arry-614

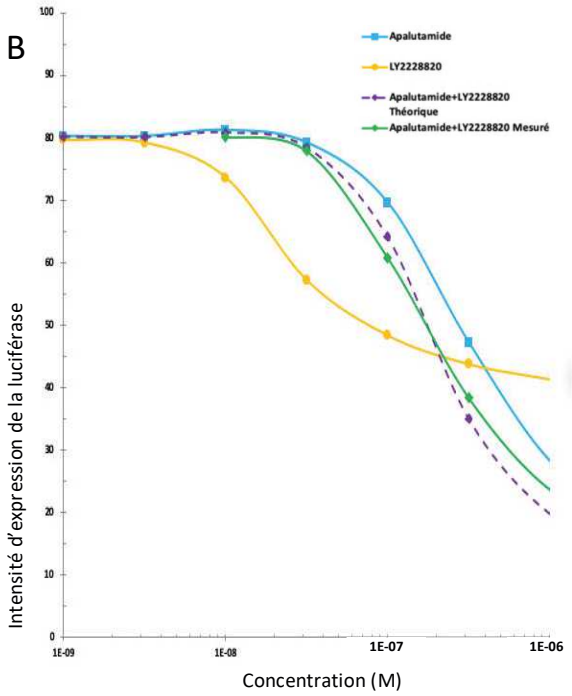
Figure 37 : Évaluation de l'activité transcriptionnelle du RA post-traitement avec Enzalutamide et/ou inhibiteur de p38

A. Traitement Enzalutamide et/ou SB202190. **B.** Traitement Enzalutamide et/ou LY2228820. **C.** Traitement Enzalutamide et/ou Arry-614. *Lignée cellulaire testée : HLEN. Gène rapporteur : Luciférase. Temps de traitement : 16h à 24h.*

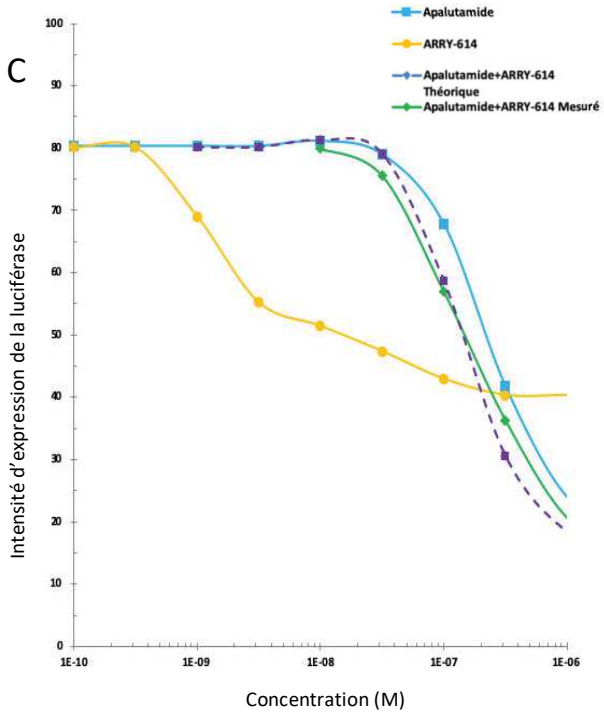
Par ailleurs, nous avons évalué l'effet des inhibiteurs de p38 en association avec l'Apalutamide, un anti-androgène similaire à l'Enzalutamide[384] (**Figure 38**). Chaque composé a été testé individuellement puis en association afin de déterminer l'effet sur l'activité transcriptionnelle du RA. Les résultats sont similaires aux combinaisons précédentes avec l'Enzalutamide : les inhibiteurs de p38, LY2228820 et ARRY-614, comparés au SB202190, induisent une diminution de l'activité transcriptionnelle du RA à de plus faibles concentrations. Par exemple, les résultats montrent une diminution de 10% d'activité dès la concentration de [1.10^{-8}M] de LY2228820 (**Figure 38.B**), une diminution de 10% d'activité dès la concentration de [1.10^{-9}M] pour ARRY-614 (**Figure 38.C**) et une diminution de 20% d'activité à la concentration de [1.10^{-7}M] de SB202190 (**Figure 38.A**). De plus, la réduction pour les inhibiteurs LY2228820 et Arry-614 (<40% d'activité transcriptionnelle du RA) est plus importante qu'avec l'inhibiteur SB202190 (<50% d'activité transcriptionnelle du RA). De plus, comme lors de l'expérience précédente (**Figure 37.C**), la réduction induite par l'inhibiteur ARRY-614 est la plus rapide et la plus importante des inhibiteurs de p38. L'utilisation de l'Apalutamide seul, conduit à une diminution significative de l'activité du RA à partir de [1.10^{-7}M] de l'anti-androgène. Cette concentration provoque une réduction de 10% de l'expression de la luciférase. Il est à noter que, comme l'Enzalutamide (**Figure 37**), l'inhibition induite par l'Apalutamide est comprise entre les concentrations [3.10^{-7}M] à [1.10^{-6}M]. Dans cet intervalle, l'activité transcriptionnelle passe de 80% à <20% d'activation (**Figure 38**). Il est aussi à préciser que la combinaison de médicaments permet d'avoir une inhibition similaire à l'utilisation de l'Apalutamide seul, mais à des doses plus faibles (**Figure 38**).



Traitement avec Apalutamide et/ou SB202190



Traitement avec Apalutamide et/ou LY2228820



Traitement avec Apalutamide et/ou Arry-614

Figure 38 : Évaluation de l'activité transcriptionnelle du RA post-traitement Apalutamide et/ou inhibiteur de p38
A. Traitement avec Apalutamide et/ou SB202190. **B.** Traitement avec Apalutamide et/ou LY2228820. **C.** Traitement avec Apalutamide et/ou Arry-614.

Ces résultats montrent que les inhibiteurs de p38 peuvent inhiber l'activité transcriptionnelle du RA individuellement mais aussi que ces molécules peuvent catalyser l'action des anti-androgènes par la diminution de la concentration nécessaire pour leur action inhibitrice.

VI. La combinaison Enzalutamide et inhibiteur de p38 réduit l'expression du variant RA-V7

Parmi les mécanismes de résistance connus, nous avons évoqué l'existence de variants d'épissage et plus particulièrement, le variant RA-V7[157]. L'expression de ce variant est augmentée avec la gravité du CaP[229] mais aussi après traitement par hormonothérapie[217]. De plus, son implication dans la résistance à l'Enzalutamide a été mis en évidence aussi bien *in vitro*[221], *in vivo*[68] qu'en clinique[222,228]. De ce fait, nous avons évalué l'effet de notre combinaison de médicaments sur l'expression de ce variant d'épissage (**Figure 39**). Des cellules de la lignée 22Rv1 ont été traitées pendant 72h avec de l'Abiratérone [7.5µM] ou de l'Enzalutamide [35µM] associé ou non, avec un inhibiteur de p38 (SB202190) [5µM]. L'analyse par Western blot montre que l'inhibition de la MAPK p38 réduit l'expression du RA-V7. De plus, cette réduction est encore plus forte en association avec un des anti-androgènes. Cette expérience suggère que l'effet synergique observé avec l'utilisation de l'inhibiteur de p38 implique l'inhibition de ce variant d'épissage, responsable de la résistance à l'Enzalutamide et à l'Abiratérone[222].

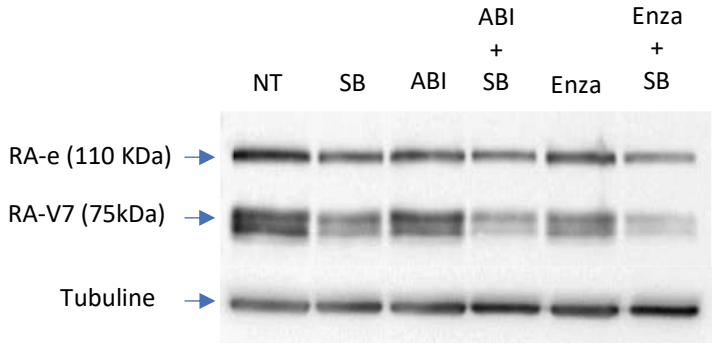


Figure 39 : Expression du RA-V7 post-traitement avec anti-androgènes et/ou inhibiteur de p38 dans la lignée 22Rv1
Évaluation de l'expression du RA-V7 par Western Blot. *RA-e : Récepteur des Androgènes entier. NT : Non traité. SB : SB202190. ABI : Abiratérone. Enza : Enzalutamide. Concentration de drogue utilisée : Abiratérone [7.5µM], Enzalutamide [35µM], SB202190 [5µM]. NT : Non traité. E : Enzalutamide. SB : SB202190. Abi : Abiratérone. Enza : Enzalutamide.*

Discussion et Perspectives

Discussions et perspectives

Modèles cellulaires du cancer de la prostate

Les différentes expériences de ces travaux de thèse ont utilisé les lignées cellulaires LNCaP, 22Rv1, VCaP, DU145 et PC3 en tant que principaux modèles précliniques pour l'étude du CaP. Les lignées cellulaires DU145 et PC3 sont des cellules n'exprimant pas le RA. Du fait de cette caractéristique, ces lignées ne sont pas adaptées à l'étude de l'expression du RA. Ainsi, nous avons basé la majorité de notre étude sur l'utilisation des lignées LNCaP, 22Rv1 et VCaP. Les lignées cellulaires nous permettent d'avoir un modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires de la tumorigenèse et de la résistance aux traitements. En effet, leur prolifération continue, permet d'avoir une quantité de matériel conséquente, leur adaptabilité à du criblage à haut débit permet l'identification de nouveaux médicaments et/ou cibles thérapeutiques. De plus, la possibilité de réaliser des xénogreffes avec ces cellules facilite l'étude de la formation de tumeurs pour des tests *in vivo*.

Cependant ces lignées cellulaires proviennent de cellules tumorales humaines, ayant été cultivées dans des conditions *in vitro* donc elles ne sont donc pas représentatives de l'hétérogénéité tumorale. Ainsi, choisir une lignée cellulaire pour modéliser le « Cancer de la Prostate » n'est pas concevable. De ce fait, des modèles biologiques mimant le tissu cancéreux présentent plus d'avantage. Un de ces potentiels mimes est l'organoïde, qui permet la conservation de l'hétérogénéité génétique et des caractéristiques morphologiques de la tumeur originale[385,386]. De plus, ce modèle permet de réaliser un criblage à haut débit afin de tester et d'identifier de potentielles molécules et/ou cibles thérapeutiques. Il est à noter que la culture 3D peut aussi permettre la formation de sphéroïdes, sans respect de l'architecture de l'organe de départ mais présentant des avantages similaires aux organoïdes[387]. Un autre modèle d'étude pouvant aussi être utilisé est le modèle PDX (*Patient-Derived Xenografts*) qui est plus proche de la réalité biologique de la maladie. En effet, les PDX sont obtenus à partir de greffe de cellules cancéreuses de patients dans des souris immunodéprimées, ce qui permet de conserver l'hétérogénéité tumorale du patient[388,389]. Cette approche permet l'obtention de résultats reflétant la réponse clinique des patients. Cependant, l'utilisation de souris immunodéprimées ne tient pas compte de l'implication du système immunitaire et la durée de prise de la greffe conduit à un délai moyen de 6 mois pour obtenir des résultats avec un modèle PDX. De plus, l'incompatibilité des PDX avec des tests de criblage à haut-débit, limite aussi son champ d'utilisation[386].

Avantages	Inconvénients
Lignées cellulaires	
Croissance continue Criblage à haut débit possible Cumul de données expérimentales	Développement lignée de CaP limité Pas d'hétérogénéité Aucune influence du microenvironnement ou du système immunitaire
Organoïdes / Sphéroïdes	
Hétérogénéité conservée Disponibilité de données cliniques Criblage à haut débit possible Application à modèle de PDX	Faible taux d'obtention à partir d'échantillon primaire de CaP hormonosensible Pas d'influence du système immunitaire
Patient-Derived Xenografts	
Hétérogénéité et mutations conservées Influence du microenvironnement Système endocrinien biologique Statut métastatique évaluable Possible création de banques d'échantillons tumorales de patients	Temps d'obtention long Utilisation de souris immunodéficientes Différences entre le microenvironnement murin et humain

Tableau 14 : Comparaison des avantages et inconvénients des modèles précliniques du cancer de la prostate

Ainsi l'utilisation de lignées cellulaires du CaP dans notre étude est cohérente pour l'identification de molécules thérapeutiques ou de mécanismes moléculaires particuliers. Cependant, en raison des caractéristiques distinctes des lignées cellulaires par rapport à leurs tumeurs d'origine, leur utilisation est limitée dans l'exploration des effets thérapeutiques chez le patient. Il est donc à considérer des modèles précliniques de culture en 3D, tels des PDX dans des souris humanisées qui constitueraient des mimes fidèles, du fait d'un rapprochement des conditions biologiques de la tumeur.

Kinases et cancer de la prostate

Le but de mon projet de thèse est d'améliorer le traitement de patients atteints de CPRC par l'étude de la résistance à l'Enzalutamide. Ainsi, nous avons entrepris l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettraient de potentialiser l'effet thérapeutique de l'Enzalutamide ou de contrer l'insensibilité à ce traitement. Notre étude a débuté par l'identification de la MAPK p38 à la suite d'une analyse phosphoprotéomique via la méthode du « PamGene Assay ». Cette technologie permet la mesure de l'activité des kinases présentes dans un échantillon cellulaire donné à l'aide de puces. Nous avons choisi cette technique d'analyse, au lieu du « Proteome profiler »[390], car elle présente une large spécificité pour les protéines kinases, permettant d'identifier un nombre conséquent d'entre elles : 288 séquences peptidiques correspondant à des sites de phosphorylation pour des protéines tyrosine kinases et des protéines sérine/thréonine kinase. De plus, la quantité de protéine nécessaire pour l'établissement d'un profil kinomique est faible : 0,5 à 5µg de protéines nécessaire, ce qui confère une haute sensibilité de détection. Cependant il est à noter que cette approche présente une limitation. L'identification des protéines kinases peut se faire de deux manières : un site de phosphorylation peut être phosphorylé par une ou plusieurs kinases mais aussi plusieurs sites de phosphorylation peuvent être phosphorylés par une seule kinase. Ainsi les résultats obtenus sont comparés avec des banques de données conduisant à l'identification soit d'une protéine kinase connue ou d'une protéine kinase supposément impliquée. C'est par ce processus d'analyse que nous avons identifié ces 30 protéines kinases, (les protéines MAPK p38 ne sont pas indiquées dans le tableau), présentant une augmentation de leur activité enzymatique (**Tableau 15**).

Kinase identifiée	Nom	Processus biologique associée
P70S6Kb (RPS6KB2)	Ribosomal Protein S6 Kinase beta -2	Synthèse protéique, prolifération
C-RAF (RAF-1)	Raf-1 Proto-Oncogene	Prolifération, apoptose, migration
PKACa (PRKACA)	Protein Kinase cAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha	Prolifération, apoptose
ZC4 (NRK)	Nik-related kinase	Prolifération
ZC1 (MAP4K4)	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	Prolifération, différentiation, migration
PRKX	Protein Kinase X-linked	Prolifération, migration
GSK3a	Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha	Motilité, prolifération, division, survie
MSK1 (RPSK6KA5)	Ribosomal Protein S6 Kinase A5	Inflammation, apoptose
ZC2 (TNIK)	TRAF2 And NCK Interacting Kinase	Motilité, réponse au stress
PKCg (PRKCG)	Protein Kinase C Gamma	Survie
PRKY	Protein Kinase Y-Linked (Pseudogene)	Transduction du signal
PINK1	PTEN induced kinase 1	Autophagie, réponse au stress
PFTAIRE1 (PFTK1)	Cyclin dependent kinase 14	Cycle cellulaire, division
P70S6K (RPS6KB1)	Ribosomal protein S6 kinase B1	Apoptose, transduction du signal
IKKa (CHUK)	Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex	Inflammation, réponse au stress
GPRK4 (GPRK2L)	G protein-coupled receptor kinase 4	Transduction du signal
CK2a2 (CSNK2A2)	Casein kinase 2 alpha 2	Cycle cellulaire, apoptose
CK2a1 (CSNK2A1)	Casein kinase 2 alpha 1	Cycle cellulaire, apoptose
CDK7	Cyclin dependent kinase 7	Cycle cellulaire, régulation de la transcription
ROCK2	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2	Cycle cellulaire, motilité
mTOR (FRAP)	Mechanistic target of rapamycin kinase	Réponse au stress
AKT3	AKT serine/threonine kinase 3	Prolifération, apoptose
PKCt (PRKCQ)	protein kinase C theta	Inflammation, prolifération
PKCb (PRKCB1)	Protein kinase C beta	Apoptose, prolifération, réponse immunitaire
NDR2 (KIAA0965)	Serine/threonine kinase 38 like	Transduction du signal
ERK2 (MAPK1)	Mitogen-activated protein kinase 1	Cycle cellulaire, réponse au stress
PKCi (PRKCI)	Protein kinase C iota	Migration, transduction du signal, apoptose
PKACb (PRKACB)	Protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta	Transduction du signal, cycle cellulaire
AKT1	Protein Kinase B 1	Prolifération, réponse au stress
DNA-PK (PRKDC)	DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit	Apoptose, Réponse immunitaire, Réponse au stress

Tableau 15 : Liste des protéines kinases (hors MAPK p38) identifiées par PamGene Assay

Il est intéressant de noter que parmi les kinases identifiées en réponse à l'Enzalutamide, nous avons mis en évidence certaines protéines dont l'activation a déjà été associée à la réponse aux thérapies. La protéine RPS6KB2 est une kinase impliquée dans la synthèse protéique et la régulation du cycle cellulaire[391]. Une étude a démontré que son activation participe à la résistance au Docetaxel et promeut ainsi la prolifération des cellules du CaP[392]. Par ailleurs, une autre étude a démontré que l'autre isoforme de la protéine, RPS6KB1, joue un rôle dans la réponse à la radiothérapie dans le CaP. En effet, l'inhibition de cette kinase conduit à améliorer les effets des radiations. Ainsi, cibler RPS6KB1 pourrait servir comme un potentiel traitement néoadjuvant[393]. La protéine PRKACA, activée par les variations de concentration d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP), contribue à la régulation de la prolifération[394]. Une étude a corrélé l'augmentation de l'expression de PRKACA dans les cellules cancéreuses avec la résistance au Trastuzumab, traitement pour le cancer du sein HER2 positif, et la stimulation de la survie cellulaire[395]. La protéine ZC4 (MAP4K4) est une kinase participant aux processus de motilité cellulaire et de prolifération[396–398]. Cette kinase est impliquée dans la réponse à la chimiothérapie (5-fluorouracile) dans le cancer colorectal, son inhibition permet d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses[399]. Parmi les protéines activées par le traitement à l'Enzalutamide, certaines sont impliquées dans la voie de signalisation du facteur de transcription NF-κB. C'est le cas des protéines IKKα[400] et GSK3α[401] qui vont participer à la stimulation de l'expression de NF-κB. Or l'expression de ce facteur de transcription est récurrente dans les CPRC[402] et il joue un rôle dans la résistance à l'Enzalutamide[201]. Par ailleurs, la protéine GSK3α est aussi impliquée dans la réponse à la chimiothérapie dans les cellules cancéreuses colo-rectales[403]. La protéine PINK1 est une protéine mitochondriale, activée par la protéine Parkin et jouant un rôle dans l'homéostasie cellulaire par la régulation du processus de mitophagie[404]. La protéine PINK1 a été associée à la résistance au B5G1, un analogue de l'acide bétulinique, dans des lignées cellulaires du cancer du foie présentant des multiples résistances. En effet, l'activation de Pink1 inhibe le processus d'apoptose par voie mitochondriale du B5G1[405]. Par ailleurs, il est à noter qu'une autre étude phosphoprotéomique étudiant la réponse de la lignée LNCaP à un traitement avec des SMAP (*Small-Molecules Activators of protein Phosphatase 2A*) a aussi révélé l'activation de certaines des protéines préalablement identifiées (**Tableau 15**) : RPS6KB1, PRKACA, CDK7, AKT1, mTOR et MAPK1[406].

