



**HAL**  
open science

# Voie de signalisation des androgènes, altérations génomiques et progression du cancer de la prostate

Philippe Barthélémy

► **To cite this version:**

Philippe Barthélémy. Voie de signalisation des androgènes, altérations génomiques et progression du cancer de la prostate. Cancer. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ022 . tel-01490601

**HAL Id: tel-01490601**

**<https://theses.hal.science/tel-01490601>**

Submitted on 15 Mar 2017

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

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

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

**INSERM U1113 : « Voies du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques »**

**Equipe 3 « Signalisation et Communication dans le Cancer du Rein et de la Prostate »**

**THÈSE** présentée par :

**Philippe BARTHELEMY**

soutenue le : **1 juin 2016**

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

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

**VOIE DE SIGNALISATION DES ANDROGENES,  
ALTERATIONS GENOMIQUES ET PROGRESSION DU  
CANCER DE LA PROSTATE**

**THÈSE dirigée par :**

**Mr. Jocelyn CERALINE**

MCU-PH, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme Christiane MOUGIN**

PU-PH, Université de Franche-Comté

**Mme Virginie VLAEMINCK-GUILLEM**

MCU-PH, Université Lyon 1

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr. Guy MENSAH - NYAGAN**

PR, Université de Strasbourg

**A Nestor, Iris, Prosper, Sabrina**

# Remerciements

## A Madame Christiane MOUGIN

Rapporteur externe

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de prendre part au jury de cette thèse et de juger mon travail. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

## A Madame Virginie VLAEMINCK-GUILLEM

Rapporteur externe

Vous m'avez fait l'honneur de juger mon travail. Votre expertise scientifique et clinique dans le domaine du cancer de la prostate est essentielle pour juger mon travail. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

## A Monsieur Guy MENSAH-NYAGAN

Examineur interne

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de prendre part au jury de cette thèse en tant qu'examineur interne. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance

## A Monsieur Jocelyn CERALINE

Merci de m'avoir accueilli, soutenu (et ce n'était pas facile) pendant ces longues années de Master1, Master2 et thèse de science. Cela fait 15 ans que nos chemins se sont croisés et j'espère que notre collaboration perdurera au-delà de cette thèse de science.

### **A Monsieur Jean-Emmanuel KURTZ et Jean-Pierre BERGERAT**

Merci pour votre soutien durant ces nombreuses années. Jean-Emmanuel, un merci tout particulièrement pour ta disponibilité et les innombrables relectures.

### **A l'équipe du Laboratoire de Recherche INSERM U1113**

Un merci tout particulier à Eva qui a su m'aider et me guider tout au long de ce travail. Tes connaissances sont impressionnantes et à ce titre tu suscites respect et admiration. Gemma, Christelle, Adeline, toutes les Laetitia, Félicie, Marine, Pauline et tous ceux que j'ai pu croiser au laboratoire de près ou de plus loin. Merci

### **A l'équipe d'anatomopathologie, d'urologie et d'oncologie médicale**

Merci tout particulièrement à Véronique Lindner, Agnès Neuville, mes collègues urologues et oncologues, en particulier Brigitte qui a su me donner goût à l'uro-oncologie. Merci à Sébastien, Laure, Veronica, Stéfania, Irène et tous ceux que j'ai oubliés pour m'avoir aidé

### **Aux patients et leur famille**

Merci à tous les patients et leur famille d'avoir participé à leur manière à cette thèse en acceptant de participer aux études translationnelles.

### **A ma famille**

Vous constituez ce que j'ai réussi de mieux dans ma vie, bien plus important que tout titre ou autre carrière professionnelle. Merci pour votre soutien indispensable pour avancer.

# Table des matières

<b>1</b>	<b>1. Cancer de la prostate.....</b>	<b>13</b>
1.1	Epidémiologie .....	14
1.1.1	<i>Incidence</i> .....	14
1.1.2	<i>Variabilité selon l'âge</i> .....	15
1.1.3	<i>Mortalité</i> .....	15
1.1.4	<i>Facteurs de risque</i> .....	16
1.2	Caractéristiques anatomopathologiques .....	16
1.3	Taxonomie moléculaire des cancers de la prostate localisés et métastatiques .....	17
1.3.1	<i>Les réarrangements génomiques :</i> .....	17
1.3.2	<i>Les mutations somatiques : mutations, insertions, délétions</i> .....	18
1.4	Facteurs pronostiques : .....	22
1.4.1	<i>Facteurs pronostiques classiques</i> .....	22
1.4.2	<i>Autres facteurs pronostiques</i> .....	26
1.5	Traitement.....	28
1.5.1	<i>Cancers de la prostate localisés</i> .....	28
1.5.2	<i>Cancers de la prostate métastatiques</i> .....	31
1.6	Hormonothérapie.....	31
1.6.1	<i>Hormonothérapie de 1<sup>e</sup> génération</i> .....	31
1.6.2	<i>Résistance à la castration</i> .....	32
1.6.3	<i>Hormonothérapie de 2<sup>nd</sup> génération</i> .....	34
1.7	Chimiothérapie : .....	36
1.7.1	<i>Un peu d'histoire : la Mitoxantrone</i> .....	36
1.7.2	<i>Chimiothérapie de 1<sup>ère</sup> ligne :</i> .....	37
1.7.3	<i>Chimiothérapie de deuxième ligne :</i> .....	37
1.8	Nouvelles thérapeutiques : Immunothérapie, chimiothérapie, thérapies ciblées .....	38
1.8.1	<i>Sipuleucel T</i> .....	38
1.8.2	<i>Radiothérapie métabolique</i> .....	38
1.9	Perspectives thérapeutiques : .....	39
<b>2</b>	<b>Partie 1 : Mutations du récepteur des androgènes dans les cancers de la prostate... 40</b>	
2.1	Introduction.....	41
2.1.1	<i>Ligand du récepteur des androgènes</i> .....	41
2.1.2	<i>Structure du récepteur des androgènes</i> .....	41
2.1.3	<i>Activité et fonction du récepteur des androgènes</i> .....	46
2.1.4	<i>Les mécanismes de résistance à la privation androgénique : l'échappement hormonal</i> ..	47
2.2	Article : Mutations du Récepteurs des androgènes et mécanismes de résistance.....	58
2.3	Matériel et méthodes supplémentaires .....	61
2.3.1	<i>Test fonctionnel de 1<sup>e</sup> génération</i> .....	61
2.3.2	<i>Analyses statistiques</i> .....	65
2.4	Résultats supplémentaires .....	66
2.4.1	<i>Fréquence, récurrence et signification physiopathologique</i> .....	66
2.4.2	<i>Mutations du RA et Impact pronostic :</i> .....	67
2.5	Discussion et perspectives : .....	70