Ainsi cette méthode d'analyse phoshokinomique a permis l'identification de kinases activées par le traitement à l'Enzalutamide. De plus, la pertinence de notre méthode d'analyse est confortée par la corrélation, par d'autres études, des kinases identifiées à la réponse aux traitements.

La synergie des combinaisons d'anti-androgènes et d'inhibiteurs de p38

Nous avons, tout d'abord, testé nos différentes combinaisons de médicaments avec des cultures en 2D de lignées du CaP, exprimant le récepteur des androgènes : LNCaP et 22Rv1. Les résultats montrent que l'association des inhibiteurs de p38 (SB202190, LY2228820, ARRY-614) aux inhibiteurs de la voie de signalisation du RA (Enzalutamide, Abiratérone) a un effet synergique dans la diminution de la prolifération des cellules du CaP. Cependant, nous constatons qu'il y a une différence de sensibilité entre les deux lignées cellulaires testées. La diminution de la viabilité cellulaire de la lignée LNCaP est plus importante que la lignée 22Rv1. Cette disparité dans l'effet des traitements pourraient s'expliquer le fait que la lignée LNCaP ne possède pas le variant d'épissage RA-V7[347]. Or ce variant possède la particularité de ne pas avoir de domaine de fixation du ligand (LBD), qui est la cible des anti-androgènes, Enzalutamide et Abiratérone[189]. De plus, le variant RA-V7 possède une activation indépendante de la liaison du ligand et conserve sa fonction de facteur de transcription, pouvant stimuler des gènes cibles du RA et favoriser le développement tumoral[193,194].
Par ailleurs, la lignée LNCaP a un RA avec une mutation T878A dans sa région charnière, conduisant à une augmentation de l'activation du récepteur par la baisse de spécificité pour le ligands[172,173], et la lignée 22Rv1 présente un RA avec une mutation H875Y/H874Y dans son domaine de fixation du ligand, induisant un changement conformationnel dans ce domaine, ainsi qu'une diminution de la spécificité pour les ligands[352]. Du fait de ces mutations pouvant affecter l'effet des anti-androgènes utilisés, lors de nos tests de combinaison de médicaments, avec des cultures cellulaires en 3D, nous avons décidé d'inclure la lignée VCaP, car cette dernière possède un RA non muté. Ainsi ces expériences permettent d'observer l'effet des combinaisons de médicaments dans différents contextes cellulaires : avec le RA muté mais sans le variant RA-V7 (LNCaP), avec le RA muté et le variant RA-V7 (22Rv1) et avec le RA naturel en présence du RA-V7 (VCaP). Les résultats montrent que les combinaisons de médicaments ont un effet synergique dans toutes les lignées cellulaires testées, avec des valeurs plus élevées qu'avec l'effet synergique en 2D. La lignée LNCaP est sensible aux trois combinaisons de traitements comme l'atteste la diminution de sa viabilité cellulaire. La lignée 22Rv1 a une plus

grande résistance aux traitements malgré leur effet synergique meilleur que dans la lignée LNCaP. Nous supposons ici, à nouveau, un impact de l'expression du RA-V7 sur l'effet de nos traitements. Cependant la lignée VCaP, a une réduction plus importante de la viabilité cellulaire que la lignée 22Rv1 (l'expression du variant étant plus faible dans les cellules VCaP). Chaque combinaison de médicaments produit un effet synergique dans la lignée VCaP. Nous pouvons supposer que l'implication d'un RA naturel, sans mutations, peut conduire à potentialiser l'effet de notre combinaison malgré la présence du RA-V7. De plus, il est à noter que nous avons évalué l'efficacité de nos combinaisons de médicaments dans des lignées cellulaires n'exprimant pas le RA. À cet effet, les lignées DU145 et PC3, négatives pour le RA, ont été traitées avec de l'Enzalutamide et/ou l'inhibiteur SB202190. Les résultats montrent que les médicaments, utilisés seuls, n'induisent une diminution de la viabilité cellulaire qu'à de fortes concentrations (IC50 : [50µM] d'Enzalutamide et [10µM] de SB202190 pour la lignée DU145, [50µM] d'Enzalutamide et [20µM] de SB202190 pour la lignée PC3). La combinaison des deux médicaments conduit à un effet antagoniste, qui est associée à une réduction de la viabilité cellulaire mais à des fortes concentrations. Nous supposons que cet antagonisme pourrait être dû à un effet « hors cible » de l'Enzalutamide. En effet, ce composé ne possédant pas de cible moléculaire dans ces lignées cellulaires, pourrait cibler une autre protéine. Cependant ces résultats nous indiquent que la combinaison de médicaments nécessite la présence du RA afin d'avoir un effet synergique.

Régulation de l'activité transcriptionnelle du RA par la MAPK p38

Afin de comprendre le mécanisme d'action de nos traitements, nous avons voulu évaluer l'effet de chaque composé sur l'activité transcriptionnelle du RA. À l'aide d'un modèle de bioluminescence cellulaire, nous avons mesuré le niveau de l'activité transcriptionnelle du RA à partir de l'activité de la luciférase Firefly. Tout d'abord, nous avons testé les inhibiteurs de p38 seuls. Les résultats montrent que ces inhibiteurs conduisent à la réduction de l'activité transcriptionnelle du RA, indépendamment de son niveau d'activation. De plus, les molécules utilisées ne sont pas des agonistes du récepteur des androgènes. Nous avons répété l'expérience avec l'ajout des anti-androgènes, Enzalutamide et Apalutamide. Les deux molécules, utilisées seules, conduisent à une réduction de l'activité transcriptionnelle du RA. De plus, l'association de chaque composé avec un des inhibiteurs de p38 conduit à potentialiser l'effet de l'anti-androgène seul : la réduction de l'activité transcriptionnelle du RA est plus importante. Ces

résultats suggèrent qu'il serait intéressant d'évaluer les effets des inhibiteurs de p38 sur l'activité transcriptionnelle du RA-V7.

Le mécanisme d'action de l'Enzalutamide et de l'Apalutamide est similaire, les deux molécules agissent en inhibant le RA par la déstabilisation de la liaison du ligand, le blocage de sa translocation nucléaire et de sa liaison à l'ADN[39]. Du fait d'un tel processus d'inhibition, les résultats sur la diminution de l'activité transcriptionnelle du RA sont attendus et connus. En ce qui concerne les inhibiteurs de la MAPK p38, ces données démontrent pour la première fois que de telles molécules peuvent induire une réduction de la fonction génomique du RA. Il a été démontré que la MAPK p38 peut interagir avec le RA. Une première étude a démontré que la protéine kinase peut directement phosphoryler le RA au niveau de son résidu Sérine650[379] dans la lignée LNCaP (**Figure 40**)[407]. Cette phosphorylation directe va conduire à moduler la localisation cellulaire du RA et donc son activité transcriptionnelle[104]**.** Quand le RA est activé par sa liaison à la DHT, il va transloquer dans le noyau afin de remplir sa fonction de transactivation. Cependant la MAPK p38, en plus d'une autre kinase, JNK, peuvent interagir avec le RA au sein de noyau et le phosphoryler. Cette modification post-traductionnelle aura pour conséquence de conduire à la sortie du noyau, du RA et donc à la diminution de son activité transcriptionnelle. Il y a donc un lien existant entre la MAPK p38 et le RA.

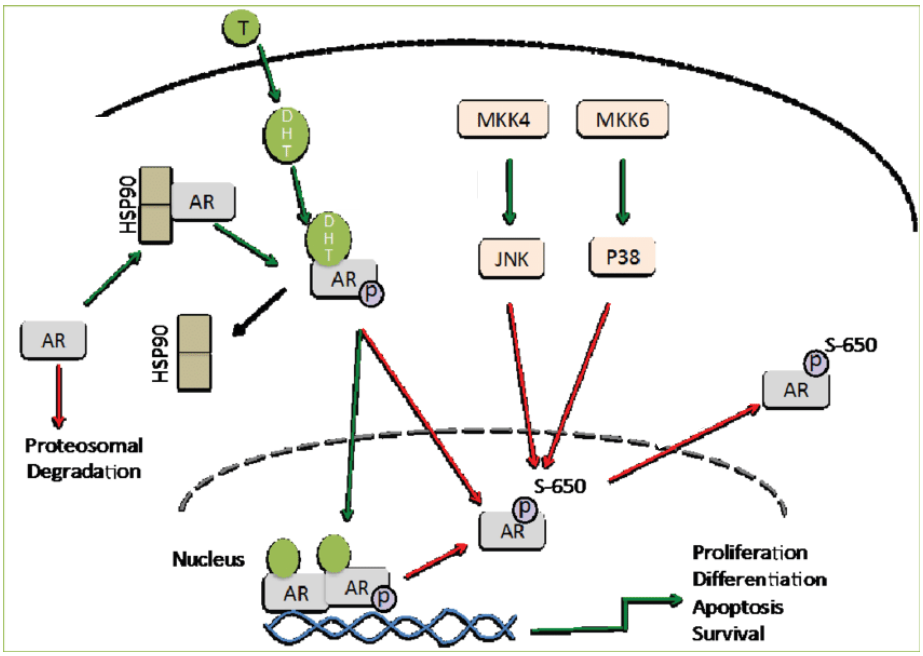


Figure 40 : Phosphorylation du RA par la MAPK p38

Régulation de l'activité transcriptionnelle du RA par la phosphorylation de son résidu Sérine-650 (S-650) conduisant à l'export, hors du noyau, du RA. *AR : Récepteur des androgènes. HSP : Heat-Shock Protein. MKK : MAPK kinase. DHT : Dihydrotestostérone.*

Cependant dans notre contexte d'étude, l'utilisation des inhibiteurs de p38 devraient conduire à augmenter l'activité du RA car ces molécules empêchent la phosphorylation de p38. Mais une autre interaction impliquant la MAPK p38 est à considérer. Le processus durant lequel, le RA se lie à la DHT, induisant sa translocation nucléaire et la transcription des gènes cibles, est qualifié de « voie de signalisation canonique » pour l'activation de ce récepteur. Il existe d'autres voies d'activation du RA et qui dépendent des protéines kinases : c'est la « voie de signalisation non-génomique » (**Figure 41**)[379]. Par exemple, il a été démontré qu'en réponse à des basses concentrations d'androgènes, le RA va s'associer avec la protéine kinase Src, ce qui va déclencher une cascade de signalisation dépendant des MAPK/ERK pour stimuler la prolifération cellulaire. L'activation de la voie de signalisation de Src est dépendante de la concentration en androgènes extracellulaire. Par un processus similaire, nous pourrions formuler l'hypothèse que la voie de signalisation de la MAPK p38 puisse contribuer à la stimulation de l'activation transcriptionnelle du RA.

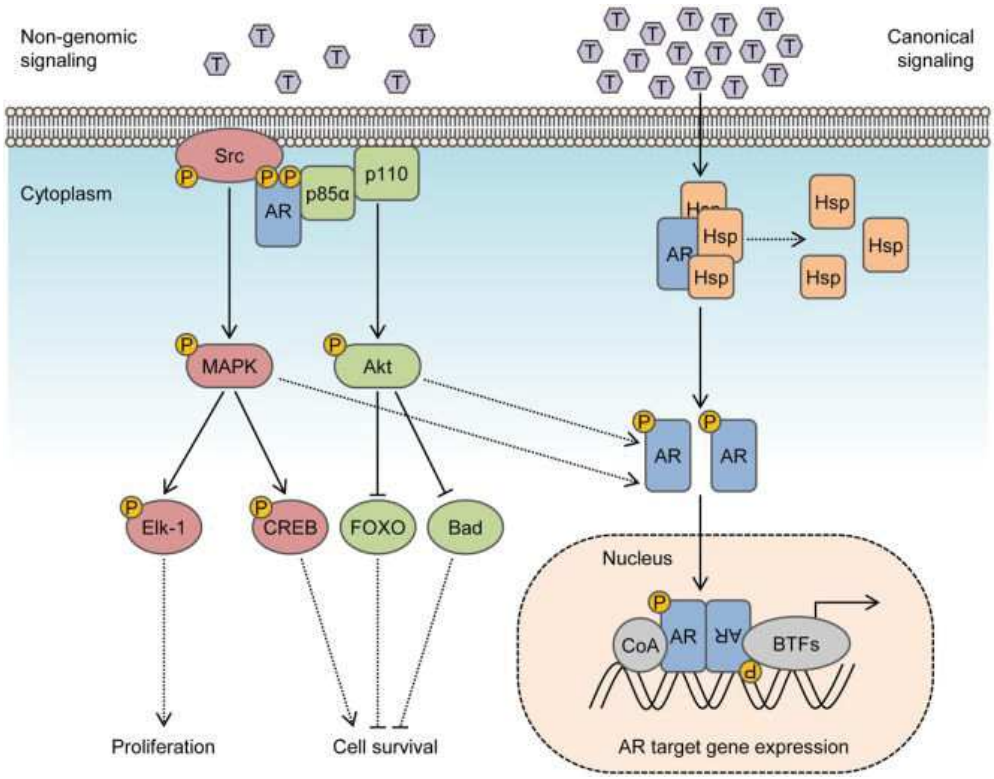


Figure 41 : Voies de signalisation canonique et non-génomique du RA
En réponse aux androgènes, le RA va s'associer avec la protéine kinase Src, ce qui va déclencher une cascade de signalisation dépendant des MAPK/ERK pour stimuler la prolifération cellulaire. *p85α : sous-unité régulatrice de la PIP-3. p110 : sous-unité catalytique de PIP-3.*

Par ailleurs, la MAPK p38 peut réguler l'activité du RA par l'intermédiaire d'autres protéines. La liaison du RA à ses ligands provoque la phosphorylation de la protéine chaperonne HSP27 au niveau de ses résidus Sérine, 15, Sérine 78 et Sérine 82 par la MAPK p38[75–77]. Ainsi l'HSP27 activée, va se lier au RA et permettre sa stabilisation et son transport jusqu'au noyau pour la transactivation de ses gènes cibles[67]. En cas de non-phosphorylation d'HSP27, le RA, après dissociation d'HSP90, sera lié par une ubiquitine ligase afin d'être dégradé par le protéasome. De ce fait, l'activation de la MAPK p38, peut conduire à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du RA par l'intermédiaire de l'HSP27. De plus, une étude a montré que cette protéine chaperonne est aussi impliquée dans l'expression du RA : plus HSP27 est activé, plus la quantité d'ARNm du RA augmente[78].
L'étude du rôle de la protéine HSP27 est actuellement en cours. Nous cherchons à déterminer l'importance de son activation dans la stimulation de l'expression du RA et du RA-V7, dans des lignées LNCaP et 22Rv1, en fonction de nos différents traitements d'anti-androgènes et/ou d'inhibiteurs de p38.

Implication de la MAPK p38 dans la transcription, l'épissage et la dégradation du RA

Afin de comprendre les mécanismes à l'origine de l'effet synergique de nos combinaisons de médicaments, nous nous sommes intéressés à l'expression du variant d'épissage RA-V7, du fait de son implication dans la résistance aux traitements (Enzalutamide et Abiratérone)[222]. Les cellules de la lignée 22Rv1 ont été traitées avec les différents anti-androgènes et inhibiteurs de p38. L'expression du RA-V7 est diminuée quand les cellules sont traitées avec l'inhibiteur SB202190. Cette inhibition est d'autant plus forte lors de l'association avec les anti-androgènes. De plus, il est à noter que nous retrouvons des résultats similaires dans nos expériences, en cours, avec la lignée VCaP. Ainsi les résultats de ces expériences suggèrent que la MAPK p38 est impliquée dans le processus d'épissage alternatif du variant et/ou dans sa biosynthèse ou sa dégradation.
La MAPK p38 joue un rôle dans la stabilité des ARNm. En effet, une étude a montré que cette kinase peut augmenter la stabilité de l'ARNm de $p21^{Cip1}$, une protéine inhibitrice des Cdk, sans altérer la transcription ou la stabilité de la protéine. Pour cela, la MAPK p38 activée, conduit à la phosphorylation de la protéine HuR (*Human antigen R*), ce qui accroit l'accumulation cytoplasmique de cette protéine. Une fois dans le cytoplasme, la protéine HuR va se lier au niveau de la région AREs (*Adenylate-Uridylate Rich Elements*) en 3'UTR de l'ARNm de p21[408]. Cette interaction « HuR-ARNm p21 » conduit à une inhibition du processus de

dégradation de la molécule d'ARNm via la blocage de la phase de déadénylation au niveau des région AREs (**Figure 42.A**)[409]. Une autre étude a montré que la phosphorylation de la Tristetraproline (TTP), une protéine se liant aux AREs, provoque la déadénylation de l'ARNm et donc la dégradation des transcrits[410]. En effet, il a été démontré qu'en conditions normales, la MAPK p38 n'est pas activée et n'induit donc pas la phosphorylation de la TTP, via son substrat MK2. L'absence de phosphorylation de la protéine TTP, lui permet de rentrer en compétition avec la protéine HuR pour la fixation sur les AREs de l'ARNm. En cas de liaison à cette région, la protéine TTP conduit au recrutement des enzymes impliquées dans la dégradation des transcrits (**Figure 42.B**). Cependant si la MAPK p38 est activée, la cascade de phosphorylation conduit à la séquestration de TTP par la protéine 14-3-3 (protéine chaperonne), ce qui facilite la fixation d'HuR et augmente la stabilité des mRNAs, tout en stimulant le processus de traduction.

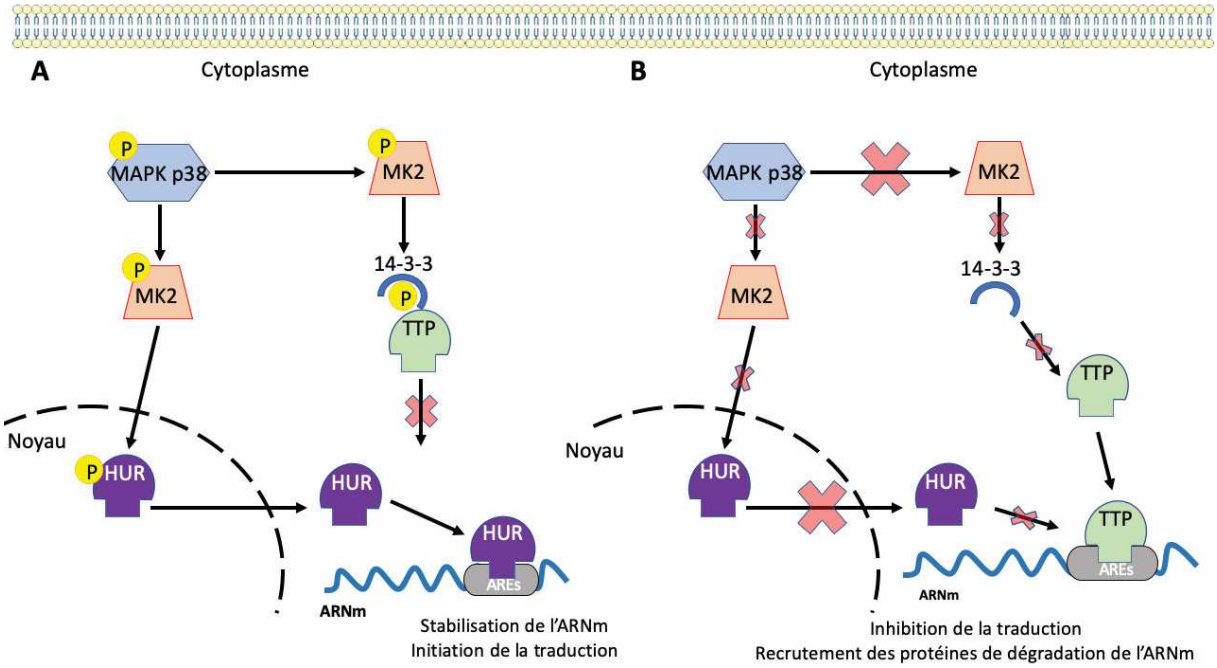


Figure 42 : Interactions entre la voie de signalisation de la MAPK p38-MK2, HuR et Tristetraproline

A. L'activation de la MAPK p38 conduit à la phosphorylation de sa cible MK2. La protéine MK2 phosphoryle la Tristetraproline, qui se retrouve séquestrée par la protéine 14-3-3, et la protéine HuR, conduisant à la stimulation de son processus de délocalisation dans le cytoplasme et sa fixation sur les AREs de l'ARNm. Cette fixation participe à la stabilisation du transcrit et induit la stimulation de l'initiation de la traduction. **B.** En l'absence d'activation de la MAPK p38, son substrat MK2 n'est pas phosphorylé et il n'y a pas de cascade d'activation. La Tristetraproline, non phosphorylé et non séquestrée, est capable de rentrer en compétition avec la protéine HuR pour la fixation sur les AREs en 3' UTR de l'ARNm. La fixation de la Tristetraproline induit le recrutement des protéines de dégradation de l'ARNm.

HuR : Human antigen R. MK2 : MAP kinase-activated protein kinase-2. TTP : Tristetraproline. AREs : Adenylate-Uridylate Rich Elements

Par ailleurs, une étude a montré que l'ARNm du RA contient une région hautement conservée, riche en Uracile et Cytosine, permettant l'interaction avec des protéines liant les ARN, dont la protéine HuR[411]. Ainsi du fait du rôle de la MAPK p38 dans la stabilité des ARNm quand elle est activée, par l'intermédiaire de la protéine HuR, nous supposons que les inhibiteurs de la MAPK p38 pourraient avoir un effet sur le temps de demi-vie du RA-V7. Ainsi le blocage de l'activité de p38 aurait pour répercussion d'augmenter le processus de dégradation de l'ARNm du RA-V7 et donc de réduire son niveau d'expression. Une étude par PCR quantitative est en cours au laboratoire afin de comparer le niveau d'expression du RA et du RA-V7 en fonction des différents traitements.

L'activation du facteur de transcription NF-κB a été impliquée dans l'augmentation de l'expression de V-RA. Une étude a montré que la surexpression de NF-κB conduisait à activer le promoteur du RA, provoquant une augmentation de la prolifération cellulaire dans la lignée LNCaP[412,413]. De plus, l'activation de NF-κB/p52 est associée à la stimulation de la translocation nucléaire du RA ainsi que de son activation. Les protéines NF-κB/p52 permettent d'interagir avec le domaine NH(2)-terminal du RA et conduit à augmenter le recrutement de co-activateurs, tels que p300, au niveau des promoteurs des gènes cibles du RA[414–416] (**Figure 43**).

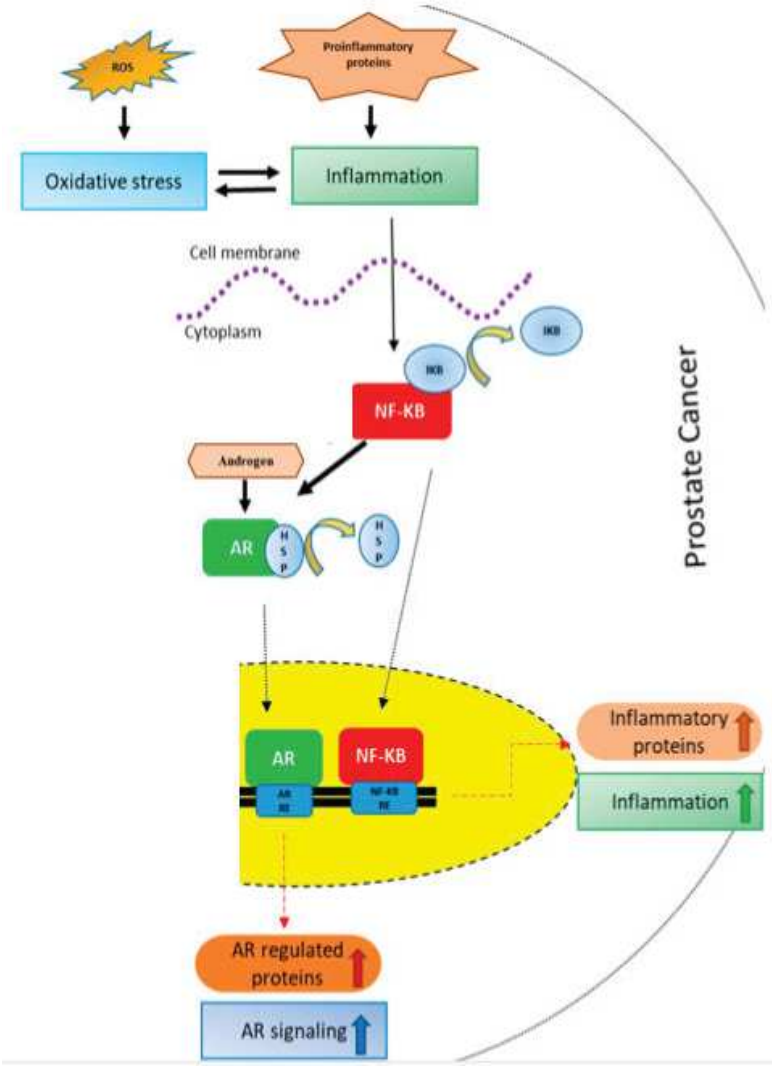


Figure 43 : Interaction entre NF-κB et le RA dans le CaP
Des signaux d'inflammation induisent l'activation et la translocation nucléaire de NF-κB après sa dissociation de IκB. NF-κB se lie à ses éléments de réponse conduisant à la synthèse de protéines proinflammatoires. La fixation de NF-κB peut activer la voie de signalisation du RA. Dissociation des HSP liés au RA suivi de la translocation nucléaire du RA et transcription de ses gènes cibles.

Ainsi, l'expression de NF-κB conduit à augmenter l'activité du RA mais aussi la production de V-RA, en particulier le RA-V7[417,418]. Ceci a pour conséquence de promouvoir la résistance aux traitements, dont l'Enzalutamide[201,419]. Inversement, il est possible de rétablir la sensibilité de lignées cellulaires résistantes à la castration par l'inhibition de la voie NF-κB[202]. Par ailleurs, il a été montré que la MAPK p38 peut stimuler l'activation de NF-κB[420–423]. Tout comme, l'inhibition de la MAPK p38 peut aussi conduire à la réduction de l'activité transcriptionnelle de NF-κB et diminuer l'expression de ses gènes cibles[424–427]. Du fait de ce lien entre le RA, le facteur de transcription NF-κB et la MAPK p38, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'utilisation d'inhibiteur de p38 provoque la diminution de l'activité transcriptionnelle de NF-

κB, avec pour conséquence de réduire l'expression du RA et du RA-V7. Cet effet combiné à l'action des anti-androgènes, l'activité transcriptionnelle du RA est plus fortement inhibée, ce qui conduit à notre effet synergique.

Outre ce rôle de régulateur d'expression du RA, le FT NF-κB interagit aussi avec les protéines de la famille hnRNP (*heterogeneous ribonucleoprotein*), ces facteurs d'épissage sont impliqués dans la régulation de la transcription, de la traduction et de l'épissage alternatif[428] . Par exemple, la voie NF-κB contrôle l'expression des protéines hnRNPA1 et hnRNP12 et peut conduire à une diminution de l'expression protéiques du RA et du RA-V7 dans des lignées 22Rv1 et VCaP[203]. Une autre étude a montré que les protéines hnRNP1 et hnRNPH1 peuvent s'associer directement au locus du gène du RA et favoriser l'expression du RA et du RA-V7[204,205]. De plus, l'inhibition de l'expression du facteur d'épissage hnRNPA1 conduit à un effet thérapeutique. Une étude a montré que l'utilisation de Quercetin, un composé polyphénolique ciblant hnRNPA1, conduisait à réduire le niveau d'expression du RA-V7 et sensibilisait, de nouveau, les cellules à l'Enzalutamide[429]. De plus, le blocage de l'expression d'hnRNPA1 diminue la survie cellulaire[430]. Une autre étude a montré que le ciblage de ce facteur d'épissage conduit à diminuer le niveau d'expression d'ARNm du RA-V7 dans la lignée 22Rv1[431]. Par ailleurs, la MAPK p38 est capable d'induire la délocalisation de ce facteur d'épissage, situé dans le noyau, ce qui a pour conséquence d'altérer le processus d'épissage alternatif[432]. En effet, dans cette étude, l'épissage alternatif est dépendant du ratio de protéines hnRNPA1/ASF-SF2 (SRSF1). Le facteur d'épissage hnRNPA1 peut être transporté entre le noyau et le cytoplasme. Ainsi en fonction de la quantité de chaque protéine, le processus d'épissage sera altéré[433] (**Figure 44**).

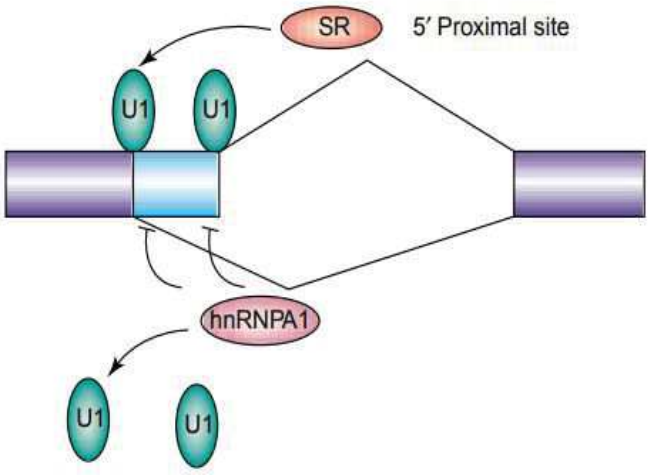


Figure 44 : Interactions entre les protéines ASF-SF2 et hnRNPA1
Compétition entre les protéines ASF-SF2 et hnRNPA1 pour la liaison au pré-ARNm, au niveau des sites 5' proximaux d'épissage. La fixation de ASF-SF2 stimule la liaison d'U1 tandis qu'hnRNP A1 interfère avec la liaison d'U1. *U1 : Petite sous-unité du spliceosome. SR : ASF-SF2*

Une autre étude a démontré que des facteurs d'épissage, SRSF1 (ASF/SF2) et U2AF65, peuvent s'associer au pré-ARNm du RA, pour favoriser l'épissage du RA-V7. Ainsi, dans des lignées LNCaP95, cibler ces facteurs induit une diminution d'expression du RA-V7[205]. Il a été aussi montré que le facteur d'épissage hnRNPA1 peut être recruté au niveau d'épissage du RA-V7 dans les lignées du CaP résistantes[203].
Du fait de l'ensemble de ces données, nous suggérons un suivi de la localisation subcellulaire des différents facteurs d'épissage évoqués (hnRNPA1, ASF/SF2, U2AF65) après traitement (par les anti-androgènes et/ou inhibiteurs de p38). De plus, l'étude du recrutement de ces protéines sur le seul site d'épissage du RA-V7 par immunoprécipitation d'ARN est importante car cela permettrait de déterminer si les traitements peuvent conduire à un recrutement différentiel de ces facteurs d'épissage au niveau du locus du gène RA. Ainsi, nous supposons que le traitement avec l'inhibiteur de p38 pourrait conduire à modifier le processus d'épissage, de sorte à inhiber la traduction du RA-V7, d'où son expression réduite avec l'utilisation des inhibiteurs de p38.

Par ailleurs, si nous parvenons à démontrer un rôle de la MAPK p38 dans l'épissage du RA-V7, un autre niveau de régulation pourrait approfondir notre compréhension du mécanisme d'action de l'inhibition de p38 sur l'expression du RA-V7 : des modifications épigénétiques. Les modifications d'histones peuvent affecter le processus d'épissage alternatif et donc affecter la biosynthèse de variants d'épissage. Parmi ces différentes marques épigénétiques, nous

pouvons évoquer la marque H3K9me2/H3K9me3, la marque H3K36me3 et l'acétylation des histones[434] (**Figure 45**). La présence de la double/triple méthylation de la lysine 9 de l'Histone H3 est associée à une augmentation de l'inclusion d'exons alternatifs, favorisant la production de variants d'épissage. En effet, cette H3K9me3 peut être reconnue par les protéines HP1γ/HP1α (*Heterochromatin Protein 1 gamma/alpha*), qui, une fois fixées à l'histone, induisent un ralentissement local de la polymérase II et donc de la transcription. Ceci contribue à augmenter la probabilité d'inclusion d'exons alternatifs par la polymérase II[435,436] (**Figure 45.A**). Cependant cette protéine HP1γ ne peut rester fixée à la chromatine, malgré la présence de la marque, si l'histone H3 est phosphorylé[437]. Or une étude a démontré que la protéine MAPK p38 était capable d'induire la phosphorylation de l'histone H3[438]. Ainsi cette protéine kinase, à travers son activation, pourrait induire une altération de l'épissage alternatif. L'acétylation peut induire des changements locaux au niveau de la chromatine avec pour conséquence une accélération du processus de transcription réalisée par la polymérase II. Ainsi les probabilités d'exclusion d'un exon alternatif sont augmentées[439] (**Figure 45.B**). La triple méthylation de la lysine 3 de l'Histone H3 influence l'épissage alternatif. Une étude a montré que cette marque est reconnue par la protéine MRG15 (*MORF-related gene 15*) et que sa fixation conduit au recrutement de la protéine PTB (*Polypyrimidine Tract-Binding protein*) au niveau du site d'épissage d'un exon alternatif. Cette interaction aura pour conséquence d'exclure l'exon lié par PTB (**Figure 45.C**). Il est intéressant de noter que PTB appartient à la famille des protéines hnRNPs (hnRNP I)[440]. Cette même marque H3K36me3 peut aussi être reconnue par une autre protéine Psip1 (*PC4 and SRSF1 interacting protein 1*) pour la régulation de l'épissage alternatif. La fixation de Psip1 induit le recrutement de SRSF1 et sa liaison au pré-ARNm au niveau du site d'épissage d'un exon alternatif. Ainsi SRSF1 influence l'épissage alternatif par la rétention d'un exon alternatif (**Figure 45.D**).