<b>3</b>	<b>Partie 2 : Formes tronquées du récepteur des androgènes et mécanismes d'angiogenèse.....</b>	<b>73</b>
3.1	Introduction : .....	74
3.1.1	<i>Angiogenèse et Cancer : .....</i>	74
3.1.2	<i>Mécanismes d'angiogenèse : du VEGF en passant par HIF.....</i>	76
3.1.3	<i>Angiogenèse et cancers de la prostate : .....</i>	80
3.1.4	<i>Objectifs.....</i>	82
3.2	Matériel et methodes.....	83
3.2.1	<i>Cellules : LNCaP, HUVEC, LNCaP inductibles.....</i>	83
3.2.2	<i>Milieu conditionné : Surnageant de cellules LNCaP.....</i>	84
3.2.3	<i>Test ELISA.....</i>	84
3.2.4	<i>RT-PCR quantitative en temps réel.....</i>	84
3.2.5	<i>Test de formation de tube capillaire sur matrigel.....</i>	85
3.2.6	<i>Tissue Micro-array - Construction d'un TMA.....</i>	86
3.2.7	<i>Analyses statistiques.....</i>	88
3.3	Résultats.....	89
3.3.1	<i>Augmentation significative des taux circulants de VEGF-A en présence du variant RAQ640X</i> <i>89</i>	
3.3.2	<i>Augmentation significative de l'expression du gène du VEGF-A et HIF-1<math>\alpha</math> en présence du</i> <i>RAQ640X.....</i>	90
3.3.3	<i>Absence d'impact biologique de l'augmentation des taux de VEGF-A circulants.....</i>	92
3.3.4	<i>Corrélation entre densité microvasculaire et présence de formes tronquées du RA.....</i>	93
3.4	Discussion.....	95
<b>4</b>	<b>Partie 3 : Hétérogénéité tumorale et cancer de la prostate: Etude exploratoire a</b> <b>propos d'un cas.....</b>	<b>99</b>
4.1	Introduction:.....	100
4.1.1	<i>Hétérogénéité tumorale : de l'immunohistochimie à la biologie moléculaire.....</i>	101
4.1.2	<i>Hétérogénéité spatio-temporelle : .....</i>	106
4.1.3	<i>Evolution phylogénétique.....</i>	106
4.1.4	<i>Hétérogénéité tumorale et cancer de la prostate : un modèle dynamique.....</i>	108
4.1.5	<i>Objectifs de l'étude : .....</i>	109
4.2	Matériel et méthodes.....	110
4.2.1	<i>Collection des échantillons : .....</i>	110
4.2.2	<i>Protocole d'Immunohistochimie :.....</i>	110
4.2.3	<i>Analyses de l'exome par séquençage à haut-débit.....</i>	111
4.3	Résultats.....	114
4.3.1	<i>Données cliniques : caractéristiques du patient.....</i>	114
4.3.2	<i>Hétérogénéité intratumorale sur le plan anatomopathologique.....</i>	116
4.3.3	<i>Données de séquençage.....</i>	120
4.3.4	<i>Hétérogénéité intratumorale et tumeur primitive : R1, R2, R3.....</i>	123
4.3.5	<i>Hétérogénéité inter- et intramétastatique et évolution clonale.....</i>	126
4.3.6	<i>Fréquence allélique et clonalité.....</i>	130
4.4	Discussion.....	132
4.4.1	<i>Accessibilité des échantillons.....</i>	132
4.4.2	<i>Hétérogénéité entre tumeur primitive et métastase.....</i>	133

4.4.3	Mutations « driver » ou « passager » ? Altérations des principales voies de signalisation	134
4.4.4	Hétérogénéité tumorale : un challenge à relever pour la médecine personnalisée.....	135
4.4.5	Perspectives et conclusions : .....	136
<b>5</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>138</b>

## Index des Tableaux

Tableau 1 :	Répartition par classe d'âge de l'incidence et de la mortalité en France par CaP en 2011 .....	15
Tableau 2 :	Stade clinique TNM (AJCC 2009) .....	23
Tableau 3 :	Caractéristiques des 5 grades de Gleason .....	25
Tableau 4 :	Nouveau système de classement pronostique des CaP .....	26
Tableau 5 :	Groupes à risque avant traitement. Adapté de Kattan et al. <sup>37</sup> .....	27
Tableau 6 :	Facteurs pronostics associés à la récurrence biochimique. ....	69
Tableau 7 :	Caractéristiques des anticorps primaires utilisés pour les analyses IHC sur TMA87 .....	111
Tableau 8 :	Caractéristiques des anticorps primaires .....	111
Tableau 9 :	Filtres appliqués pour les « single nucleotide variant » (SNV).....	112
Tableau 10 :	Filtres appliqués aux insertion/délétions (InDels) de petite taille .....	112
Tableau 11 :	Résultats du marquage immunohistochimiques des différentes régions tumorales .....	118
Tableau 12 :	Résumé de la profondeur de couverture pour chaque échantillon. ....	120
Tableau 13 :	Représentation du processus d'obtention des données à partir du séquençage à haut débit de l'exome sur chacun des échantillons.....	121
Tableau 14 :	Evolution de la fréquence allélique des mutations non-synonymes .....	131

## Index des Figures

Figure 1 :	Représentation de l'évolution de l'incidence des CaP entre 1990 à 2010.).....	14
Figure 2 :	Estimation nationale de la mortalité par CaP en France entre 1980 à 2010. ....	16
Figure 3 :	Représentation des anomalies moléculaires affectant les différentes voies de signalisation dans les CaP. ....	19
Figure 4 :	Altérations somatiques de la voie PI3K/Akt dans les cancers de la prostate ;.....	20
Figure 5 :	Schéma du score de Gleason (AJCC2009) .....	25
Figure 6 :	Voie de biosynthèse des androgènes et cible de l'acétate d'abiraterone .....	35
Figure 7 :	Structure du récepteur des androgènes. ....	42
Figure 8 :	Structure du domaine de liaison à l'ADN (DBD) .....	44



<i>Figure 9 : Structure 3D de la poche de liaison du ligand du récepteur des androgènes</i> .....	45
<i>Figure 10a : : Représentation des interactions entre les acides aminés de la poche de liaison et le ligand</i> .....	45
<i>Figure 10b : Mécanismes d'action du récepteur des androgènes : activité génomique et activité non génomique</i> .....	46
<i>Figure 11 : Mécanisme proposé du rôle de la protéine SPOP mutée (F133V) dans le CaP</i> .....	49
<i>Figure 12 : Représentation des récepteurs des androgènes tronqués issus d'une mutation non-sens ou d'un épissage alternatif</i> .....	53
<i>Figure 13 : Test fonctionnel chez la levure</i> .....	63
<i>Figure 15 : Représentation schématique des mutations récurrentes du RA à différents stades de la maladie (localisé, métastatique)</i> .....	66
<i>Figure 16 Représentation de la survie sans récurrence biochimique après prostatectomie selon le statut du RA</i> .....	68
<i>Figure 17 : Les principales étapes du « Switch Angiogénique »</i> .....	75
<i>Figure 18 : Représentation des facteurs angiogéniques impliqués dans le CaP</i> .....	81
<i>Figure 19 : Construction d'un tissu microarray (TMA)</i> .....	86
<i>Figure 20 : Concentration du VEGF-A déterminé par test ELISA dans le surnageant de cellules LNCaP exprimant différents variants du RA</i> .....	89
<i>Figure 21 : Représentation de l'expression du VEGF-A par les cellules LNCaP inductibles en RTqPCR</i> .....	90
<i>Figure 22 : Représentation de l'expression du HIF-1<math>\alpha</math> par les cellules LNCaP inductibles en RTqPCR</i> .....	91
<i>Figure 23 : Représentation de la formation de réseaux vasculaires sur matrigel</i> .....	92
<i>Figure 24 : Représentation de la densité microvasculaire déterminée en IHC par marquage anti-CD31</i> .....	93
<i>Figure 25 : Représentation de la corrélation entre DMV et statut du RA</i> .....	94
<i>Figure 26 : Représentation des études ayant étudié les discordances entre tumeur primitive et métastase</i> .....	102
<i>Figure 27 : Représentation de l'évolution clonale</i> .....	104
<i>Figure 28 : Représentation schématique des concepts théoriques conduisant à l'hétérogénéité tumorale</i> . <sup>5</sup> .....	105
<i>Figure 29 : Représentation de l'hétérogénéité tumorale dans le cancer du rein par un arbre phylogénétique</i> .....	106
<i>Figure 30 : Modèle arborescent d'hétérogénéité intra-tumorale</i> .....	107
<i>Figure 31 : Evolution du taux de PSA</i> .....	115
<i>Figure 32: Représentation de la chronologie des biopsies et traitements du cas patient</i> .....	115
<i>Figure 33 : Représentation spatiale des lésions métastatiques (M1, M2), de l'adénopathie (N1) et des trois régions de la tumeur primitive</i> .....	116
<i>Figure 34: Représentation anatomopathologique des trois zones morphologiquement distinctes constituant la tumeur primitive</i> .....	117
<i>Figure 35 : Observations microscopiques des différents échantillons tumoraux</i> .....	119
<i>Figure 36 : . Distribution de couverture</i> .....	121
<i>Figure 37 : Représentation du nombre et le type d'anomalies génomiques identifiées dans chaque échantillon tumoral</i> .....	122