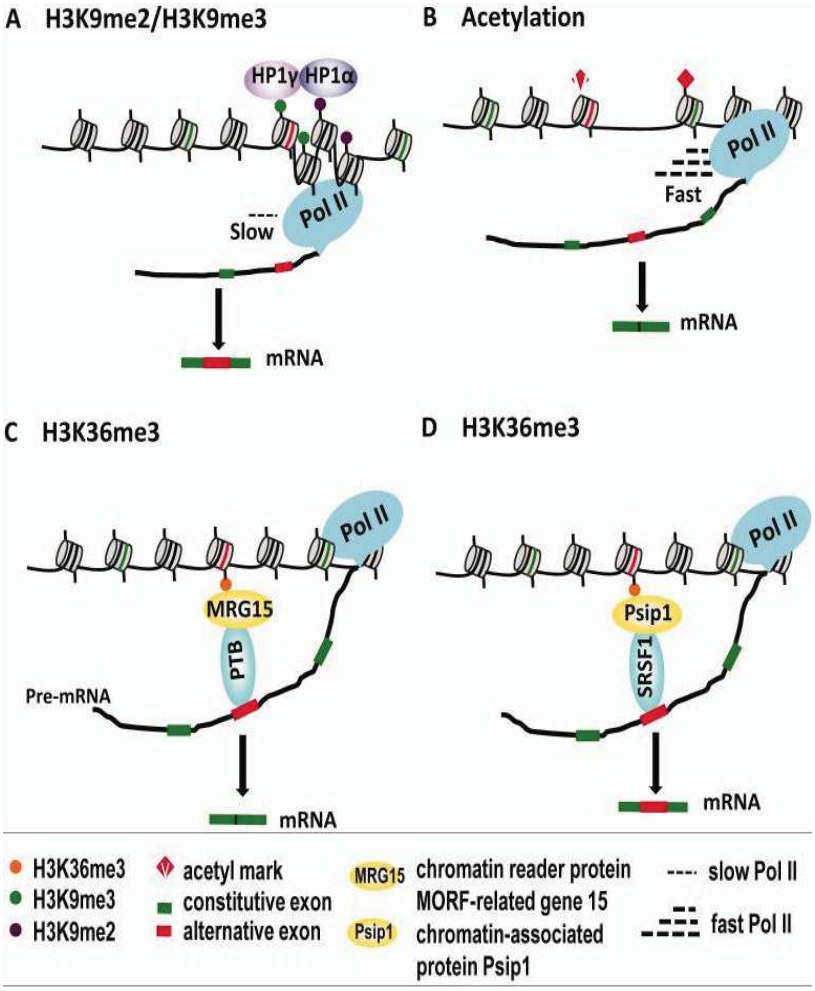


Figure 45 : Exemples de modifications d'histones pouvant altérer l'épissage alternatif
A. La marque K3K9me2/3 est reconnue par les protéines HP1gamma/alpha. Ceci conduit à un ralentissement local de la polymérase II et à l'inclusion d'un exon alternatif. **B.** L'acétylation induit des changements locaux de la chromatine, permettant d'accélérer le processus de transcription. Il y a exclusion d'un exon alternatif. **C.** La marque H3K36me3 est reconnue par MRG15, recrutant PTB pour favoriser l'exclusion d'un exon alternatif. **D.** Cette marque H3K36me3 peut aussi être reconnue par PsiP1, conduisant au recrutement de SRSF1. Il y a rétention d'un exon alternatif.

L'ensemble de ces données suggère qu'il serait intéressant d'évaluer les potentielles modifications épigénétiques lors d'un traitement avec nos différents composés (anti-androgènes et/ou inhibiteur de p38). Une étude par immunoprécipitation de chromatine, au niveau de locus du gène du RA, nous permettrait de déterminer si chaque traitement utilisé est associable à une signature épigénétique, qui nous permettrait de faire un lien avec l'épissage alternatif.

Conclusion générale

Conclusion générale

Mes travaux de thèse avaient pour but d'identifier de nouvelles cibles moléculaires afin de pouvoir améliorer les effets thérapeutiques de l'Enzalutamide ou de contrer l'émergence de la résistance à cette molécule. Suite à la découverte de l'activation de la MAPK p38 en réponse à un traitement avec l'Enzalutamide, nous avons testé les effets d'une inhibition de la MAPK p38 avec l'association d'Enzalutamide. Les résultats concluant un effet synergique de cette association, nous ont encouragés à diversifier nos combinaisons de traitement aussi bien pour les anti-androgènes (Enzalutamide, Apalutamide et Abiratérone) que pour les inhibiteurs de p38 (SB202190, LY2228820 et ARRY-614).

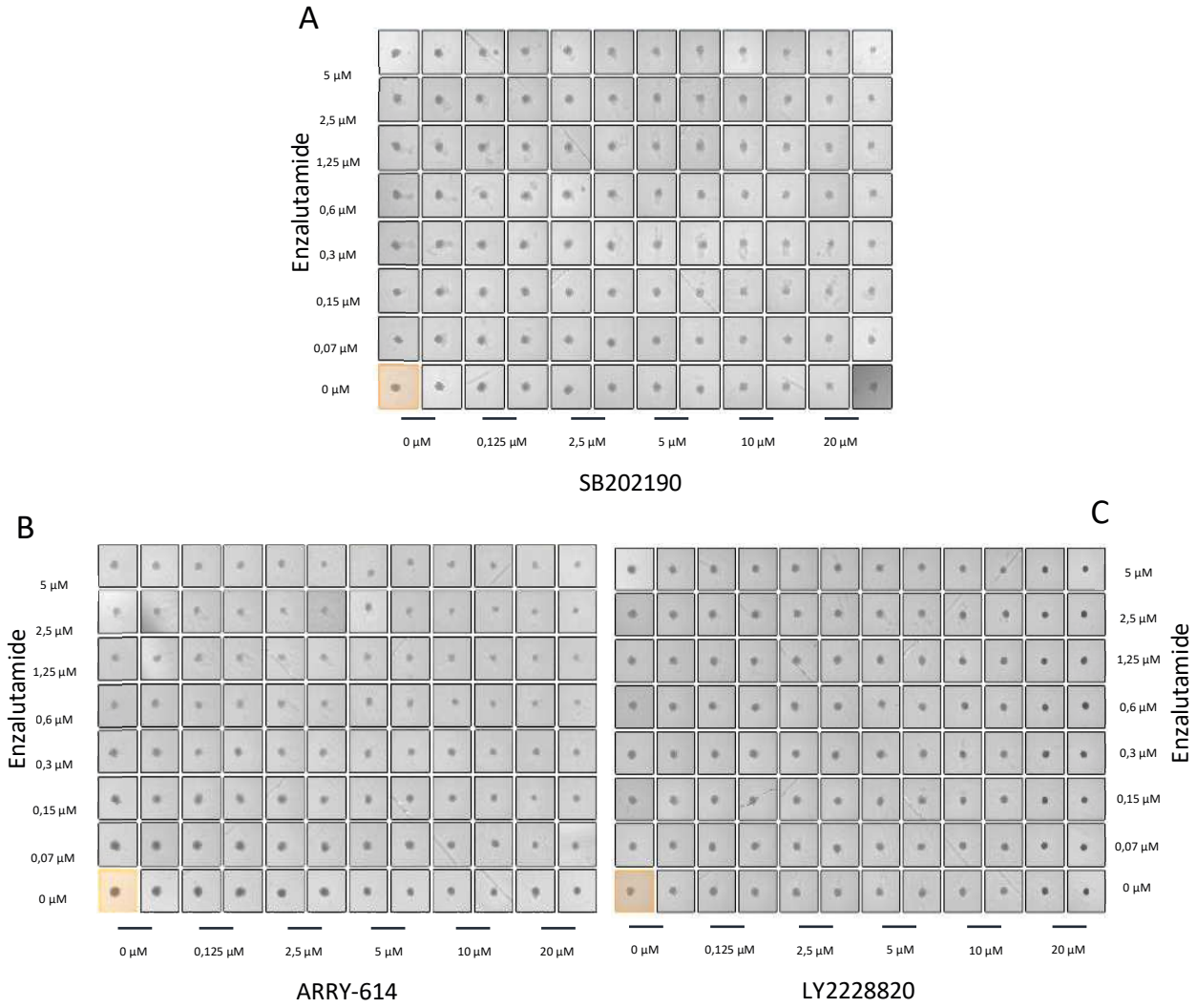
Ainsi pour nos diverses associations de médicaments, nous avons pu mettre en évidence un effet synergique pour chacune d'entre elles. L'inhibition de la MAPK p38 couplée au blocage de la voie de signalisation du RA conduit à un effet synergique et cytotoxique. De plus, l'ensemble des combinaisons utilisé, et présentant une action antitumorale, suggère un potentiel élargissement de nos possibilités d'alternatives thérapeutiques pour la mise en place d'un essai clinique.

Dans le but de mieux caractériser le mécanisme d'action des combinaisons de médicaments, nous avons évalué leur effet sur l'expression du RA mais aussi de son variant RA-V7, dont les nombreuses études renforcent son implication dans la résistance à l'Enzalutamide[69,222,229]. Les résultats furent surprenants car nous avons découverts que des inhibiteurs de p38 peuvent induire une diminution de l'activité transcriptionnelle du RA. De plus, ces mêmes inhibiteurs conduisent à une réduction de l'expression du RA-V7. De ces expériences, nous avons donc une potentielle thérapie pouvant à la fois, prévenir l'activation du RA, facteur clé de la progression tumorale, mais aussi bloquer l'expression du RA-V7, une cause avérée de la résistance à la déprivation androgénique. De ce fait, la combinaison d'anti-androgènes et d'inhibiteur de p38 pourrait conduire à la mise en place d'une stratégie thérapeutique prometteuse pour les patients atteints de CaP.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Diminution du diamètre des sphéroïdes par la combinaison de traitement Enzalutamide et inhibiteurs de p38 pour la lignée 22Rv1. **A.** Traitement de la lignée LNCaP avec la combinaison Enzalutamide + SB202190. **B.** Traitement de la lignée LNCaP avec la combinaison Enzalutamide + Arry-614. **C.** Traitement de la lignée LNCaP avec la combinaison Enzalutamide + Ly228820. **C.** Évaluation de la viabilité cellulaire par CellTiter-Glo après traitement avec Enzalutamide + Arry-614. *Capture d'image des puits des plaques 96 puits, observés en champ clair par Celigo*



Références bibliographiques

1. La prostate : Généralités. *Prostate* Available at: https://www.prostate.fr/prostate/generalites/. (Accessed: 8th May 2019)
2. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 / 2019 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil. Available at: http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2019/Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-2018. (Accessed: 17th April 2019)
3. Neupane, S., Bray, F. & Auvinen, A. National economic and development indicators and international variation in prostate cancer incidence and mortality: an ecological analysis. *World J. Urol.* **35**, 851–858 (2017).
4. Goss, P. E. *et al.* Challenges to effective cancer control in China, India, and Russia. *Lancet Oncol.* **15**, 489–538 (2014).
5. Johns, L. E. & Houlston, R. S. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int.* **91**, 789–794 (2003).
6. Leongamornlert, D. *et al.* Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br. J. Cancer* **106**, 1697–1701 (2012).
7. Castro, E. *et al.* Germline BRCA Mutations Are Associated With Higher Risk of Nodal Involvement, Distant Metastasis, and Poor Survival Outcomes in Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1748–1757 (2013).
8. Mersch, J. *et al.* Cancers Associated with BRCA1 and BRCA2 Mutations other than Breast and Ovarian. *Cancer* **121**, 269–275 (2015).
9. Germline Mutations in HOXB13 and Prostate-Cancer Risk | NEJM. *New England Journal of Medicine* Available at: https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1110000?articleTools=true. (Accessed: 8th May 2019)
10. Laurent, V. *et al.* Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
11. Gleason, D. F. & Mellinger, G. T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.* **111**, 58–64 (1974).
12. L'anatomopathologie. *Prostanet* Available at: https://prostanet.com/cancer-prostate/le-diagnostic/l-anatomopathologie/. (Accessed: 8th May 2019)
13. Epstein, J. I., Egevad, L., Srigley, J. R. & Humphrey, P. A. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* **40**, 9 (2016).
14. D'Amico, A. V. *et al.* Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *JAMA* **280**, 969–974 (1998).
15. Parker, C., Gillessen, S., Heidenreich, A. & Horwich, A. Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **26**, v69–v77 (2015).
16. EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer - European Urology. Available at: https://www.europeanurology.com/article/S0302-2838(11)00046-7/pdf. (Accessed: 23rd May 2019)
17. Carter, H. B. *et al.* Expectant Management of Prostate Cancer With Curative Intent:

An Update of The Johns Hopkins Experience. *J. Urol.* **178**, 2359–2365 (2007).
18. Albertsen, P. Observational studies and the natural history of screen-detected prostate cancer. *Curr. Opin. Urol.* **25**, 232–237 (2015).
19. Movember Foundation's Global Action Plan Prostate Cancer Active Surveillance (GAP3) consortium *et al.* Semantics in active surveillance for men with localized prostate cancer — results of a modified Delphi consensus procedure. *Nat. Rev. Urol.* **14**, 312–322 (2017).
20. Huggins, C. & Hodges, C. V. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J. Urol.* **168**, 9–12 (2002).
21. Huggins, C., Stevens, R. E. & Hodges, C. V. STUDIES ON PROSTATIC CANCER: II. THE EFFECTS OF CASTRATION ON ADVANCED CARCINOMA OF THE PROSTATE GLAND. *Arch. Surg.* **43**, 209–223 (1941).
22. Hormonothérapie - Cancer de la prostate. Available at: https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-de-la-prostate/Hormonotherapie#toc-types-d-hormonoth-rapie. (Accessed: 9th May 2019)
23. InfoCancer - ARCAGY - GINECO – Traitements du cancer – Traitements systémiques – Hormonothérapie - Dans le cancer prostatique. Available at: http://www.arcagy.org/infocancer/traitement-du-cancer/traitements-systemiques/hormonotherapie/dans-le-cancer-prostatique.html/. (Accessed: 9th May 2019)
24. l'Urologie, M. de. Chapitre 16 - Tumeurs de la prostate. (2016). Available at: https://www.urofrance.org/congres-et-formations/formation-initiale/referentiel-du-college/tumeurs-de-la-prostate.html. (Accessed: 25th July 2019)
25. Harris, W. P., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S. & Montgomery, B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **6**, 76–85 (2009).
26. Cookson, M. S. *et al.* Castration-Resistant Prostate Cancer: AUA Guideline. *J. Urol.* (2013).
27. Hotte, S. J. & Saad, F. Current management of castrate-resistant prostate cancer. *Curr. Oncol.* **17**, S72–S79 (2010).
28. Bono, J. S. de *et al.* Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *The Lancet* **376**, 1147–1154 (2010).
29. Tannock, I. F., Horti, J., Oudard, S., James, N. D. & Rosenthal, M. A. Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 11 (2004).
30. Petrylak, D. P., Lara, P. N., Burch, P. A., Kohli, M. & Raghavan, D. Docetaxel and Estramustine Compared with Mitoxantrone and Prednisone for Advanced Refractory Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 8 (2004).
31. Gravis, G. *et al.* Androgen Deprivation Therapy (ADT) Plus Docetaxel Versus ADT Alone in Metastatic Non castrate Prostate Cancer: Impact of Metastatic Burden and Long-term Survival Analysis of the Randomized Phase 3 GETUG-AFU15 Trial. *Eur. Urol.* **70**, 256–262 (2016).
32. Sweeney, C. J. *et al.* Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 737–746 (2015).
33. Sweeney, C. *et al.* Long term efficacy and QOL data of chemohormonal therapy (C-HT) in low and high volume hormone naïve metastatic prostate cancer (PrCa): E3805 CHAARTED trial. *Ann. Oncol.* **27**, (2016).
34. James, N. D. *et al.* Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive,

multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **387**, 1163–1177 (2016).
35. Vale, C. L. *et al.* Addition of docetaxel or bisphosphonates to standard of care in men with localised or metastatic, hormone-sensitive prostate cancer: a systematic review and meta-analyses of aggregate data. *Lancet Oncol.* **17**, 243–256 (2016).
36. Oudard, S. *et al.* Cabazitaxel Versus Docetaxel As First-Line Therapy for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial—FIRSTANA. *J. Clin. Oncol.* (2017). doi:10.1200/JCO.2016.72.1068
37. Ruizeveld de Winter, J. A. *et al.* Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am. J. Pathol.* **144**, 735–746 (1994).
38. Holzbeierlein, J. *et al.* Gene Expression Analysis of Human Prostate Carcinoma during Hormonal Therapy Identifies Androgen-Responsive Genes and Mechanisms of Therapy Resistance. *Am. J. Pathol.* **164**, 217–227 (2004).
39. Watson, P. A., Arora, V. K. & Sawyers, C. L. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 701–711 (2015).
40. Hoy, S. M. Abiraterone Acetate: A Review of Its Use in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Drugs* **73**, 2077–2091 (2013).
41. Scott, L. J. Abiraterone Acetate: A Review in Metastatic Castration-Resistant Prostrate Cancer. *Drugs* **77**, 1565–1576 (2017).
42. Fizazi, K. *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.* **13**, 983–992 (2012).
43. Ryan, C. J. *et al.* Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **368**, 138–148 (2013).
44. Ryan, C. J. *et al.* Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naive men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* **16**, 152–160 (2015).
45. Fizazi, K. *et al.* Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **377**, 352–360 (2017).
46. Damodaran, S., Lang, J. M. & Jarrard, D. F. Targeting Metastatic Hormone Sensitive Prostate Cancer: Chemohormonal Therapy and New Combinatorial Approaches. *J. Urol.* **201**, 876–885 (2019).
47. Bohl, C. E., Gao, W., Miller, D. D., Bell, C. E. & Dalton, J. T. Structural basis for antagonism and resistance of bicalutamide in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6201–6206 (2005).
48. Hara, T. *et al.* Novel Mutations of Androgen Receptor: A Possible Mechanism of Bicalutamide Withdrawal Syndrome. 6
49. Tran, C. *et al.* Development of a Second-Generation Antiandrogen for Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Science* **324**, 787–790 (2009).
50. Guerrero, J., Alfaro, I. E., Gómez, F., Protter, A. A. & Bernales, S. Enzalutamide, an androgen receptor signaling inhibitor, induces tumor regression in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. *The Prostate* **73**, 1291–1305 (2013).
51. Laëtitia, M.-G. Haute Autorité de santé. 64
52. Scher, H. I. *et al.* Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1187–1197 (2012).
53. Beer, T. M. *et al.* Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **371**, 424–433 (2014).
54. Parker, C. *et al.* Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 213–223 (2013).

55. Abate-Shen, C. & Shen, M. M. Molecular genetics of prostate cancer. 26
56. Dohle, G. R., Smit, M. & Weber, R. F. A. Androgens and male fertility. *World J. Urol.* **21**, 341–345 (2003).
57. Li, J. & Al-Azzawi, F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* **63**, 142–148 (2009).
58. Lu, J., der Steen, T. V. & Tindall, D. J. Are androgen receptor variants a substitute for the full-length receptor? *Nat. Rev. Urol.* **12**, 137–144 (2015).
59. Mangelsdorf, D. J. *et al.* The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* **83**, 835–839 (1995).
60. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* **97**, 161–163 (1999).
61. Dehm, S. M. & Tindall, D. J. Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2855–2863 (2007).
62. McEwan, I. J. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr. Relat. Cancer* **11**, 281–293 (2004).
63. Schreyer, E. *et al.* Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate. *médecine/sciences* **33**, 758–764 (2017).
64. Batista, R. L. *et al.* Androgen insensitivity syndrome: a review. *Arch. Endocrinol. Metab.* **62**, 227–235 (2018).
65. Gelmann, E. P. Molecular Biology of the Androgen Receptor. *J. Clin. Oncol.* (2016). doi:10.1200/JCO.2002.10.018
66. Uo, T., Plymate, S. R. & Sprenger, C. C. The potential of AR-V7 as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* **22**, 201–216 (2018).
67. Zoubeidi, A. *et al.* Cooperative Interactions between Androgen Receptor (AR) and Heat-Shock Protein 27 Facilitate AR Transcriptional Activity. *Cancer Res.* **67**, 10455–10465 (2007).
68. Shafi, A. A., Cox, M. B. & Weigel, N. L. Androgen Receptor Splice Variants are Resistant to Inhibitors of Hsp90 and FKBP52, which alter Androgen Receptor Activity and Expression. *Steroids* **78**, 548–554 (2013).
69. Jentzmik, F., Azoitei, A., Zengerling, F., Damjanoski, I. & Cronauer, M. V. Androgen receptor aberrations in the era of abiraterone and enzalutamide. *World J. Urol.* **34**, 297–303 (2016).
70. Langley, E., Kemppainen, J. A. & Wilson, E. M. Intermolecular NH_2 -/Carboxyl-terminal Interactions in Androgen Receptor Dimerization Revealed by Mutations That Cause Androgen Insensitivity. *J. Biol. Chem.* **273**, 92–101 (1998).
71. Cutress, M. L., Whitaker, H. C., Mills, I. G., Stewart, M. & Neal, D. E. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J. Cell Sci.* **121**, 957–968 (2008).
72. Ni, L. *et al.* Androgen Induces a Switch from Cytoplasmic Retention to Nuclear Import of the Androgen Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4766–4778 (2013).
73. Coffey, K. & Robson, C. N. Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *J. Endocrinol.* **215**, 221–237 (2012).
74. Gioeli, D. & Paschal, B. M. Post-translational modification of the androgen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **352**, 70–78 (2012).
75. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P. & Gaestel, M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* **313**, 307–313 (1992).
76. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. - PubMed - NCBI. Available at: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/7923353?dopt=Abstract. (Accessed: 8th July 2019)

77. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiol. Rev.* **79**, 143–180 (1999).
78. Stope, M. B. *et al.* Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. *World J. Urol.* **30**, 327–331 (2012).
79. Xu, L., Chen, S. & Bergan, R. C. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* **25**, 2987–2998 (2006).
80. Chen, L., Fang, B., Giorgianni, F., Gingrich, J. R. & Beranova-Giorgianni, S. Investigation of phosphoprotein signatures of archived prostate cancer tissue specimens via proteomic analysis. *Electrophoresis* **32**, 1984–1991 (2011).
81. Koryakina, Y., Ta, H. Q. & Gioeli, D. Phosphorylation of the Androgen Receptor. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, T131–T145 (2014).
82. Koryakina, Y., Ta, H. Q. & Gioeli, D. Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, T131–T145 (2014).
83. Gioeli, D. *et al.* Androgen Receptor Phosphorylation: REGULATION AND IDENTIFICATION OF THE PHOSPHORYLATION SITES. *J. Biol. Chem.* **277**, 29304–29314 (2002).
84. Yang, C.-S. *et al.* Ligand Binding to the Androgen Receptor Induces Conformational Changes That Regulate Phosphatase Interactions. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3390–3404 (2007).
85. Chen, S., Xu, Y., Yuan, X., Bubley, G. J. & Balk, S. P. Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15969–15974 (2006).
86. Gordon, V. *et al.* CDK9 Regulates AR Promoter Selectivity and Cell Growth through Serine 81 Phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* **24**, 2267–2280 (2010).
87. Hsu, F.-N. *et al.* Regulation of Androgen Receptor and Prostate Cancer Growth by Cyclin-dependent Kinase 5. *J. Biol. Chem.* **286**, 33141–33149 (2011).
88. Chen, S., Gulla, S., Cai, C. & Balk, S. P. Androgen Receptor Serine 81 Phosphorylation Mediates Chromatin Binding and Transcriptional Activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 8571–8583 (2012).
89. Lin, H.-K., Yeh, S., Kang, H.-Y. & Chang, C. Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7200–7205 (2001).
90. Deep, G., Oberlies, N. H., Kroll, D. J. & Agarwal, R. Isosilybin B causes androgen receptor degradation in human prostate carcinoma cells via PI3K-Akt-Mdm2-mediated pathway. *Oncogene* **27**, 3986–3998 (2008).
91. Linn, D. E. *et al.* Differential Regulation of Androgen Receptor by PIM-1 Kinases via Phosphorylation-dependent Recruitment of Distinct Ubiquitin E3 Ligases. *J. Biol. Chem.* **287**, 22959–22968 (2012).
92. Ha, S. *et al.* Phosphorylation of the Androgen Receptor by PIM1 in Hormone Refractory Prostate Cancer. *Oncogene* **32**, 3992–4000 (2013).
93. McCall, P., Gemmell, L. K., Mukherjee, R., Bartlett, J. M. S. & Edwards, J. Phosphorylation of the androgen receptor is associated with reduced survival in hormone-refractory prostate cancer patients. *Br. J. Cancer* **98**, 1094–1101 (2008).
94. Mahajan, N. P., Whang, Y. E., Mohler, J. L. & Earp, H. S. Activated Tyrosine Kinase Ack1 Promotes Prostate Tumorigenesis: Role of Ack1 in Polyubiquitination of Tumor Suppressor Wwox. *Cancer Res.* **65**, 10514–10523 (2005).
95. Mahajan, N. P. *et al.* Activated Cdc42-associated kinase Ack1 promotes prostate cancer progression via androgen receptor tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8438–8443 (2007).

96. Mahajan, K. *et al.* Effect of Ack1 Tyrosine Kinase Inhibitor on Ligand-Independent Androgen Receptor Activity. *The Prostate* **70**, 1274–1285 (2010).
97. Zong, H. *et al.* Cyclin D3/CDK11p58 Complex Is Involved in the Repression of Androgen Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7125–7142 (2007).
98. McCall, P. *et al.* Androgen Receptor Phosphorylation at Serine 308 and Serine 791 Predicts Enhanced Survival in Castrate Resistant Prostate Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 16656–16671 (2013).
99. Chymkowitch, P., Le May, N., Charneau, P., Compe, E. & Egly, J.-M. The phosphorylation of the androgen receptor by TFIIH directs the ubiquitin/proteasome process. *EMBO J.* **30**, 468–479 (2011).
100. Ponguta, L. A., Gregory, C. W., French, F. S. & Wilson, E. M. Site-specific Androgen Receptor Serine Phosphorylation Linked to Epidermal Growth Factor-dependent Growth of Castration-recurrent Prostate Cancer. *J. Biol. Chem.* **283**, 20989–21001 (2008).
101. Liu, T. *et al.* p21-activated Kinase 6 (PAK6) Inhibits Prostate Cancer Growth via Phosphorylation of Androgen Receptor and Tumorigenic E3 Ligase Murine Double Minute-2 (Mdm2). *J. Biol. Chem.* **288**, 3359–3369 (2013).
102. Palazzolo, I. *et al.* Akt blocks ligand binding and protects against expanded polyglutamine androgen receptor toxicity. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1593–1603 (2007).
103. Zhou, Z. X., Kemppainen, J. A. & Wilson, E. M. Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **9**, 605–615 (1995).
104. Gioeli, D. *et al.* Stress Kinase Signaling Regulates Androgen Receptor Phosphorylation, Transcription, and Localization. *Mol. Endocrinol.* **20**, 503–515 (2006).
105. Yang, C.-S. *et al.* Simian Virus 40 Small t Antigen Mediates Conformation-Dependent Transfer of Protein Phosphatase 2A onto the Androgen Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1298–1308 (2005).
106. Lin, H.-K. *et al.* Suppression Versus Induction of Androgen Receptor Functions by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Prostate Cancer LNCaP Cells with Different Passage Numbers. *J. Biol. Chem.* **278**, 50902–50907 (2003).
107. Liu, Y. *et al.* Dasatinib inhibits site-specific tyrosine phosphorylation of androgen receptor by Ack1 and Src kinases. *Oncogene* **29**, 3208–3216 (2010).
108. Rocha, J. *et al.* The Fer tyrosine kinase acts as a downstream interleukin-6 effector of androgen receptor activation in prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **381**, 140–149 (2013).
109. Chi, Y. *et al.* Thr-370 Is Responsible for CDK11p58 Autophosphorylation, Dimerization, and Kinase Activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 1748–1757 (2011).
110. Guo, Z. *et al.* Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell* **10**, 309–319 (2006).
111. DaSilva, J., Gioeli, D., Weber, M. J. & Parsons, S. J. The neuroendocrine-derived peptide, PTHrP, promotes prostate cancer cell growth by stabilizing the androgen receptor. *Cancer Res.* **69**, 7402–7411 (2009).
112. Dai, B. *et al.* Compensatory up-regulation of tyrosine kinase Etk/BMX in response to androgen deprivation promotes castration-resistant growth of prostate cancer cells. *Cancer Res.* **70**, 5587–5596 (2010).
113. Gong, J. *et al.* Activation of p300 histone acetyltransferase activity and acetylation of the androgen receptor by bombesin in prostate cancer cells. *Oncogene* **25**, 2011–2021 (2006).
114. Wu, K. *et al.* The Cell Fate Determination Factor Dachshund Inhibits Androgen Receptor Signaling and Prostate Cancer Cellular Growth. *Cancer Res.* **69**, 3347–3355 (2009).
115. Fu, M. *et al.* Hormonal Control of Androgen Receptor Function through SIRT1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8122–8135 (2006).
116. Gaughan, L., Logan, I. R., Cook, S., Neal, D. E. & Robson, C. N. Tip60 and Histone

Deacetylase 1 Regulate Androgen Receptor Activity through Changes to the Acetylation Status of the Receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 25904–25913 (2002).
117. Fu, M. *et al.* Acetylation of Androgen Receptor Enhances Coactivator Binding and Promotes Prostate Cancer Cell Growth. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8563–8575 (2003).
118. Geiss-Friedlander, R. & Melchior, F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 947–956 (2007).
119. Wang, Y. & Dasso, M. SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 4249–4252 (2009).
120. Callewaert, L., Verrijdt, G., Haelens, A. & Claessens, F. Differential Effect of Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO)-ylation of the Androgen Receptor in the Control of Cooperativity on Selective *Versus* Canonical Response Elements. *Mol. Endocrinol.* **18**, 1438–1449 (2004).
121. Kaikkonen, S. *et al.* SUMO-Specific Protease 1 (SENP1) Reverses the Hormone-Augmented SUMOylation of Androgen Receptor and Modulates Gene Responses in Prostate Cancer Cells. *Mol. Endocrinol.* **23**, 292–307 (2009).
122. Unraveling the Complexity of Ubiquitin Signaling. Available at: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC4805399/. (Accessed: 10th July 2019)
123. Xu, K. *et al.* Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination. *Cancer Cell* **15**, 270–282 (2009).
124. Lin, H.-K., Wang, L., Hu, Y.-C., Altuwaijri, S. & Chang, C. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J.* **21**, 4037–4048 (2002).
125. Barbieri, C. E. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat. Genet.* **44**, 685–689 (2012).
126. An, J., Wang, C., Deng, Y., Yu, L. & Huang, H. Destruction of Full-Length Androgen Receptor by Wild-Type SPOP, but Not Prostate-Cancer-Associated Mutants. *Cell Rep.* **6**, 657–669 (2014).
127. Ko, S. *et al.* Lysine Methylation and Functional Modulation of Androgen Receptor by Set9 Methyltransferase. *Mol. Endocrinol.* **25**, 433–444 (2011).
128. Gaughan, L. *et al.* Regulation of the androgen receptor by SET9-mediated methylation. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1266–1279 (2011).
129. Risbridger, G. P., Davis, I. D., Birrell, S. N. & Tilley, W. D. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 205–212 (2010).
130. Shibata, H. *et al.* Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog. Horm. Res.* **52**, 141–164; discussion 164-165 (1997).
131. Lin, H.-K. *et al.* Proteasome Activity Is Required for Androgen Receptor Transcriptional Activity via Regulation of Androgen Receptor Nuclear Translocation and Interaction with Coregulators in Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 36570–36576 (2002).
132. De Leon, J. T. *et al.* Targeting the regulation of androgen receptor signaling by the heat shock protein 90 cochaperone FKBP52 in prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11878–11883 (2011).
133. Koochekpour, S. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J. Androl.* **12**, 639–657 (2010).
134. Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F. & Stéhelin, D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* **11**, 1003–1013 (1992).
135. Szmulewitz, R. Z. *et al.* Serum/Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 Expression in Primary Human Prostate Cancers. *The Prostate* **72**, 157–164 (2012).
136. Arora, V. K. *et al.* Glucocorticoid Receptor Confers Resistance to Anti-Androgens by

Bypassing Androgen Receptor Blockade. *Cell* **155**, 1309–1322 (2013).
137. Isikbay, M. *et al.* Glucocorticoid Receptor Activity Contributes to Resistance to Androgen-Targeted Therapy in Prostate Cancer. *Horm. Cancer* **5**, 72–89 (2014).
138. SRRM4 Drives Neuroendocrine Transdifferentiation of Prostate Adenocarcinoma Under Androgen Receptor Pathway Inhibition - European Urology. Available at: https://www.europeanurology.com/article/S0302-2838(16)30138-5/pdf. (Accessed: 9th May 2019)
139. Palmgren, J. S., Karavadia, S. S. & Wakefield, M. R. Unusual and Underappreciated: Small Cell Carcinoma of the Prostate. *Semin. Oncol.* **34**, 22–29 (2007).
140. Ather, M. H., Abbas, F., Faruqui, N., Israr, M. & Pervez, S. Correlation of three immunohistochemically detected markers of neuroendocrine differentiation with clinical predictors of disease progression in prostate cancer. *BMC Urol.* **8**, 21 (2008).
141. Wang, W. & Epstein, J. I. Small Cell Carcinoma of the Prostate. *Am J Surg Pathol* **32**, 7 (2008).
142. Beltran, H. *et al.* Molecular Characterization of Neuroendocrine Prostate Cancer and Identification of New Drug Targets. *Cancer Discov.* **1**, 487–495 (2011).
143. Beltran, H. *et al.* Divergent clonal evolution of castration resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat. Med.* **22**, 298–305 (2016).
144. Ku, S. Y. *et al.* Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science* **355**, 78–83 (2017).
145. Research, A. A. for C. RB1 and TP53 Loss Promotes Lineage Plasticity in Prostate Cancer. *Cancer Discov.* (2017). doi:10.1158/2159-8290.CD-RW2017-015
146. Tan, H.-L. *et al.* Rb Loss is Characteristic of Prostatic Small Cell Neuroendocrine Carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 890–903 (2014).
147. Anose, B. M. & Sanders, M. M. Androgen Receptor Regulates Transcription of the ZEB1 Transcription Factor. *Int. J. Endocrinol.* **2011**, 1–10 (2011).
148. Nouri, M. *et al.* Androgen-Targeted Therapy-Induced Epithelial Mesenchymal Plasticity and Neuroendocrine Transdifferentiation in Prostate Cancer: An Opportunity for Intervention. *Front. Oncol.* **4**, (2014).
149. Taylor, B. S. *et al.* Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* **18**, 11–22 (2010).
150. Statz, C. M., Patterson, S. E. & Mockus, S. M. mTOR Inhibitors in Castration-Resistant Prostate Cancer: A Systematic Review. *Target. Oncol.* **12**, 47–59 (2017).
151. Kato, M. *et al.* Co-targeting Androgen Receptor Splice Variants and mTOR signaling pathway for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 2744–2754 (2016).
152. El Sheikh, S. S., Romanska, H. M., Abel, P., Domin, J. & Lalani, E.-N. Predictive Value of PTEN and AR Coexpression of Sustained Responsiveness to Hormonal Therapy in Prostate Cancer—A Pilot Study. *Neoplasia N. Y. N* **10**, 949–953 (2008).
153. Punnoose, E. A. *et al.* PTEN loss in circulating tumour cells correlates with PTEN loss in fresh tumour tissue from castration-resistant prostate cancer patients. *Br. J. Cancer* **113**, 1225–1233 (2015).
154. Mulholland, D. J. *et al.* Cell Autonomous Role of PTEN in Regulating Castration-Resistant Prostate Cancer Growth. *Cancer Cell* **19**, 792–804 (2011).
155. Carver, B. S. *et al.* Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer Cell* **19**, 575–586 (2011).
156. Chen, R., Li, Y., Buttyan, R. & Dong, X. Implications of PI3K/AKT inhibition on REST protein stability and neuroendocrine phenotype acquisition in prostate cancer cells. *Oncotarget* **8**, 84863–84876 (2017).
157. Imamura, Y. & Sadar, M. D. Androgen receptor targeted therapies in castration-

resistant prostate cancer: Bench to clinic. *Int. J. Urol.* **23**, 654–665 (2016).
158. Kumagai, J. *et al.* Intratumoral conversion of adrenal androgen precursors drives androgen receptor-activated cell growth in prostate cancer more potently than de novo steroidogenesis. *The Prostate* **73**, 1636–1650 (2013).
159. Massie, C. E. *et al.* The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J.* **30**, 2719–2733 (2011).
160. Montgomery, R. B. *et al.* Maintenance of Intratumoral Androgens in Metastatic Prostate Cancer: A Mechanism for Castration-Resistant Tumor Growth. *Cancer Res.* **68**, 4447–4454 (2008).
161. Penning, T. M. Androgen biosynthesis in castration-resistant prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, T67–T78 (2014).
162. Locke, J. A. *et al.* Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* **68**, 6407–6415 (2008).
163. Chang, K.-H. *et al.* Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13728–13733 (2011).
164. Yepuru, M. *et al.* Steroidogenic Enzyme AKR1C3 Is a Novel Androgen Receptor-Selective Coactivator that Promotes Prostate Cancer Growth. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5613–5625 (2013).
165. Sharifi, N. The 5α-androstanedione pathway to dihydrotestosterone in castration-resistant prostate cancer. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* **60**, (2012).
166. Azad, A. A. *et al.* Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 2315–2324 (2015).
167. Aggarwal, R. R. *et al.* Androgen receptor (AR) amplification in patients (pts) with metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC) resistant to abiraterone (Abi) and enzalutamide (Enz): Preliminary results from the SU2C/PCF/AACR West Coast Prostate Cancer Dream Team (WCDT). *J. Clin. Oncol.* **33**, 5068–5068 (2015).
168. Haapala, K. *et al.* Androgen receptor amplification is associated with increased cell proliferation in prostate cancer☆. *Hum. Pathol.* **38**, 474–478 (2007).
169. Geng, C. *et al.* Androgen receptor is the key transcriptional mediator of the tumor suppressor SPOP in prostate cancer. *Cancer Res.* **74**, 5631–5643 (2014).
170. Waltering, K. K. *et al.* Increased Expression of Androgen Receptor Sensitizes Prostate Cancer Cells to Low Levels of Androgens. *Cancer Res.* **69**, 8141–8149 (2009).
171. Dan, R. *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* **161**, 1215–1228 (2015).
172. Gaddipatl, J. P., McLeod, D. G., Sesterhenn, I., Moul, J. W. & Srivastava, S. Frequent Detection of Codon 877 Mutation in the Androgen Receptor Gene in Advanced Prostate Cancers'. 5
173. Suzuki, H. *et al.* Codon 877 Mutation in the Androgen Receptor Gene in Advanced Prostate Cancer: Relation to Antiandrogen Withdrawal Syndrome. *The Prostate* **29**, 153–158 (1996).
174. Steketee, K. *et al.* Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer. *Int. J. Cancer* **100**, 309–317 (2002).
175. Carreira, S. *et al.* Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. *Sci. Transl. Med.* **6**, 254ra125 (2014).
176. Steinkamp, M. P. *et al.* TREATMENT-DEPENDENT ANDROGEN RECEPTOR MUTATIONS IN PROSTATE CANCER EXPLOIT MULTIPLE MECHANISMS TO EVADE THERAPY. *Cancer Res.* **69**, 4434–4442 (2009).
177. Balbas, M. D. *et al.* Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with