<i>Figure 38 : Diagramme de Venn.....</i>	<i>123</i>
<i>Figure 39 : Hétérogénéité intratumorale.....</i>	<i>124</i>
<i>Figure 40 : Distribution régionale des mutations.....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 41 : Diagramme de Venn : Représentation de la comparaison des SNV entre les différents échantillons. ....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 42 : Représentation schématique et hypothétique de la relation phylogénétique entre les différentes régions tumorales analysées.. ....</i>	<i>129</i>

## Liste des Abréviations

AD	Androgéno-dépendant
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF-1/2	Fonction de transactivation 1 et 2
AI	Androgéno-indépendant
ARE	Eléments de réponse aux androgènes
ARN	Acide ribonucléique
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BAC	Blocage androgénique complet
BRD	Bromodomain containing
CaP	Cancer de la prostate
CCDN1	Cycline D1
CDK	Kinase Cycline-dépendante
CNA	Altérations du nombre de copies de gène
CPRC	Cancer de la prostate résistant à la castration
CST8	Cystatine 8
CTC	Cellules tumorales circulantes
DBD	Domaine de fixation à l'ADN
DES	Diéthylstilbestrol
DHEA	DihydroEpiandrostérone
DHT	Dihydrotestostérone
DMV	Densité microvasculaire
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ETS	E26 transformation-specific
FANCA	Fanconi Anemia
FOXA1	Forkhead box protein A1
FSH	Follicule stimulating hormone
Gy	Gray
HER2/3	Récepteur du facteur de croissance épidermique
HIF-1 $\alpha$	Facteur inductible par l'hypoxie 1 $\alpha$

HIFU	Ultrasons focalisés de haute intensité
HRE	Eléments de réponse à l'hypoxie
HUVEC	Cellules endothéliales de la veine ombilicale
IDH	Isocitrate dehydrogenase 1
IMRT	Radiothérapie avec modulation d'intensité
kDA	Kilo Dalton
KGF	Facteur de croissance des kératinocytes
LBD	Domaine de fixation du ligand
LNCaP	Lymph Node Cancer Prostate
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM2	Murine Double Minute 2
MSH	Mismatch repair protein, MutS protein homolog
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NCOR	Nuclear receptor corepressor
NGS	Séquencage à haut débit
NL-1	Signal de localisation nucléaire
NRP	Neuropiline
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PHRC	Programme Hospitalier de Recherche Clinique
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PIGF	Facteur de croissance placentaire
PIN	Néoplasie intraépithéliale prostatique
PSA	Antigène spécifique de la prostate
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RA	Récepteur des androgens
RB1	Rétinoblastome
RNF	Ring finger proteins
RT	Transcription inverse
RTUP	Résection transurétrale de la prostate
SAMD11	Sterile alpha motif domain containing 11
SHBG	Sex Hormone Binding globulin
SIM2	Single-minded 2
SPOP	Speckle-type POZ protein

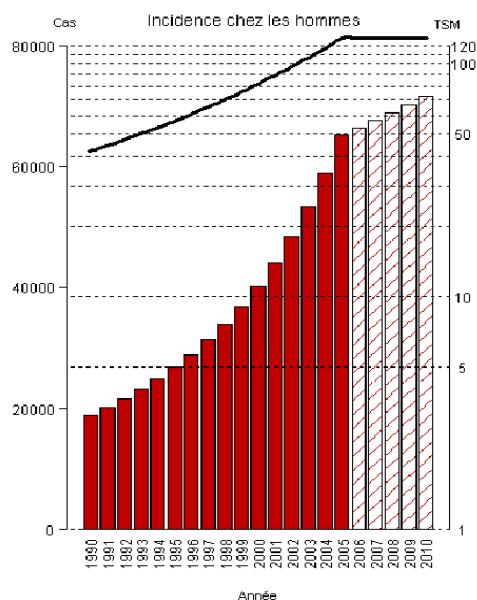
SRC3	Steroid receptor coactivator 3
TAU	Unité de transactivation
TIF2	Translation initiation factor eIF4A
TMA	Tissue Microarray
TNNT1	troponin 1
TMPRSS	Transmembrane protease, serine 2
TR	Toucher Rectal
VEGF	Facteur de croissance de l'endothelium vasculaire
VEGFR	Récepteur du VEGF

## ***1* 1. Cancer de la prostate**

## 1.1 Epidémiologie

### 1.1.1 Incidence

En France, comme dans la majorité des pays développés, le cancer de la prostate (CaP) représente un réel problème de santé publique<sup>1</sup>. En effet, il représente 26,7 % de l'ensemble des nouveaux cas de cancers masculins et avec une incidence de plus de 56000 nouveaux cas diagnostiqués en France en 2012, le CaP est au premier rang des cancers de l'homme de plus de 50 ans. Son incidence était en constante augmentation depuis plus de 2 décennies du fait de l'allongement de l'espérance de vie de la population, de l'amélioration des moyens diagnostiques et de la diffusion du dépistage individuel (Figure 1). Le taux d'incidence standardisé est ainsi passé de 24,8/100000 en 1980 à 127,1/100000 en 2005 puis a connu une diminution brutale depuis 2005 pour atteindre un taux de 99,4/100000 en 2009. Cette baisse correspond à la conjonction de deux phénomènes : l'un épidémiologique, qui est lié au fait qu'après plusieurs années de détection par le dosage du PSA, une partie des cancers prévalents sont diagnostiqués ; l'autre sociale, qui résulte de la prise de conscience d'un risque de "sur-diagnostic" par les soignants et la population, ce qui incite à la prudence vis-à-vis du dépistage<sup>2</sup>.