rational drug design. *eLife* **2**,
178. Korpal, M. *et al.* An F876L Mutation in Androgen Receptor Confers Genetic and Phenotypic Resistance to MDV3100 (Enzalutamide). *Cancer Discov.* **3**, 1030–1043 (2013).
179. Hermanson, O., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 55–60 (2002).
180. Wolf, I. M., Heitzer, M. D., Grubisha, M. & DeFranco, D. B. Coactivators and nuclear receptor transactivation. *J. Cell. Biochem.* **104**, 1580–1586 (2008).
181. Culig, Z. Androgen Receptor Coactivators in Regulation of Growth and Differentiation in Prostate Cancer. *J. Cell. Physiol.* **231**, 270–274 (2016).
182. Ni, L. *et al.* FKBP51 Promotes Assembly of the Hsp90 Chaperone Complex and Regulates Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1243–1253 (2010).
183. Wang, J. *et al.* ROR-γ drives androgen receptor expression and represents a therapeutic target in castration-resistant prostate cancer. *Nat. Med.* **22**, 488–496 (2016).
184. Dehm, S. M. & Tindall, D. J. Alternatively Spliced Androgen Receptor Variants. *Endocr. Relat. Cancer* **18**, R183–R196 (2011).
185. Sun, S. *et al.* Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J. Clin. Invest.* **120**, 2715–2730 (2010).
186. Hu, R. *et al.* Ligand-independent Androgen Receptor Variants Derived from Splicing of Cryptic Exons Signify Hormone Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res.* **69**, 16–22 (2009).
187. Guo, Z. *et al.* A Novel Androgen Receptor Splice Variant Is Upregulated during Prostate Cancer Progression and Promotes Androgen-depletion-resistant Growth. *Cancer Res.* **69**, 2305–2313 (2009).
188. Cao, S., Zhan, Y. & Dong, Y. Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **23**, T199–T210 (2016).
189. Lu, C. & Luo, J. Decoding the androgen receptor splice variants. in *Translational andrology and urology* (2013). doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.08
190. Uo, T., Plymate, S. R. & Sprenger, C. C. Allosteric alterations in the androgen receptor and activity in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **24**, R335–R348 (2017).
191. van Royen, M. E., van Cappellen, W. A., de Vos, C., Houtsmuller, A. B. & Trapman, J. Stepwise androgen receptor dimerization. *J. Cell Sci.* **125**, 1970–1979 (2012).
192. Xu, D. *et al.* Androgen receptor splice variants dimerize to transactivate target genes. *Cancer Res.* **75**, 3663–3671 (2015).
193. Cao, B. *et al.* Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget* **5**, 1646–1656 (2014).
194. Antonarakis, E. S. & Luo, J. Prostate cancer: AR splice variant dimerization—clinical implications. *Nat. Rev. Urol.* **12**, 431–433 (2015).
195. Nilsen, T. W. & Graveley, B. R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* **463**, 457–463 (2010).
196. Luo, J. Development of AR-V7 as a putative treatment selection marker for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Asian J. Androl.* **18**, 580–585 (2016).
197. Hu, R. *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.* **72**, 3457–3462 (2012).
198. Li, Y. *et al.* Intragenic Rearrangement and Altered RNA Splicing of the Androgen Receptor in a Cell-Based Model of Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* **71**, 2108–2117 (2011).
199. Li, Y. *et al.* AR intragenic deletions linked to androgen receptor splice variant expression and activity in models of prostate cancer progression. *Oncogene* **31**, 4759–4767

(2012).
200. Li, Y. *et al.* Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* **73**, 483–489 (2013).
201. Nadiminty, N. *et al.* NF-κB2/p52 Induces Resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer: Role of Androgen Receptor and Its Variants. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 1629–1637 (2013).
202. Jin, R. *et al.* Inhibition of NF-kappa B signaling restores responsiveness of castrate resistant prostate cancer cells to anti-androgen treatment by decreasing androgen receptor variants expression. *Oncogene* **34**, 3700–3710 (2015).
203. Nadiminty, N. *et al.* NF-kappaB2/p52:c-Myc:hnRNPA1 pathway regulates expression of androgen receptor splice variants and enzalutamide sensitivity in prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 1884–1895 (2015).
204. Yang, Y. *et al.* Dysregulation of miR-212 Promotes Castration Resistance through hnRNPH1-Mediated Regulation of AR and AR-V7: Implications for Racial Disparity of Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1744–1756 (2016).
205. Liu, L. liang *et al.* Mechanisms of the Androgen Receptor Splicing in Prostate Cancer Cells. *Oncogene* **33**, 3140–3150 (2014).
206. Céraline, J. *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* **108**, 152–157 (2004).
207. Libertini, S. J. *et al.* Evidence for Calpain-Mediated Androgen Receptor Cleavage as a Mechanism for Androgen Independence. *Cancer Res.* **67**, 9001–9005 (2007).
208. Mudryj, M. & Tepper, C. G. On the origins of the androgen receptor low molecular weight species. *Horm. Cancer* **4**, 259–269 (2013).
209. Yu, J. *et al.* An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression. *Cancer Cell* **17**, 443–454 (2010).
210. Krause, W. C., Shafi, A. A., Nakka, M. & Weigel, N. L. Androgen Receptor and its Splice Variant, AR-V7, Differentially Regulate FOXA1 Sensitive Genes in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **54**, 49–59 (2014).
211. Hörnberg, E. *et al.* Expression of Androgen Receptor Splice Variants in Prostate Cancer Bone Metastases is Associated with Castration-Resistance and Short Survival. *PLoS ONE* **6**, (2011).
212. Sherk, A. B. *et al.* Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. *Cancer Res.* **68**, 7475–7483 (2008).
213. Bolton, E. C. *et al.* Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor. *Genes Dev.* **21**, 2005–2017 (2007).
214. Schweizer, M. T. *et al.* Effect of bipolar androgen therapy for asymptomatic men with castration-resistant prostate cancer: Results from a pilot clinical study. *Sci. Transl. Med.* **7**, 269ra2 (2015).
215. Shafi, A. A. *et al.* Differential regulation of metabolic pathways by androgen receptor (AR) and its constitutively active splice variant, AR-V7, in prostate cancer cells. *Oncotarget* **6**, 31997–32012 (2015).
216. Gonthier, K., Poluri, R. T. K. & Audet-Walsh, É. Functional genomic studies reveal the androgen receptor as a master regulator of cellular energy metabolism in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **191**, 105367 (2019).
217. Yu, Z. *et al.* Rapid Induction of Androgen Receptor Splice Variants by Androgen Deprivation in Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 1590–1600 (2014).
218. Henzler, C. *et al.* Truncation and constitutive activation of the androgen receptor by

diverse genomic rearrangements in prostate cancer. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
219. Antonarakis, E., Armstrong, A., Dehm, S. & Luo, J. Androgen receptor variant-driven prostate cancer: clinical implications and therapeutic targeting. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **19**, 231–241 (2016).
220. Takayama, K. Splicing Factors Have an Essential Role in Prostate Cancer Progression and Androgen Receptor Signaling. *Biomolecules* **9**, 131 (2019).
221. Yamamoto, Y. *et al.* Generation 2.5 Antisense Oligonucleotides Targeting the Androgen Receptor and Its Splice Variants Suppress Enzalutamide-Resistant Prostate Cancer Cell Growth. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1675–1687 (2015).
222. Antonarakis, E. S. *et al.* AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1028–1038 (2014).
223. Antonarakis, E. S. *et al.* Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J. Clin. Oncol.* **35**, 2149–2156 (2017).
224. Armstrong, A. J. *et al.* Prospective Multicenter Validation of Androgen Receptor Splice Variant 7 and Hormone Therapy Resistance in High-Risk Castration-Resistant Prostate Cancer: The PROPHECY Study. *J. Clin. Oncol.* (2019). doi:10.1200/JCO.18.01731
225. Efstathiou, E. *et al.* Molecular Characterization of Enzalutamide-treated Bone Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **67**, 53–60 (2015).
226. The Detection of Androgen Receptor Splice Variant 7 in Plasma-derived Exosomal RNA Strongly Predicts Resistance to Hormonal Therapy in Metastatic Prostate Cancer Patients - European Urology. Available at: https://www.europeanurology.com/article/S0302-2838(16)30479-1/fulltext. (Accessed: 21st June 2019)
227. Efstathiou, E. *et al.* Enzalutamide (ENZA) in combination with abiraterone acetate (AA) in bone metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC). *J. Clin. Oncol.* **32**, 5000–5000 (2014).
228. Saylor, P. J. *et al.* Branched Chain RNA *In Situ* Hybridization for Androgen Receptor Splice Variant AR-V7 as a Prognostic Biomarker for Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 363–369 (2017).
229. Sharp, A. *et al.* Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer. *J. Clin. Invest.* **129**, 192–208
230. Zhu, Y. *et al.* Novel Junction-specific and Quantifiable In Situ Detection of AR-V7 and its Clinical Correlates in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **73**, 727–735 (2018).
231. Seitz, A. K. *et al.* AR-V7 in Peripheral Whole Blood of Patients with Castration-resistant Prostate Cancer: Association with Treatment-specific Outcome Under Abiraterone and Enzalutamide. *Eur. Urol.* **72**, 828–834 (2017).
232. Del Re, M. *et al.* The Detection of Androgen Receptor Splice Variant 7 in Plasma-derived Exosomal RNA Strongly Predicts Resistance to Hormonal Therapy in Metastatic Prostate Cancer Patients. *Eur. Urol.* **71**, 680–687 (2017).
233. Qu, F. *et al.* Association of AR-V7 and Prostate-Specific Antigen RNA Levels in Blood with Efficacy of Abiraterone Acetate and Enzalutamide Treatment in Men with Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 726–734 (2017).
234. Scher, H. I. *et al.* Association of AR-V7 on Circulating Tumor Cells as a Treatment-Specific Biomarker With Outcomes and Survival in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* **2**, 1441–1449 (2016).
235. Usher, J. L. *et al.* Detection of AR-V7 using cell-free RNA (cfRNA) in prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, e16613–e16613 (2016).
236. Ma, Y. *et al.* Droplet Digital PCR Based Androgen Receptor Variant 7 (AR-V7)

Detection from Prostate Cancer Patient Blood Biopsies. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
237. Guedes, L. B. *et al.* Analytic Validation of RNA In Situ Hybridization (RISH) for AR and AR-V7 Expression in Human Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 4651–4663 (2016).
238. Welti, J. *et al.* Analytical Validation and Clinical Qualification of a New Immunohistochemical Assay for Androgen Receptor Splice Variant-7 Protein Expression in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **70**, 599–608 (2016).
239. Miyamoto, D. T. *et al.* RNA-Seq of Single Prostate CTCs Implicates Noncanonical Wnt Signaling in Antiandrogen Resistance. *Science* **349**, 1351–1356 (2015).
240. Krishna, M. & Narang, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3525–3544 (2008).
241. Fidanzi-Dugas, C. Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique : Etude in vitro et in vivo. (Limoges, 2016).
242. Cuenda, A. & Rousseau, S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1773**, 1358–1375 (2007).
243. Jiang, Y. *et al.* Characterization of the Structure and Function of a New Mitogen-activated Protein Kinase (p38ᵞ). *MAP Kinase* 8
244. Mertens, S., Craxton, M. & Goedert, M. SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* **383**, 273–276 (1996).
245. Jiang, Y. *et al.* Characterization of the Structure and Function of the Fourth Member of p38 Group Mitogen-activated Protein Kinases, p38ᵟ. *MAP Kinase* 8
246. Iñesta-Vaquera, F., Sabio, G., Kuma, Y. & Cuenda, A. Alternative p38 MAPK Pathways. in *Stress-Activated Protein Kinases* (eds. Posas, F. & Nebreda, A. R.) 17–32 (Springer Berlin Heidelberg, 2008). doi:10.1007/4735_2007_0239
247. Risco, A. & Cuenda, A. New Insights into the p38γ and p38δ MAPK Pathways. *J. Signal Transduct.* **2012**, (2012).
248. Beardmore, V. A. *et al.* Generation and Characterization of p38β (MAPK11) Gene-Targeted Mice. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10454–10464 (2005).
249. Han, J., Wang, X., Jiang, Y., Ulevitch, R. J. & Lin, S. Identification and characterization of a predominant isoform of human MKK3. *FEBS Lett.* **403**, 19–22 (1997).
250. Lin, X., Wang, M. & Xu, J. Z. and R. p38 MAPK: A Potential Target of Chronic Pain. *Current Medicinal Chemistry* (2014). Available at: http://www.eurekaselect.com/124599/article. (Accessed: 6th July 2019)
251. Bonney, E. A. Mapping out p38MAPK. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* **77**, (2017).
252. Adhikary, G., Chew, Y. C., Reece, E. A. & Eckert, R. L. PKC-δ and -η, MEKK-1, MEK-6, MEK-3, and p38-δ Are Essential Mediators of the Response of Normal Human Epidermal Keratinocytes to Differentiating Agents. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2017–2030 (2010).
253. Kumar, S., Boehm, J. & Lee, J. C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 717–726 (2003).
254. Chen, Z. *et al.* MAP Kinases. *Chem. Rev.* **101**, 2449–2476 (2001).
255. Cuadrado, A. & Nebreda, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* **429**, 403–417 (2010).
256. Feng, Y. & Wen, J. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Hematologic Malignancies. *Arch Pathol Lab Med* **133**, 7 (2009).
257. Vander Griend, D. J. *et al.* Suppression of Metastatic Colonization by the Context-Dependent Activation of the c-Jun NH_2 -Terminal Kinase Kinases JNKK1/MKK4 and MKK7. *Cancer Res.* **65**, 10984–10991 (2005).

258. Mavropoulos, A. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)-mediated autoimmunity: Lessons to learn from ANCA vasculitis and pemphigus vulgaris. *Autoimmun. Rev.* **12**, 580–590 (2013).
259. Salvador, J. M. *et al.* Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor–proximal tyrosine kinases. *Nat. Immunol.* **6**, 390–395 (2005).
260. Cheung, P. C. F., Campbell, D. G., Nebreda, A. R. & Cohen, P. Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38α. *EMBO J.* **22**, 5793–5805 (2003).
261. Ge, B. *et al.* MAPKK-Independent Activation of p38␣ Mediated by TAB1-Dependent Autophosphorylation of p38␣. **295**, 5 (2002).
262. Boutros, T. *et al.* The MAP Kinase Phosphatase-1 MKP-1/DUSP1 Is a Regulator of Human Liver Response to Transplantation. *Am. J. Transplant.* **8**, 2558–2568 (2008).
263. Owens, D. M. & Keyse, S. M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**, 3203–3213 (2007).
264. Takekawa, M., Maeda, T. & Saito, H. Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J.* **17**, 4744–4752 (1998).
265. Takekawa, M. *et al.* p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.* **19**, 6517–6526 (2000).
266. Lee, T., Kim, S. J. & Sumpio, B. E. Role of PP2A in the regulation of p38 MAPK activation in bovine aortic endothelial cells exposed to cyclic strain. *J. Cell. Physiol.* **194**, 349–355 (2003).
267. Roskoski, R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* **103**, 26–48 (2016).
268. Nagar, B. *et al.* Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571). *Cancer Res.* **62**, 4236–4243 (2002).
269. Dar, A. C. & Shokat, K. M. The Evolution of Protein Kinase Inhibitors from Antagonists to Agonists of Cellular Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 769–795 (2011).
270. Cohen, P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* **7**, 353–361 (1997).
271. Clark, M. A. *et al.* Design, synthesis and selection of DNA-encoded small-molecule libraries. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 647–654 (2009).
272. Simard, J. R. *et al.* A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 394–396 (2009).
273. p38 MAP kinase inhibitor - Amgen - AdisInsight. Available at: https://adisinsight.springer.com/drugs/800019881. (Accessed: 7th July 2019)
274. Garcia-Manero, G. *et al.* A Phase 1 Study of Oral ARRY-614, a p38 MAPK/Tie2 Dual Inhibitor, in Patients with Low or Intermediate-1 Risk Myelodysplastic Syndromes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 985–994 (2015).
275. A Study of ARRY-371797 in Patients With LMNA-Related Dilated Cardiomyopathy - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02057341. (Accessed: 7th July 2019)
276. A Study of ARRY-371797 in Patients With Rheumatoid Arthritis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00729209. (Accessed: 7th July 2019)
277. A Study of ARRY-371797 in Patients With Active Ankylosing Spondylitis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00811499. (Accessed: 7th July 2019)
278. A Study of ARRY-371797 in Subjects Undergoing Third Molar Extraction - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00542035.