**Figure 1:** Représentation de l'évolution de l'incidence des CaP entre 1990 à 2010. Evolution des cas de CaP et des taux standardisés monde (TSM) (courbe, échelle logarithmique). D'après Grosclaude et al, 2015

### 1.1.2 Variabilité selon l'âge

L'incidence du CaP augmente régulièrement avec l'âge: quasiment absent avant l'âge de 40 ans, le cancer prostatique voit sa fréquence croître progressivement jusqu'à l'âge de 60-65 ans puis brutalement au-delà de 65 ans (Tableau 1). Ainsi bien que 66% des CaP soient diagnostiqués avant l'âge de 70 ans, près de 45% le sont après l'âge de 75 ans. Cependant l'âge médian au diagnostic diminue passant de 74 ans en 1995 à 70 ans de nos jours. Cette baisse est probablement liée à l'augmentation majeure de l'incidence dans la tranche d'âge 55-69 ans, du fait des recommandations actuelles de dépistage individuel.

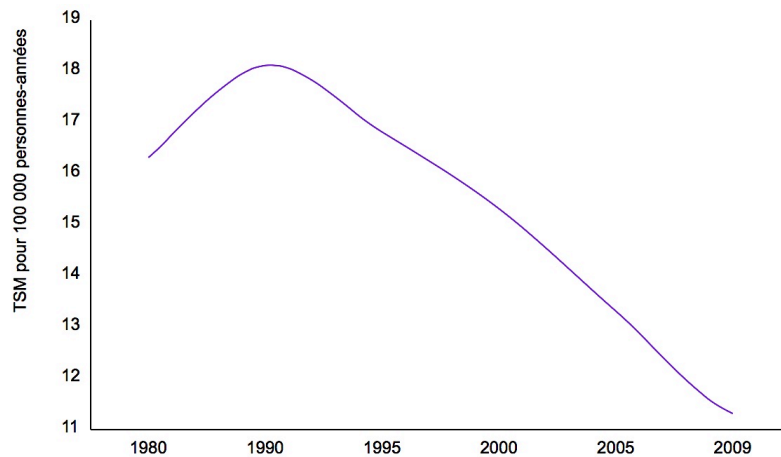
Age	0-49	50-64	65-74	75-84	≥85	Total
<b>Incidence</b>	338	17782	21391	11358	3043	53913
<b>Mortalité</b>	12	531	1315	3432	3603	8893

**Tableau 1** : Répartition par classe d'âge de l'incidence et de la mortalité en France par CaP en 2011  
[http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2011/donnees\\_localisation\\_prostate.pdf](http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2011/donnees_localisation_prostate.pdf)

### 1.1.3 Mortalité

En France, le CaP représente avec 8876 décès en 2012, la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme après le cancer du poumon et la quatrième cause de décès par cancer dans la population générale. Une première étude réalisée en 2006 avait montré une baisse de la mortalité globale par CaP entre 1988 et 2003. Depuis 2003, on note une diminution de la mortalité liée au CaP de 4,3% par an<sup>3</sup>. De plus, des données récentes montrent que le taux de mortalité (standardisé monde) par cancer de la prostate après avoir culminé en 1990 (18,1 décès pour 100000 hommes) a diminué de manière notable passant à 11,3 pour 100000 hommes en 2012 soit une baisse de 37% (Figure 2). Cette diminution constante de la mortalité peut être en rapport avec l'amélioration des conditions de prise en charge thérapeutique. Ainsi en 2006 le taux de survie globale à 5 ans d'un patient atteint d'un CaP tous stades confondus était estimé à 77%.<sup>2</sup>.





**Figure 2 :** Estimation nationale de la mortalité par CaP en France entre 1980 à 2010.. *D'après Grosclaude et al, 2015*

#### 1.1.4 Facteurs de risque

Bien qu'il existe une littérature abondante sur le sujet, seuls trois facteurs de risque de développer un CaP ont été actuellement identifiés avec certitude : l'âge, l'existence d'antécédents familiaux de CaP ou de cancer du sein (polymorphismes génétiques) ainsi que l'appartenance à la population afro-américaine ou caribéenne (origine ethnique/géographique).

### 1.2 Caractéristiques anatomopathologiques

Ce sont les travaux de McNeal et Gleason qui ont permis une meilleure connaissance de la topographie zonale des carcinomes prostatiques et de leur agressivité exprimée par le score de Gleason <sup>4</sup>.

L'étude des pièces de prostatectomie a permis de comprendre que le CaP est le plus souvent multicentrique dans la glande. Les divers foyers invasifs sont formés de glandes néoplasiques qui infiltrent le parenchyme et sont intriqués avec les lésions précancéreuses ou lésions de PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia) situées le long des grands canaux. Il est communément admis que les cancers prostatiques se développent à partir de ces lésions de PIN au niveau de différentes zones anatomiques de la prostate. Ainsi en fonction de la zone impliquée, on distingue deux grands types de cancers : les cancers de la zone de transition, représentant 10% des CaP, qui sont généralement bien différenciés, de faible score de Gleason et de découverte fortuite. Les cancers naissant de la zone périphérique sont quant à eux majoritaires et représentent près de 75% des CaP. Ces CaP sont pour la plupart peu

différenciés, s'étendent plus rapidement vers la capsule et forment des nodules palpables, accessibles au toucher rectal (TR).

### ***1.3 Taxonomie moléculaire des cancers de la prostate localisés et métastatiques***

De nombreux efforts ont été réalisés ces 3 dernières années pour caractériser les CaP sur le plan moléculaire et ce à différents stades cliniques (localisé, métastatique) mais également à différents temps (avant /après traitements). De multiples études ont identifié d'innombrables mutations somatiques récurrentes, des altérations du nombre de copies de gènes (CNA) ainsi que des réarrangements structuraux de l'ADN, appelé chromoplexie et fusion de gènes.

Le TCGA (*Tumor Cancer Genome Atlas*) a récemment publié les données moléculaires issues des analyses complètes de 333 tumeurs primitives de la prostate permettant de subdiviser les CaP en 7 sous types en fonction de la présence de gènes de fusion avec un membre de la famille *ETS* (*ERG*, *ETV1*, *ETV4*) ou la présence d'une mutation de *SPOP*, *FOXA1* ou d'*IDH1*. Par ailleurs ces analyses ont permis d'identifier différentes cibles thérapeutiques : la voie du RA, les mécanismes de réparation de l'ADN et la voie *PI3K/RAS/RAF*<sup>5,6</sup>.

#### **1.3.1 Les réarrangements génomiques :**

Un des éléments les plus récents de la littérature sur les événements moléculaires précoces de la carcinogenèse prostatique est la description de gènes de fusion impliquant le locus du gène *TMPRSS2*, codant pour une sérine protéase transmembranaire, et ceux des gènes *ERG*, *ETV1*, *ETV4* codant pour les facteurs de transcription de la famille Ets. Ces réarrangements correspondent à une translocation entre la partie promotrice de *TMPRSS2*, qui comporte des séquences androgéno-dépendantes et le locus des gènes de la famille Ets. Cette translocation crée ainsi un gène de fusion dont l'expression devient androgéno-dépendante. Il s'agit du premier mécanisme moléculaire décrit impliquant directement les activités transcriptionnelles du RA au cours de la progression des CaP. Le gène de fusion *TMPRSS2-ERG* est l'altération moléculaire la plus fréquente dans le CaP, retrouvé dans 40% à 50% des cas<sup>7</sup>.

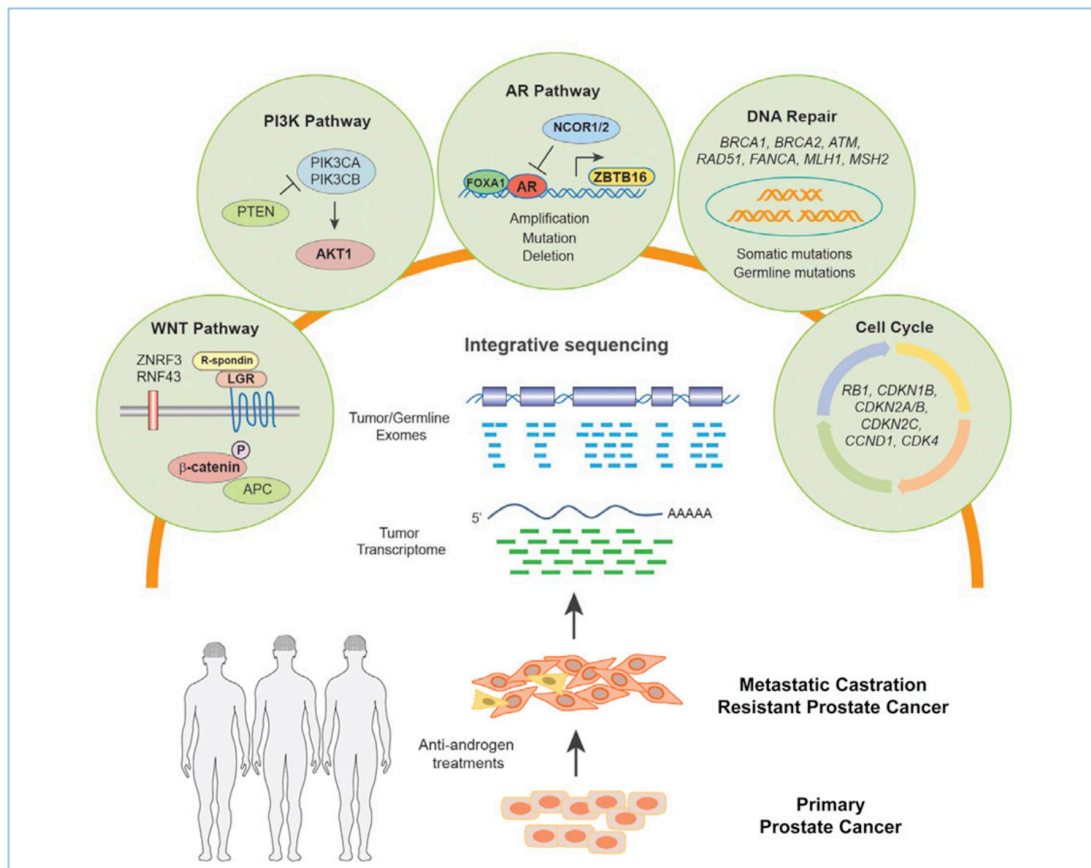
Néanmoins, dans les formes localisées de CaP traités par prostatectomie radicale, la présence d'un gène de fusion semble n'avoir aucun impact pronostique.<sup>8,9</sup>

Les CaP se caractérisent aussi par un certain degré d'altération du nombre de copies d'ADN (CNA). Les CNA sont peu nombreuses dans les tumeurs indolentes avec un faible score de Gleason, alors qu'elles sont plus élevées dans les tumeurs localisées plus agressives et les formes métastatiques<sup>10-12</sup>.

### 1.3.2 Les mutations somatiques : mutations, insertions, délétions

En comparaison avec les réarrangements génomiques, les mutations ponctuelles somatiques, englobant les mutations non-sens, des substitutions, mais également de courtes insertions et délétions, sont bien moins fréquentes dans le CaP que dans la plupart des autres tumeurs solides<sup>13</sup>. Les tumeurs primitives ne comportent ainsi qu'une à deux anomalies génomiques par million de paires de base, ce qui est loin de ce que l'on observe dans les cancers du poumon ou le mélanome. Ceci place le CaP au même niveau que les cancers du rein, du sein ou des ovaires<sup>6,14,15</sup>. Les gènes les plus fréquemment mutés vont dépendre du stade de la tumeur ainsi que l'exposition à des thérapeutiques anticancéreuses. Dans les CaP localisés les gènes les plus souvent impliqués sont *SPOP*, *TP53*, *FOXA1* et *PTEN*<sup>16</sup>, alors que dans les formes métastatiques et résistantes à la castration (CPRCm) les gènes les plus fréquemment altérés sont le gène du récepteur des androgènes (RA) (62.7%), les gènes de la famille *Ets* (56%), *TP53* (53%) et *PTEN* (40%)<sup>5</sup>

Les anomalies génomiques touchent les principales voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire et la survie cellulaire (Figure 3).



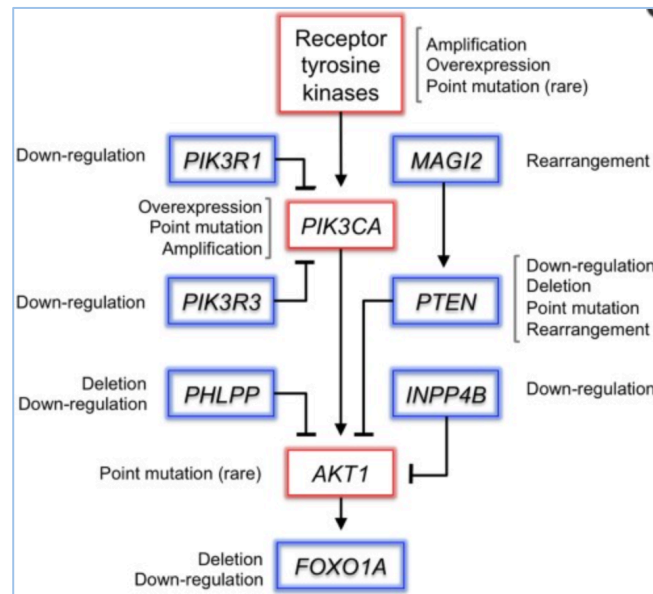
**Figure 3 :** Représentation des anomalies moléculaires affectant les différentes voies de signalisation dans les CaP. D'après Robinson et al <sup>5</sup>

### 1.3.2.1 La voie de signalisation PI3K / Akt

La voie phosphoinositide-3-kinase (*PI3K*) est une voie de signalisation cruciale impliquée dans les processus de survie cellulaire, de prolifération et d'invasion tumorales. Cette voie est l'une des plus fréquemment altérées dans les cancers humains. D'innombrables anomalies génomiques touchant différents médiateurs de cette voie en particulier des pertes de *PTEN* et des activations de *PIK3CA*, *PIK3CB* sont susceptibles de l'activer. La voie *PI3K* est altérée dans approximativement 25-70% des CaP avec une incidence plus élevée dans les formes métastatiques. Le gène *PTEN* (Phosphatase TENSin homolog gene) localisé au niveau du chromosome 10q23 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment inactivé soit par délétion du locus (40% dans les CaP localisés) ou par mutation inactivatrice dans 5 à 10%. L'inactivation de *PTEN* s'observe plus fréquemment dans les formes avancées du CaP et constitue un facteur de mauvais pronostic <sup>17,18</sup>.