(Accessed: 7th July 2019)
279. AVE 9940 - AdisInsight. Available at: https://adisinsight.springer.com/drugs/800023206. (Accessed: 7th July 2019)
280. AZD 6703 - AdisInsight. Available at: https://adisinsight.springer.com/drugs/800021256. (Accessed: 7th July 2019)
281. Dose Finding Study of BIRB 796 BS in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02209792. (Accessed: 7th July 2019)
282. BIRB 796 BS Versus Placebo in Patients With Moderate to Severs Plaque-type Psoriasis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02209753. (Accessed: 7th July 2019)
283. Efficacy, Safety and Pharmacokinetics of BIRB 796 BS Tablets in Patients With Active Rheumatoid Arthritis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02214888. (Accessed: 7th July 2019)
284. A Study of BMS-582949 in Patients With Moderate to Severe Plaque Psoriasis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00399906. (Accessed: 7th July 2019)
285. Multiple Ascending Dose Study of BMS-582949 in Patients With Stable Rheumatoid Arthritis on the Methotrexate Background - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00162292. (Accessed: 7th July 2019)
286. PoC in Rheumatoid Arthritis With Methotrexate - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00605735. (Accessed: 7th July 2019)
287. Single Dose Escalation Study FTIM in Order to Assess Safety and Tolerability of GSK610677 - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00694902. (Accessed: 7th July 2019)
288. Use of KC706 for the Treatment of Pemphigus Vulgaris - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00606749. (Accessed: 7th July 2019)
289. A Study to Evaluate the Effects of 3 Months Dosing With GW856553, as Assessed FDG-PET/CT Imaging - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00633022. (Accessed: 7th July 2019)
290. Safety and Efficacy Study of Losmapimod (GW856553) in Frequently Exacerbating Participants With Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02299375. (Accessed: 7th July 2019)
291. A Study to Evaluate the Effect of Losmapimod on Cardiac Conduction as Compared to Placebo and Moxifloxacin - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01756495. (Accessed: 7th July 2019)
292. Patnaik, A. *et al.* A First-in-Human Phase I Study of the Oral p38 MAPK Inhibitor, Ralimetinib (LY2228820 Dimesylate), in Patients with Advanced Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1095–1102 (2016).
293. A Study of P38 Inhibitor (4) in Patients With Active Rheumatoid Arthritis (RA) on Stable Methotrexate Therapy - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00316771. (Accessed: 7th July 2019)
294. Clinical Trial to Examine the Pain Relief of PH-797804 Alone Or With Naproxen in Subjects With Osteoarthritis of the Knee - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01102660. (Accessed: 7th July 2019)
295. A Study To Evaluate The Safety And Pharmacokinetic Profile Of A P38 Inhibitor (PH-797804) In Subjects With Rheumatoid Arthritis Who Are Also Taking Methotrexate - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at:

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00620685. (Accessed: 7th July 2019)
296. PH-797804 Versus Placebo For The Treatment Of Neuropathic Pain Associated With Post-Herpetic Neuralgia - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00614705. (Accessed: 7th July 2019)
297. A Phase II, Study To Evaluate The Efficacy And Safety Of PH-797804 In Adults With Moderate To Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00559910. (Accessed: 7th July 2019)
298. Goldstein, D. M. *et al.* Discovery of *S* -[5-Amino-1-(4-fluorophenyl)-1 *H* -pyrazol-4-yl]-[3-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]methanone (RO3201195), an Orally Bioavailable and Highly Selective Inhibitor of p38 Map Kinase. *J. Med. Chem.* **49**, 1562–1575 (2006).
299. Klebl, B., Müller, G. & Hamacher, M. *Protein Kinases as Drug Targets*. (John Wiley & Sons, 2011).
300. To Assess the Excretion Balance and Pharmacokinetics of a Single Oral Dose of [14C]SB-681323 in Healthy Adult Males - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00564746. (Accessed: 7th July 2019)
301. A Study To Look At The Safety Of SB-681323 In Healthy Adult Subjects After Intravenous Administration Of A Single Dose - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00439881. (Accessed: 7th July 2019)
302. SB-681323-Methotrexate Interaction Study - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00419809. (Accessed: 7th July 2019)
303. A Pharmacokinetic Study Of SB-681323 In Subjects With Coronary Heart Disease Undergoing Percutaneous Intervention - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00291902. (Accessed: 7th July 2019)
304. A Single Dose Of Compound SB-681323 Compared To Prednisolone On A Protein That Is an Indicator For Rheumatoid Arthritis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00134693. (Accessed: 7th July 2019)
305. SB-681323 IV for Subjects at Risk of Acute Lung Injury or ARDS - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00996840. (Accessed: 7th July 2019)
306. Safety and Efficacy of TAK-715 in Subjects With Rheumatoid Arthritis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00760864. (Accessed: 7th July 2019)
307. Schindler, J. F., Monahan, J. B. & Smith, W. G. p38 Pathway Kinases as Anti-inflammatory Drug Targets. *J. Dent. Res.* **86**, 800–811 (2007).
308. Mavropoulos, A., L. Koutsoumpas, A. & P. Bogdanos, D. The Role of p38 MAPK in Rheumatic Diseases. *Int. Trends Immun.* **3**, (2015).
309. Extension Study of the Efficacy and Safety of Oral SCIO-469 in Relapsed, Refractory Patients With Multiple Myeloma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00095680. (Accessed: 7th July 2019)
310. Safety Study of SCIO-469 to Treat Patients With Active Rheumatoid Arthritis Receiving Methotrexate - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00043732. (Accessed: 7th July 2019)
311. A Study of Oral SCIO-469 Pharmacokinetics (Study of a Drug in the Body to Watch How the Drug is Absorbed, Distributed, Metabolized and Eliminated Over a Period of Time) in the Body of Female Patients With Active Rheumatoid Arthritis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00508768. (Accessed: 7th July 2019)
312. Study of Oral SCIO-469 in Relapsed, Refractory Patients With Multiple Myeloma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at:

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00087867. (Accessed: 7th July 2019)
313. SCIO-469: Open-Label Study for Patients With Myelodysplastic Syndromes. - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00113893. (Accessed: 7th July 2019)
314. SPRiNG: SCIO-469 Patients With Rheumatoid Arthritis Not Receiving Methotrexate - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00089921. (Accessed: 7th July 2019)
315. Ding, C. Drug evaluation: VX-702, a MAP kinase inhibitor for rheumatoid arthritis and acute coronary syndrome. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl. 2000* **7**, 1020–1025 (2006).
316. Damjanov, N., Kauffman, R. S. & Spencer-Green, G. T. Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: Results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *Arthritis Rheum.* **60**, 1232–1241 (2009).
317. Duffy, J. P. *et al.* The Discovery of VX-745: A Novel and Selective p38α Kinase Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2**, 758–763 (2011).
318. Clinical Pharmacology of p38 MAP Kinase Inhibitor, VX-745, in Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease (AD) or Mild AD - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02423200. (Accessed: 7th July 2019)
319. A PET Study of the Effects of p38 MAP Kinase Inhibitor, VX-745, on Amyloid Plaque Load in Alzheimer's Disease (AD) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02423122. (Accessed: 7th July 2019)
320. Magi-Galluzzi, C., Montironi, R., Cangi, M. G., Wishnow, K. & Loda, M. Mitogen-activated protein kinases and apoptosis in PIN. *Virchows Arch.* **432**, 407–413 (1998).
321. Royuela, M. *et al.* Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. *Hum. Pathol.* **33**, 299–306 (2002).
322. Kido, L. A., de Almeida Lamas, C., Maróstica, M. R. & Cagnon, V. H. A. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. *Life Sci.* **217**, 141–147 (2019).
323. Uzgare, A. R., Kaplan, P. J. & Greenberg, N. M. Differential expression and/or activation of P38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *The Prostate* **55**, 128–139 (2003).
324. Ricote, M. *et al.* The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *J. Pathol.* **208**, 401–407 (2006).
325. Ricote, M. *et al.* P38 MAPK protects against TNF-α-provoked apoptosis in LNCaP prostatic cancer cells. *Apoptosis* **11**, 1969–1975 (2006).
326. Yao, V. & Bacich, D. J. Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression gives prostate cancer cells a growth advantage in a physiologically relevant folate environment in vitro. *The Prostate* **66**, 867–875 (2006).
327. Yao, V., Berkman, C. E., Choi, J. K., O'Keefe, D. S. & Bacich, D. J. Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid. *The Prostate* **70**, 305–316 (2010).
328. Xu, L. *et al.* Screening and identification of significant genes related to tumor metastasis and PSMA in prostate cancer using microarray analysis. *Oncol. Rep.* **30**, 1920–1928 (2013).
329. Guo, Z. *et al.* Prostate specific membrane antigen knockdown impairs the tumorigenicity of LNCaP prostate cancer cells by inhibiting the phosphatidylinositol 3-

kinase/Akt signaling pathway. *Chin. Med. J. (Engl.)* **127**, 929–936 (2014).
330. Zhang, Y. *et al.* Prostate specific membrane antigen (PSMA): A novel modulator of p38 for proliferation, migration, and survival in prostate cancer cells. *The Prostate* **73**, 835–841 (2013).
331. Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P. & Koul, H. K. Role of Oxidative Stress in Prostate Cancer. *Cancer Lett.* **282**, 125–136 (2009).
332. Recchia, A. G. *et al.* A cross-talk between the androgen receptor and the epidermal growth factor receptor leads to p38MAPK-dependent activation of mTOR and cyclinD1 expression in prostate and lung cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 603–614 (2009).
333. Milone, M. R. *et al.* Acquired resistance to zoledronic acid and the parallel acquisition of an aggressive phenotype are mediated by p38-MAP kinase activation in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* **4**, e641 (2013).
334. Gan, L., Wang, J., Xu, H. & Yang, X. Resistance to docetaxel-induced apoptosis in prostate cancer cells by p38/p53/p21 signaling. *The Prostate* **71**, 1158–1166 (2011).
335. Gongora, C. *et al.* Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 822–832 (2008).
336. Paillas, S. *et al.* Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res.* **71**, 1041–1049 (2011).
337. Histol Histopathol, Vol 21, Shimada et al. Available at: http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_21/21_4/21_4_415.htm. (Accessed: 8th July 2019)
338. Joo, S. S. & Yoo, Y.-M. Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J. Pineal Res.* **47**, 8–14 (2009).
339. Zhang, Y.-X. & Kong, C.-Z. [The role of mitogen-activated protein kinase cascades in inhibition of proliferation in human prostate carcinoma cells by raloxifene: an in vitro experiment]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **88**, 271–275 (2008).
340. Khwaja, F. S., Quann, E. J., Pattabiraman, N., Wynne, S. & Djakiew, D. Carprofen induction of p75NTR-dependent apoptosis via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3539–3545 (2008).
341. Chang, H.-L., Wu, Y.-C., Su, J.-H., Yeh, Y.-T. & Yuan, S.-S. F. Protoapigenone, a Novel Flavonoid, Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells through Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun NH2-Terminal Kinase 1/2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 841–849 (2008).
342. Huggins, C. & Hodges, C. V. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res.* **1**, 293–297 (1941).
343. Nelson, P. S. Molecular States Underlying Androgen Receptor Activation: A Framework for Therapeutics Targeting Androgen Signaling in Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* (2011). doi:10.1200/JCO.2011.39.1300
344. Sprenger, C. C. T. & Plymate, S. R. The link between androgen receptor splice variants and castration-resistant prostate cancer. *Horm. Cancer* **5**, 207–217 (2014).
345. Mostaghel, E. A., Plymate, S. R. & Montgomery, B. Molecular Pathways: Targeting resistance in the androgen receptor for therapeutic benefit. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 791–798 (2014).
346. Ferraldeschi, R., Welti, J., Luo, J., Attard, G. & de Bono, J. Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects. *Oncogene* **34**, 1745–1757 (2015).
347. Veldscholte, J. *et al.* A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human INCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **173**, 534–540 (1990).
348. Yeh, S., Miyamoto, H., Shima, H. & Chang, C. From estrogen to androgen receptor: A new pathway for sex hormones in prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5527–5532 (1998).
349. Bokhoven, A. van *et al.* Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate* **57**, 205–225 (2003).
350. Marques, R. B. *et al.* Androgen receptor modifications in prostate cancer cells upon long-termandrogen ablation and antiandrogen treatment. *Int. J. Cancer* **117**, 221–229 (2005).
351. Sramkoski, R. M. *et al.* A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* **35**, 403–409 (1999).
352. Attardi, B. J., Burgenson, J., Hild, S. A. & Reel, J. R. Steroid hormonal regulation of growth, prostate specific antigen secretion, and transcription mediated by the mutated androgen receptor in CWR22Rv1 human prostate carcinoma cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **222**, 121–132 (2004).
353. Korenchuk, S. *et al.* VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. *Vivo Athens Greece* **15**, 163–168 (2001).
354. Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. & Jones, L. W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17**, 16–23 (1979).
355. Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H. & Paulson, D. F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer* **21**, 274–281 (1978).
356. Tosi, D. *et al.* Rational development of synergistic combinations of chemotherapy and molecular targeted agents for colorectal cancer treatment. *BMC Cancer* **18**, 812 (2018).
357. Lehár, J. *et al.* Chemical combination effects predict connectivity in biological systems. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 80 (2007).
358. Lehár, J., Stockwell, B. R., Giaever, G. & Nislow, C. Combination chemical genetics. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 674–681 (2008).
359. Lehàr, J. *et al.* Synergistic drug combinations improve therapeutic selectivity. *Nat. Biotechnol.* **27**, 659–666 (2009).
360. NCATS Inxight: Drugs — PEXMETINIB. Available at: https://drugs.ncats.io/drug/3750D0U8B5. (Accessed: 25th June 2019)
361. Bachegowda, L. *et al.* Pexmetinib: a novel dual inhibitor of Tie-2 and p38 MAPK with efficacy in preclinical models of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* **76**, 4841–4849 (2016).
362. Pexmetinib (ARRY-614) | p38 MAPK Inhibitor | MedChemExpress. *MedchemExpress.com* Available at: https://www.medchemexpress.com/Pexmetinib.html. (Accessed: 10th July 2019)
363. NCATS Inxight: Drugs — RALIMETINIB. Available at: https://drugs.ncats.io/drug/73I34XW4HD. (Accessed: 25th June 2019)
364. NCATS Inxight: Drugs — SB-202190. Available at: https://drugs.ncats.io/drug/PVX798P8GI. (Accessed: 25th June 2019)
365. Labots, M. *et al.* Evaluation of a tyrosine kinase peptide microarray for tyrosine kinase inhibitor therapy selection in cancer. *Exp. Mol. Med.* **48**, e279–e279 (2016).
366. Labots, M. *et al.* Selection of Protein Kinase Inhibitors Based on Tumor Tissue Kinase Activity Profiles in Patients with Refractory Solid Malignancies: An Interventional Molecular Profiling Study. *The Oncologist* **23**, 1135-e118 (2018).
367. BioNavigator | PamGene. Available at: https://www.pamgene.com/en/bionavigator.htm. (Accessed: 10th July 2019)
368. Lecoeur, H. Nuclear Apoptosis Detection by Flow Cytometry: Influence of Endogenous Endonucleases. *Exp. Cell Res.* **277**, 1–14 (2002).

369. Loeffler, D. & Ratner, S. In vivo localization of lymphocytes labelled with low concentrations of Hoechst 33342. *J. Immunol. Methods* **119**, 95–101 (1989).
370. Chehrehasa, F., Meedeniya, A. C. B., Dwyer, P., Abrahamsen, G. & Mackay-Sim, A. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J. Neurosci. Methods* **177**, 122–130 (2009).
371. Balaguer, P. *et al.* Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* **233**, 47–56 (1999).
372. Delfosse, V. *et al.* Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 14930–14935 (2012).
373. Brinkmann, A. O. *et al.* Characterization of androgen receptors after photoaffinity labelling with [3H]methyltrienolone (R1881). *J. Steroid Biochem.* **24**, 245–249 (1986).
374. Foucquier, J. & Guedj, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol. Res. Perspect.* **3**, (2015).
375. Luo, J., Solimini, N. L. & Elledge, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* **136**, 823–837 (2009).
376. Mikhailova, M. *et al.* AKT regulates androgen receptor-dependent growth and PSA expression in prostate cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **617**, 397–405 (2008).
377. Lee, S. H., Johnson, D., Luong, R. & Sun, Z. Crosstalking between androgen and PI3K/AKT signaling pathways in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 2759–2768 (2015).
378. Zarif, J. C. & Miranti, C. K. The importance of non-nuclear AR signaling in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *Cell. Signal.* **28**, 348–356 (2016).
379. Leung, J. K. & Sadar, M. D. Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Front. Endocrinol.* **8**, (2017).
380. Berns, E. M., de Boer, W. & Mulder, E. Androgen-dependent growth regulation of and release of specific protein(s) by the androgen receptor containing human prostate tumor cell line LNCaP. *The Prostate* **9**, 247–259 (1986).
381. Olea, N., Sakabe, K., Soto, A. M. & Sonnenschein, C. The proliferative effect of 'anti-androgens' on the androgen-sensitive human prostate tumor cell line LNCaP. *Endocrinology* **126**, 1457–1463 (1990).
382. de Launoit, Y., Veilleux, R., Dufour, M., Simard, J. & Labrie, F. Characteristics of the biphasic action of androgens and of the potent antiproliferative effects of the new pure antiestrogen EM-139 on cell cycle kinetic parameters in LNCaP human prostatic cancer cells. *Cancer Res.* **51**, 5165–5170 (1991).
383. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **12**, 207–218 (2014).
384. Apalutamide | C21H15F4N5O2S - PubChem. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Apalutamide. (Accessed: 28th June 2019)
385. Centenera, M. M., Raj, G. V., Knudsen, K. E., Tilley, W. D. & Butler, L. M. Ex vivo culture of human prostate tissue and drug development. *Nat. Rev. Urol.* **10**, 483–487 (2013).
386. Gao, D. & Chen, Y. Organoid development in cancer genome discovery. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **30**, 42–48 (2015).
387. Linxweiler, J. *et al.* Patient-derived, three-dimensional spheroid cultures provide a versatile translational model for the study of organ-confined prostate cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **145**, 551–559 (2019).
388. Li, Z. G. *et al.* Androgen receptor-negative human prostate cancer cells induce osteogenesis in mice through FGF9-mediated mechanisms. *J. Clin. Invest.* **118**, 2697–2710 (2008).