L'amplification de *PIK3CA* et *PIK3CB* (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase sous unité catalytique  $\alpha$  et  $\beta$ ) codant pour les sous-unités catalytiques de *PI3K* sont des anomalies

qui surviennent dans 13-39% des formes localisés des CaP et dans près de 50% des CPRCm. Des mutations activatrice de *PIK3CA* et plus récemment de *PIK3CB* ont été décrites dans approximativement 5% des CaP et induisent une activation de la voie de signalisation. Les anomalies de *PIK3CA* sont mutuellement exclusives avec celles de *PTEN*. La voie de signalisation des PI3K/Akt peut être activée par de nombreuses autres anomalies génomiques représentées dans la figure 4.



**Figure 4:** Altérations somatiques de la voie PI3K/Akt dans les cancers de la prostate ;D'après Baca et al., 2012<sup>19</sup>

L'activation constitutive de la voie des MAPK s'observe en particulier dans les formes métastatiques du CaP et passe par des mutations activatrice de *RAS*, *RAF1* ou encore *BRAF*, mais ces anomalies restent assez peu fréquentes<sup>10</sup>.

### 1.3.2.2 La voie de signalisation du RA

Les altérations de la voie du RA revêtent une importance toute particulière dans les CaP. La majorité des altérations affectent le RA directement par des mécanismes d'amplification ou des mutations somatiques et s'observe principalement dans les CPRC et les formes métastatiques. Les variants d'épissage quant à eux s'observent dans les formes métastatiques mais également à des taux bien plus faible dans les formes localisées ainsi que dans le tissu prostatique sain.<sup>20,21</sup>

Les altérations touchant le RA sont décrites dans la première partie de ce travail de thèse. A côté des altérations du RA, ont également été décrites des mutations somatiques touchant les gènes codant pour des protéines d'interaction avec le RA. Citons notamment les mutations activatrices du facteur transcriptionnel *FOXA1* qui module l'activité transcriptionnelle du RA. D'autres mutations affectent des co-répresseurs comme *NCOR1/2*, *NRIP1* ainsi que *ZBTB16*, ou encore *NKX3-1*. Alors que les anomalies affectant le RA s'observent quasi exclusivement dans les CPRCm, les anomalies touchant les protéines d'interaction ont été décrites à la fois dans les formes métastatiques et localisées.

Les mutations inactivatrices du gène *SPOP* (speckle-type POZ protein) qui code pour une protéine composante de l'E3-ubiquitin-ligase, sont présentes dans 6-13% des CaP localisés. L'inactivation de *SPOP* conduit à une accumulation du RA par défaut de dégradation par le protéasome. Les mutations *SPOP* sont mutuellement exclusives avec les transcrit *TMPRSS2-ERG*<sup>6,16,22</sup>.

### 1.3.2.3 Altérations des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire

Plusieurs gènes régulateurs du cycle cellulaire présentent des altérations dans les CaP. Les gènes *TP53* (+/- 30-40%) et *RBI* (20-30%) sont ainsi fréquemment délétés ou mutés dans les CaP localisés et métastatiques. De plus, des amplifications de *CCND1* (9% des CaP métastatiques) ainsi que moins fréquemment (<5%) des anomalies de *CDKN2A/B*, *CDKN1B* et *CDK4* ont été décrites. L'ensemble de ces anomalies rendent certains CaP potentiellement ciblables par les inhibiteurs de *CDK4/6* tel le palbociclib<sup>23</sup>.

### 1.3.2.4 Altérations des mécanismes de réparation de l'ADN

Les données récentes du *Tumor Cancer Genome Atlas (TCGA)* rapportent des délétions ou mutations constitutionnelles et somatiques induisant des perte de fonction de *BRCA2* dans approximativement 12% des CaP métastatiques. D'autres altérations des mécanismes de réparations ont été rapportées avec des délétions ou mutations inactivatrices affectant *ATM*, *BRCA1*, *CDK12*, *FANCA*, *RAD51B* et *RAD51C*. L'ensemble de ces anomalies confère au patient une sensibilité aux inhibiteurs de *PARP* tel l'olaparib pour lesquels les études cliniques sont en cours de recrutement. D'autres anomalies génomiques (mutations, délétions ou hyperméthylations) inactivent les gènes du mismatch repair comme *MLH1*, *MSH2* ou *MSH6*.<sup>24,25</sup>

### 1.3.2.5 Altérations de la voie Wnt

Les altérations des gènes de la voie *Wnt* n'ont été décrites que récemment. Les gènes impliqués sont en particulier des pertes de fonction d'*APC* (perte d'hétérozygotie ou hyperméthylation) et des mutations activatrices du gène *CTNNB1* codant pour la  $\beta$ -caténine. D'autres altérations génomiques touchent les gènes *RNF43* et *ZNRF3* dont la présence semble prédictive de réponse aux inhibiteurs de porcupine <sup>26</sup>.

## 1.4 Facteurs pronostiques :

Le CaP est le plus souvent diagnostiqué à un stade localisé chez des patients le plus souvent asymptomatiques. Classiquement on distingue les cancers qui restent indolents pendant plusieurs années de ceux qui présentent des caractéristiques évolutives nécessitant une prise en charge thérapeutique plus agressive. Ainsi différentes stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées selon la situation. Devant cette hétérogénéité, l'individualisation et la reconnaissance de facteurs pronostiques à différents stades évolutifs sont essentielles dans le processus de décision thérapeutique.

Il existe une littérature très abondante concernant différents facteurs pronostiques des CaP qui peuvent être regroupés en facteurs pronostiques classiques validés ou en cours d'évaluation.

### 1.4.1 Facteurs pronostiques classiques

Parmi les facteurs pronostiques classiques validés on compte le stade clinique, le taux de PSA et le score de Gleason. Avec le recul et l'accumulation de données exploitables, leur intérêt a été précisé.

#### 1.4.1.1 Stade Clinique

Le stade de la tumeur, selon la classification TNM est le plus ancien des facteurs pronostiques validés (Tableau 2) <sup>27</sup>. Cette classification tient compte du volume tumoral, de son extension extracapsulaire, ganglionnaire et métastatique. Pour l'évaluation du volume tumoral et de l'extension extracapsulaire, le toucher rectal, dont les renseignements restent très subjectifs, reste un élément indispensable. Cependant, c'est l'imagerie avec l'IRM pelvienne, qui permet d'établir l'extension locorégionale de la manière la plus fiable. En effet l'extension extracapsulaire (T3) demeure un paramètre limitant à la réalisation d'une chirurgie car

associée à une probabilité supérieure à 70% de marges positives. L'extension métastatique viscérale et/ou osseuse est quant à elle établie au moyen d'un scanner thoraco-abdomino-pelvien ainsi que d'une scintigraphie osseuse.

**Tableau 2** : Stade clinique TNM (AJCC 2009)

<p><b>T : Tumeur primitive</b></p> <p>T1 : Tumeur cliniquement inapparente, non palpable, ni visible en imagerie</p> <p>    T1a : Tumeur de découverte fortuite dans 5% ou moins du tissu réséqué</p> <p>    T1b : Tumeur de découverte fortuite dans plus de 5% du tissu réséqué</p> <p>    T1c : Tumeur découverte sur ponction-biopsie à l'aiguille dans 1 ou 2 lobes</p> <p>T2 : Tumeur limitée à la prostate</p> <p>    T2a : Tumeur intéressant la moitié d'un lobe ou moins</p> <p>    T2b : Tumeur intéressant plus de la moitié d'un lobe mais pas les 2 lobes</p> <p>    T2c : Tumeur intéressant les 2 lobes</p> <p>T3 : Tumeur dépassant la prostate</p> <p>    T3a : Extension extracapsulaire unilatérale ou bilatérale</p> <p>    T3b : Tumeur envahissant la (ou les) vésicule(s) séminale(s)</p> <p>T4 : Tumeur fixée ou infiltrant les structures adjacentes autres que les vésicules séminales, tumeur infiltrant le col vésical, le sphincter externe, le rectum, les muscles releveurs ou la paroi pelvienne</p> <p><b>N : Ganglions</b></p> <p>N0 : Absence de métastase ganglionnaire</p> <p>N1 : Atteinte ganglionnaire régionale</p> <p><b>M : Métastases</b></p> <p>M0 : Absence de métastase à distance</p> <p>M1 : Métastase à distance</p> <p>    M1a : Ganglions non régionaux</p> <p>    M1b : Métastases osseuses</p> <p>    M1c : Autres sites avec ou sans atteinte osseuse</p>
---



#### 1.4.1.2 Score de Gleason :

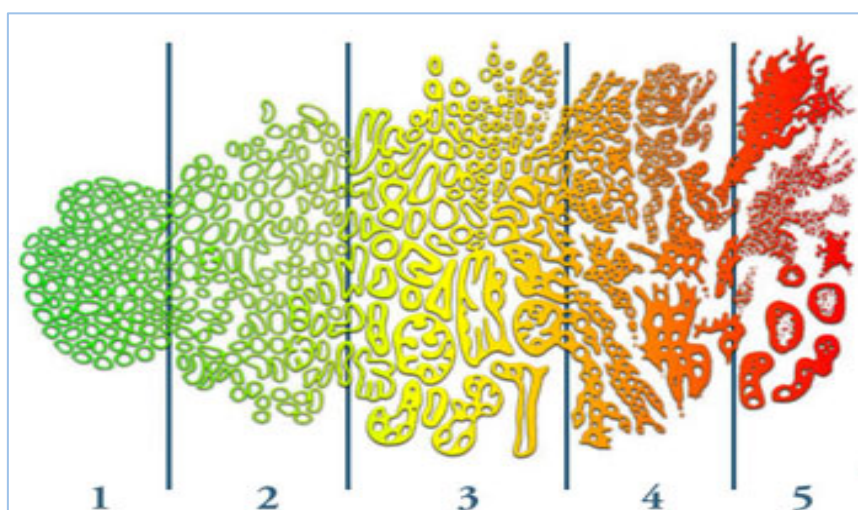
Le score de Gleason est le facteur anatomopathologique le plus important <sup>4</sup>. C'est un indice composite dont la valeur est obtenue en additionnant le grade histologique (coté de 1 à 5, du plus au moins différencié) des 2 territoires les plus largement représentés au sein de la tumeur. S'il existe plus de deux grades, on additionne le grade du territoire le plus représenté au grade de la tumeur le plus élevé (Tableau 3 ; Figure 4). Ainsi, le score donne une estimation du niveau de différenciation de la tumeur. Un score élevé supérieur à 7 est associé à un mauvais pronostic avec une survie globale limitée ; à l'inverse un score < 7 est de bon pronostic. Lorsque le score est de 7, le pronostic diffère selon la valeur du grade histologique du territoire le plus largement représenté. Ainsi un score 4+3 est de moins bon pronostic qu'un score 3+4 <sup>28</sup>.

Ce score a évolué depuis sa description initiale avec comme changement le plus récent, une définition du score de 6 comme étant le plus faible pouvant être attribué à une tumeur. Lors de la dernière conférence de consensus en 2014, anatomopathologistes et cliniciens ont admis que malgré les changements opérés pour mieux caractériser chacun des grades de Gleason, il persistait d'importantes lacunes avec ce système. En effet, le système de classification considérait le score de Gleason 7 comme un seul score unique sans distinguer le 3+4 au 4+3, malgré des études ayant montré le moins bon pronostic de ce dernier. La base d'un nouveau système de classement a été proposée en 2013 à partir des données de l'hôpital Johns Hopkins. Ce système distingue 5 groupes de grades avec un pronostic distinct et a été validé sur plus de 20.000 pièces de prostatectomie radicale, plus de 16.000 échantillons de biopsies prostatiques, et plus de 5000 biopsies suivies d'une radiothérapie. Un large consensus a conduit en 2014 à l'adoption de ce nouveau système de classement en 5 groupes des CaP visant à une meilleure stratification du risque des tumeurs (Tableau 4). Le nouveau système de classement et la terminologie des Groupes 1 à 5 ont également été acceptés par l'Organisation mondiale de la Santé pour l'édition 2016 de pathologie et de génétique: Tumeurs du système urinaire et organes génitaux masculins. <sup>29,30</sup>

**Tableau 3 :** Caractéristiques des 5 grades de Gleason (AJCC2009)

Grade	Glandes tumorales / Epithélium	Aspect histologique
1	Prolifération monotone de glandes simples, arrondies étroitement regroupées	Nodules arrondies aux bords bien dessinés
2	Glandes simples, arrondies, plus dispersées	Masse vaguement arrondies, aux bords mal définis
3A	Glandes simples, de tailles moyennes, de forme, de taille et d'espacement irrégulier	Masses irrégulières aux bords déchiquetés
3B	Glandes simples, de très petites tailles, de formes, de taille et d'espacement irrégulier	Masses irrégulières aux bords déchiquetés
3C	Massif épithéliaux cribiformes ou papillaires à bords réguliers	Zones irrégulières constituées de cylindres et massifs arrondis
4A	Massifs épithéliaux de glandes fusionnées	Massifs et cordons irréguliers de glandes fusionnées
4B	Même aspect que 4A, avec présence de cellules claires	Massifs et cordons irréguliers, aspects d'hypernéphrome
5A	Massifs arrondis papillaires ou cribiformes avec nécrose centrale	Cylindres et massifs arrondis disposés de façon variable, avec nécrose
5B	Adénocarcinomes anaplasique	Massifs très irréguliers

**Figure 5 :** Schéma du score de Gleason (AJCC2009)



**Tableau 4:** *Nouveau système de classement pronostique des CaP d'après Epstein et al 2016*<sup>30</sup>

<b>Groupe 1</b>	<b>score de Gleason <math>\leq 6</math></b>
<b>Groupe 2</b>	<b>score de Gleason <math>3 + 4 = 7</math></b>
<b>Groupe 3</b>	<b>score de Gleason <math>4 + 3 = 7</math></b>
<b>Groupe 4</b>	<b>score de Gleason <b>8</b></b>
<b>Groupe 5</b>	<b>score de Gleason <b>9-10</b></b>

#### 1.4.1.3 Taux de PSA, cinétique, temps de doublement

Le taux de PSA sérique mesuré au moment du diagnostic et son évolution à différents stades de la maladie représente un troisième facteur pronostique majeur <sup>31</sup>. Un taux de PSA <10 ng/ml est ainsi classiquement considéré comme facteur de bon pronostic. Il est alors admis qu'il n'y a pas lieu de réaliser un bilan d'extension osseux <sup>32</sup>. Par contre un taux >20 ng/ml est associé à un risque élevé de récurrence ou d'évolution métastatique. Plus récemment, la cinétique du taux de PSA, le nadir après traitement initial tout comme le temps de doublement du marqueur ont démontré leur valeur pronostique indépendante déterminante au stade localisé tout comme au stade métastatique.