389. Nguyen, H. M. *et al.* LuCaP Prostate Cancer Patient-Derived Xenografts Reflect the Molecular Heterogeneity of Advanced Disease an--d Serve as Models for Evaluating Cancer Therapeutics. *The Prostate* **77**, 654–671 (2017).
390. Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit ARY003B. Available at: https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-phospho-kinase-array-kit_ary003b. (Accessed: 10th July 2019)
391. Pardo, O. E. & Seckl, M. J. S6K2: The Neglected S6 Kinase Family Member. *Front. Oncol.* **3**, (2013).
392. Amaral, C. L. *et al.* S6Ks isoforms contribute to viability, migration, docetaxel resistance and tumor formation of prostate cancer cells. *BMC Cancer* **16**, (2016).
393. Hussain Suleman *et al.* Mp87-15 inhibition of rps6kb1 as a potential adjuvant for prostate cancer radiation therapy. *J. Urol.* **197**, e1171–e1171 (2017).
394. Turnham, R. E. & Scott, J. D. Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; history, function and physiology. *Gene* **577**, 101–108 (2016).
395. Moody, S. E. *et al.* PRKACA Mediates Resistance to HER2-Targeted Therapy in Breast Cancer Cells and Restores Anti-Apoptotic Signaling. *Oncogene* **34**, 2061–2071 (2015).
396. Collins, C. S. *et al.* A small interfering RNA screen for modulators of tumor cell motility identifies MAP4K4 as a promigratory kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3775–3780 (2006).
397. Rizzardi, A. E. *et al.* Evaluation of protein biomarkers of prostate cancer aggressiveness. *BMC Cancer* **14**, 244 (2014).
398. Gao, X., Gao, C., Liu, G. & Hu, J. MAP4K4: an emerging therapeutic target in cancer. *Cell Biosci.* **6**, (2016).
399. Wang, F. *et al.* Chemotherapy-induced miR-141/MAP4K4 signaling suppresses progression of colorectal cancer. *Biosci. Rep.* **38**, BSR20180978 (2018).
400. Adli, M., Merkhofer, E., Cogswell, P. & Baldwin, A. S. IKKalpha and IKKbeta each function to regulate NF-kappaB activation in the TNF-induced/canonical pathway. *PloS One* **5**, e9428 (2010).
401. Campa, V. M. *et al.* A screen for transcription factor targets of glycogen synthase kinase-3 highlights an inverse correlation of NFκB and androgen receptor signaling in prostate cancer. *Oncotarget* **5**, 8173–8187 (2014).
402. Nguyen, D. P., Li, J., Yadav, S. S. & Tewari, A. K. Recent insights into NF-κB signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. *BJU Int.* **114**, 168–176 (2014).
403. Grassilli, E. *et al.* GSK3A Is Redundant with GSK3B in Modulating Drug Resistance and Chemotherapy-Induced Necroptosis. *PLOS ONE* **9**, e100947 (2014).
404. King, L. & Plun-Favreau, H. Chapter 5 - Mitophagy. in *Parkinson's Disease* (ed. Verstreken, P.) 139–177 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-803783-6.00005-5
405. Yao, N. *et al.* Inhibition of PINK1/Parkin-dependent mitophagy sensitizes multidrug-resistant cancer cells to B5G1, a new betulinic acid analog. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
406. McClinch, K. *et al.* Small-Molecule Activators of Protein Phosphatase 2A for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Res.* **78**, 2065–2080 (2018).
407. Shah, K. N. & Bradbury, N. A. Kinase modulation of androgen receptor signaling: implications for prostate cancer. *Cancer Cell Microenviron.* **2**, (2015).
408. Lafarga, V. *et al.* p38 Mitogen-Activated Protein Kinase- and HuR-Dependent Stabilization of p21Cip1 mRNA Mediates the G1/S Checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4341–4351 (2009).
409. Dean, J. L. E., Sarsfield, S. J., Tsounakou, E. & Saklatvala, J. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Stabilizes mRNAs That Contain Cyclooxygenase-2 and Tumor Necrosis Factor AU-rich Elements by Inhibiting Deadenylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 39470–39476

(2003).
410. Bak, R. & G Mikkelsen, J. *Regulation of cytokines by small RNAs during skin inflammation*. **17**, (2010).
411. Yeap, B. B. *et al.* Novel Binding of HuR and Poly(C)-binding Protein to a Conserved UC-rich Motif within the 3′-Untranslated Region of the Androgen Receptor Messenger RNA. *J. Biol. Chem.* **277**, 27183–27192 (2002).
412. Zhang, L. *et al.* NF-κB Regulates Androgen Receptor Expression and Prostate Cancer Growth. *Am. J. Pathol.* **175**, 489–499 (2009).
413. Chang, J. H., Wang, L. F., Lu, S. L., Huang, C. F. & Lu, H. K. NF-κB Enhances Androgen Receptor Expression through 5′-UTR Binding in Gingival Cells. *J. Dent. Res.* **94**, 1439–1445 (2015).
414. Nadiminty, N. *et al.* Aberrant Activation of the Androgen Receptor by NF-κB2/p52 in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **70**, 3309–3319 (2010).
415. Jain, G. *et al.* IκB Kinases Modulate the Activity of the Androgen Receptor in Prostate Carcinoma Cell Lines. *Neoplasia N. Y. N* **14**, 178–189 (2012).
416. Khurana, N. & Sikka, S. C. Targeting Crosstalk between Nrf-2, NF-κB and Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer. *Cancers* **10**, (2018).
417. Austin, D. C. *et al.* NF-κB and Androgen Receptor Variant Expression Correlate with Human BPH progression. *The Prostate* **76**, 491–511 (2016).
418. Liu, V. W. S., Yau, W. L., Tam, C. W., Yao, K.-M. & Shiu, S. Y. W. Melatonin Inhibits Androgen Receptor Splice Variant-7 (AR-V7)-Induced Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB) Activation and NF-κB Activator-Induced AR-V7 Expression in Prostate Cancer Cells: Potential Implications for the Use of Melatonin in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC) Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
419. Austin, D. C. *et al.* NF-κB and Androgen Receptor Variant 7 Induce Expression of SRD5A Isoforms and Confer 5ARI Resistance. *The Prostate* **76**, 1004–1018 (2016).
420. Korus, M., Mahon, G. M., Cheng, L. & Whitehead, I. P. p38 MAPK-mediated activation of NF-kB by the RhoGEF domain of Bcr. 12
421. Viatour, P., Merville, M.-P., Bours, V. & Chariot, A. Phosphorylation of NF-κB and IκB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 43–52 (2005).
422. Olson, C. M. *et al.* p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Controls NF- B Transcriptional Activation and Tumor Necrosis Factor Alpha Production through RelA Phosphorylation Mediated by Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 in Response to Borrelia burgdorferi Antigens. *Infect. Immun.* **75**, 270–277 (2007).
423. Jiang, S.-Y., Zou, Y.-Y. & Wang, J.-T. p38 mitogen-activated protein kinase–induced nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell activity is required for neuroprotection in retinal ischemia/reperfusion injury. *Mol. Vis.* 11 (2012).
424. Berghe, W. V. *et al.* p38 and Extracellular Signal-regulated Kinase Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Are Required for Nuclear Factor-κB p65 Transactivation Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 3285–3290 (1998).
425. Bhat, N. R., Feinstein, D. L., Shen, Q. & Bhat, A. N. p38 MAPK-mediated Transcriptional Activation of Inducible Nitric-oxide Synthase in Glial Cells ROLES OF NUCLEAR FACTORS, NUCLEAR FACTOR κB, cAMP RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN, CCAAT/ENHANCER-BINDING PROTEIN-β, AND ACTIVATING TRANSCRIPTION FACTOR-2. *J. Biol. Chem.* **277**, 29584–29592 (2002).
426. Bhat, N. R., Shen, Q. & Fan, F. TAK1-mediated induction of nitric oxide synthase gene expression in glial cells: TAK-1-mediated iNOS gene expression in glia. *J. Neurochem.* **87**, 238–247 (2003).
427. Jana, M., Dasgupta, S., Saha, R. N., Liu, X. & Pahan, K. Induction of tumor necrosis

factor-α (TNF-α) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. *J. Neurochem.* **86**, 519–528 (2003).
428. Geuens, T., Bouhy, D. & Timmerman, V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum. Genet.* **135**, 851–867 (2016).
429. Tummala, R., Lou, W., Gao, A. C. & Nadiminty, N. Quercetin Targets hnRNPA1 to Overcome Enzalutamide Resistance in Prostate Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 2770–2779 (2017).
430. Ward, A. B. *et al.* Quercetin inhibits prostate cancer by attenuating cell survival and inhibiting anti-apoptotic pathways. *World J. Surg. Oncol.* **16**, (2018).
431. Carabet, L. A. *et al.* Computer-Aided Discovery of Small Molecules Targeting the RNA Splicing Activity of hnRNP A1 in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Molecules* **24**, (2019).
432. van der Houven van Oordt, W. *et al.* The Mkk $_{3/6}$ -p38–Signaling Cascade Alters the Subcellular Distribution of Hnrnp A1 and Modulates Alternative Splicing Regulation. *J. Cell Biol.* **149**, 307–316 (2000).
433. Cáceres, J. F. & Kornblihtt, A. R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* **18**, 186–193 (2002).
434. Zhou, H.-L., Luo, G., Wise, J. A. & Lou, H. Regulation of alternative splicing by local histone modifications: potential roles for RNA-guided mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **42**, 701–713 (2014).
435. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing | Nature Structural & Molecular Biology. Available at: https://www-nature-com.gate2.inist.fr/articles/nsmb1030. (Accessed: 12th July 2019)
436. Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing | Nature Structural & Molecular Biology. Available at: https://www-nature-com.gate2.inist.fr/articles/nsmb.1620. (Accessed: 12th July 2019)
437. Sawicka, A. & Seiser, C. Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* **94**, 2193–2201 (2012).
438. Khan, S. A. *et al.* p38-MAPK/MSK1-mediated overexpression of histone H3 serine 10 phosphorylation defines distance-dependent prognostic value of negative resection margin in gastric cancer. *Clin. Epigenetics* **8**, (2016).
439. Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition. - PubMed - NCBI. Available at: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/18463097/. (Accessed: 12th July 2019)
440. PTBP1 - Polypyrimidine tract-binding protein 1 - Homo sapiens (Human) - PTBP1 gene & protein. Available at: https://www.uniprot.org/uniprot/P26599. (Accessed: 12th July 2019)

Table des illustrations et des figures

FIGURE 1 : STRUCTURES DE LA PROSTATE 17
FIGURE 2 : REPRESENTATION DU GRADE DE GLEASON 19
FIGURE 3 : MECANISMES D'ACTION DE L'ABIRATERONE ET DE L'ENZALUTAMIDE. 32
FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENE ET DE LA PROTEINE DU RA 35
FIGURE 5 : ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DES RECEPTEURS DES ANDROGENES. 36
FIGURE 6 : INTERACTIONS ENTRE LA PROTEINE HSP27, LA MAPK P38 ET LE RECEPTEUR DES ANDROGENES 37
FIGURE 7 : SITES DE MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DU RA. 38
FIGURE 8 : LES MECANISMES DE RESISTANCE A L'INHIBITION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU RECEPTEUR DES ANDROGENES 46
FIGURE 9 : *LE RECEPTEUR DES ANDROGENES ET SES VARIANTS D'EPISSAGE* 50
FIGURE 10 : ACTIVATION DU RA-E ET DES V-RA PAR DIMERISATION DES RECEPTEURS 51
FIGURE 11 : LE RA-E ET SON VARIANT RA-V7 53
FIGURE 12 : ACTIVATION CONSTITUTIVE DU RA-V7 DES GENES CIBLES DU RA 57
FIGURE 13 : VOIE DE SIGNALISATION SIMPLIFIEE DES MAPKS 63
FIGURE 14 : ACTIVATION DE LA VOIE DE LA MAPK P38 66
FIGURE 15 : PRINCIPE DU TEST DE CYTOTOXICITE CELLULAIRE A LA SULFORHODAMINE B 78
FIGURE 16 : TRAITEMENT DES DONNEES DE CYTOTOXICITE PAR DES « MATRICES DE SYNERGIE » 79
FIGURE 17 : SCHEMA DE L'ANALYSE PHOSPHOPROTEOMIQUE PAR PAMSTATION 83
FIGURE 18 : PRINCIPE D'ANALYSE PAR LE SYSTEME D'IMAGERIE DU CELIGO. 84
FIGURE 19 : SEGMENTATION DES SPHEROÏDES PAR L'APPLICATION « TUMOROSPHERE » DU CELIGO 86
FIGURE 20 : SCHEMA DU MODELE CELLULAIRE DE BIOLUMINESCENCE POUR LE SUIVI DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RA 88
FIGURE 21 : ACTIVATION DE LA MAPK P38 PAR LE TRAITEMENT A L'ENZALUTAMIDE ET A L'ABIRATERONE 91
FIGURE 22 : DETERMINATION DES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR L'ENZALUTAMIDE PAR WESTERN BLOT 92
FIGURE 23 : MATRICES DE SYNERGIE MONTRANT L'EFFET SYNERGIQUE DE LA COMBINAISON DE MEDICAMENTS : ENZALUTAMIDE + INHIBITEUR DE P38 DANS DES LIGNEES DE CAP 94
FIGURE 24 : MATRICES DE SYNERGIE MONTRANT L'EFFET SYNERGIQUE DE LA COMBINAISON DE MEDICAMENTS : ABIRATERONE + SB202190 DANS DES LIGNEES DE CAP 95
FIGURE 25 : MATRICES DE SYNERGIE DE LA COMBINAISON DE MEDICAMENTS : ENZALUTAMIDE + SB202190 DANS DES LIGNEES DE CAP 96
FIGURE 26 : MATRICES DE SYNERGIE DE LA COMBINAISON ENZALUTAMIDE + SB202190 DANS LA LIGNEE 22RV1 97
FIGURE 27 : MATRICES DE SYNERGIE POUR EVALUER L'EFFET DE LA COMBINAISON « ABIRATERONE + SB202190 » SUR DES LIGNEES LNCAP ET 22RV1 98
FIGURE 28 : DIMINUTION DU DIAMETRE DES SPHEROÏDES PAR LA COMBINAISON DE TRAITEMENT ENZALUTAMIDE ET INHIBITEURS DE P38 POUR LA LIGNEE LNCAP 99
FIGURE 29 : EFFET SYNERGIQUE DE LA COMBINAISON ENZALUTAMIDE + SB202190 SUR DES SPHEROÏDES DE LIGNEES DE CAP 102
FIGURE 30 : EFFET CYTOSTATIQUE DE LA COMBINAISON « ENZALUTAMIDE + SB202190 » SUR LA LIGNEE LNCAP 105
FIGURE 31 : EFFET CYTOSTATIQUE DE LA COMBINAISON « ENZALUTAMIDE + SB202190 » SUR LA LIGNEE 22RV1 106
FIGURE 32 : CARACTERISATION DES EFFETS ANTITUMORAUX DES INHIBITEURS DE P38 DANS UNE LIGNEE 22RV1 108
FIGURE 33 : ÉVALUATION DE LA SYNTHESE D'ADN PAR LE DECOMPTE DES CELLULES LNCAP EDU POSITIVES. 110
FIGURE 34 : SUIVI DE L'EVOLUTION DU VOLUME TUMORAL IN VIVO AVEC DES TRAITEMENTS AVEC L'ENZALUTAMIDE ET/OU L'INHIBITEUR DE P38 SB202190 111
FIGURE 35 : SUIVI DE L'EVOLUTION DU VOLUME TUMORAL IN VIVO AVEC DES TRAITEMENTS AVEC L'ABIRATERONE ET/OU L'INHIBITEUR DE P38 SB202190 112
FIGURE 36 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RA POST-TRAITEMENT AVEC INHIBITEUR DE P38 114

FIGURE 37 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RA POST-TRAITEMENT AVEC ENZALUTAMIDE ET/OU INHIBITEUR DE P38 116
FIGURE 38 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DU RA POST-TRAITEMENT APALUTAMIDE ET/OU INHIBITEUR DE P38 118
FIGURE 39 : EXPRESSION DU RA-V7 POST-TRAITEMENT AVEC ANTI-ANDROGENES ET/OU INHIBITEUR DE P38 DANS LA LIGNEE 22RV1 119
FIGURE 40 : PHOSPHORYLATION DU RA PAR LA MAPK P38 128
FIGURE 41 : VOIES DE SIGNALISATION CANONIQUE ET NON-GENOMIQUE DU RA 129
FIGURE 42 : INTERACTIONS ENTRE LA VOIE DE SIGNALISATION DE LA MAPK P38-MK2, HUR ET TRISTETRAPROLINE 131
FIGURE 43 : INTERACTION ENTRE NF-KB ET LE RA DANS LE CAP 133
FIGURE 44 : INTERACTIONS ENTRE LES PROTEINES ASF-SF2 ET HNRNPA1 135
FIGURE 45 : EXEMPLES DE MODIFICATIONS D'HISTONES POUVANT ALTERER L'EPISSAGE ALTERNATIF 137

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION ISUP DU CANCER DE LA PROSTATE 20
TABLEAU 2 : LA CLASSIFICATION CLINIQUE DU TNM DES TUMEURS DE LA PROSTATE (PREOPERATOIRE) 22
TABLEAU 3 : STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR LE CAP LOCALISE OU LOCALEMENT AVANCE 23
TABLEAU 4 : PHOSPHORYLATION DES RESIDUS DU RA ET LEURS ROLES FONCTIONNELS 41
TABLEAU 5 : EXEMPLES DE GENES REGULES PAR LE RA ET SES V-RA 55
TABLEAU 6 : EXEMPLES D'ETUDES CLINIQUES DE L'EXPRESSION DU RA-V7 61
TABLEAU 7 : COMPARAISON DES DIFFERENTES ISOFORMES DE LA MAPK P38 64
TABLEAU 8 : LISTE DES INHIBITEURS DE LA MAPK P38 UTILISES DANS DES ESSAIS CLINIQUES 68
TABLEAU 9 : CARACTERISTIQUES DES LIGNEES CANCEREUSES DE LA PROSTATE UTILISEES 77
TABLEAU 10 : LISTE DES MEDICAMENTS ET DES INHIBITEURS DE P38 UTILISES POUR LES DIFFERENTES APPROCHES EXPERIMENTALES 80
TABLEAU 11 : COMPOSITION DES GELS DE SEPARATION ET DE CONCENTRATION 81
TABLEAU 12 : LISTE DES ANTICORPS UTILISES POUR LE WESTERN BLOT 82
TABLEAU 13 : EFFETS DES COMBINAISONS DE MEDICAMENTS SUR LES LIGNEES CELLULAIRES DU CAP 103
TABLEAU 14 : COMPARAISON DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES MODELES PRECLINIQUES DU CANCER DE LA PROSTATE 122
TABLEAU 15 : LISTE DES PROTEINES KINASES (HORS MAPK P38) IDENTIFIEES PAR PAMGENE ASSAY 124