#### 1.4.2 Autres facteurs pronostiques

Plusieurs travaux ont confirmé chez des patients traités par prostatectomie la valeur pronostique de nombreux facteurs parmi lesquels figurent le pourcentage de biopsies positives <sup>33</sup>, les marges positives <sup>34</sup> et l'infiltration des vésicules séminales <sup>35</sup> sur la probabilité de récurrence locale, biologique ou la récurrence métastatique à distance. A un stade plus avancé, la différenciation neuroendocrine de la tumeur a également été rapportée comme facteur de mauvais pronostic<sup>36</sup>.

#### *Groupes pronostiques et nomogrammes*

Depuis plusieurs années, la décision thérapeutique repose sur la combinaison de différents facteurs pronostiques regroupés au sein de classifications des patients en « groupes à risque ».

La classification la plus communément utilisée est celle définie par D'Amico et coll., adaptée par Kattan (Tableau 5)<sup>37</sup>. Cette classification a l'avantage d'être simple, de tenir compte des facteurs validés et communément utilisés en routine clinique (PSA, TNM, score de Gleason), ainsi que de nouveaux paramètres plus récents tels que la combinaison des sous-scores de Gleason (7 ; 3+4 ou 4+3), ou le pourcentage de biopsies positives.

Afin d'améliorer le niveau de prédiction, d'innombrables modèles statistiques ont été développés sous forme de nomogrammes. Ainsi différents nomogrammes, pas toujours validés, sont disponibles selon le stade de la maladie et l'événement étudié<sup>38</sup>. Ces nomogrammes sont des outils d'aide à la décision qui peuvent être utiles aux cliniciens à condition de choisir celui qui correspond à la question posée et d'en connaître les limites.

**Tableau 5** : Groupes à risque avant traitement. Adapté de Kattan et al.<sup>37</sup>

Risque	Critères classiques	Risque faible	Risque élevé
<b>Faible</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PSA &lt; 10 ng/ml</li> <li>• score de Gleason ≤ 6</li> <li>• stade ≤ T2a</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt; 50 % biopsies positives</li> <li>• PSA &lt; 6 ng/ml</li> <li>• score de Gleason &lt; 5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt; 50 % biopsies positives</li> </ul>
<b>Intermédiaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PSA entre 10 et 20 ng/ml</li> <li>• score de Gleason = 7</li> <li>• stade T2b</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt; 50 % biopsies positives</li> <li>• PSA &lt; 15 ng/ml</li> <li>• score de Gleason = 7 (3 + 4)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt; 50 % biopsies positives</li> <li>• score de Gleason = 7 (4 + 3)</li> </ul>
<b>Haut</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PSA &gt; 20 ng/ml</li> <li>• score de Gleason &gt; 7</li> <li>• stade &gt; T2b</li> </ul>		

L'arrivée de nouvelles thérapeutiques a rendu nécessaire l'identification de biomarqueurs moléculaires ayant potentiellement une valeur pronostique et/ou prédictive.

Une meilleure compréhension des processus moléculaires de la carcinogenèse prostatique a conduit à l'identification croissante de facteurs pronostiques et prédictifs potentiels, tels que l'expression de gènes de fusion comme *TMPRSS2:ERG*, la perte de *PTEN*, et l'élaboration de plusieurs signatures moléculaires à partir du tissu tumoral. Plusieurs de ces signatures moléculaires avec une validation externe sont maintenant disponibles, bien que la plupart de ces outils ne soient pas encore largement utilisés. Les signatures moléculaires les plus étudiées s'appellent Prolaris, Oncotype DX Genomic Prostate Score et Decipher genomic classifier, et peuvent être utilisées pour estimer les risques de rechute en plus des paramètres cliniques actuellement disponibles. ConfirmMDx est quant à lui un test épigénétique qui étudie la méthylation par PCR de certains gènes cibles (*GSTPI*, *APC* et *RASSF1*) et qui est utilisé pour prédire les résultats d'une éventuelle rebiopsie prostatique après une première série de biopsies négative. Les stratégies futures visent à intégrer les informations moléculaires des cellules tumorales circulantes (CTC) ou de l'ADN circulant pour guider les décisions thérapeutiques aux différents stades de la maladie <sup>39</sup>.

## ***1.5 Traitement***

### **1.5.1 Cancers de la prostate localisés**

La prise en charge thérapeutique des formes localisées de CaP découle de la stratification du risque évolutif établie sur la valeur de différents facteurs pronostiques qui permettent d'estimer le risque de récurrence biologique et le taux de mortalité spécifique par cancer après les différentes options thérapeutiques que sont la prostatectomie radicale, la radiothérapie ou encore la curiethérapie.

De plus l'espérance de vie des patients, qui sont pour la plupart âgés, entre en ligne de compte au moment de la décision thérapeutique. Ainsi un seuil minimal d'espérance de vie de 10 années a été retenu pour proposer un traitement à visée curative pour un CaP localisé.

Diverses modalités de prise en charge peuvent être envisagées pour les CaP localisés incluant une surveillance avec traitement différé, une surveillance active, une prostatectomie totale, une radiothérapie externe, une curiethérapie ou plus rarement l'HIFU (Ultrasons focalisés de haute intensité) que nous n'allons pas aborder dans ce document.

### 1.5.1.1 Surveillance de type « watchful waiting » et surveillance active

La surveillance avec traitement différé consiste à instaurer un traitement palliatif ou hormonal à l'apparition de signes de progression locaux ou généraux. Cette stratégie ne peut être envisagée que pour les patients ayant un CaP localisé à faible risque avec une espérance de vie de moins de 10 ans <sup>40</sup>.

De manière plus récente est apparue la notion de surveillance active qui repose sur l'hypothèse de formes latentes du CaP, non ou peu évolutives pouvant ne pas s'exprimer cliniquement du vivant du patient. La surveillance active consiste en la réalisation annuelle d'un bilan comprenant un TR, un dosage de PSA, ainsi que des biopsies de contrôle. Un traitement actif curatif sera proposé en cas de survenue d'un des événements suivants : stade T2a, temps de doublement de PSA < 3 ans, plus de 2 biopsies positives, score de Gleason  $\geq 7$  ou à la demande du patient. Une telle surveillance active a deux objectifs :

- proposer un traitement radical pour les cancers localisés à faible risque initial mais enclins à progresser,
- réduire le risque des effets secondaires et des complications des traitements pour des cancers non susceptibles de progresser.

Les dernières données de la littérature rapportent pour cette stratégie thérapeutique une survie globale à 10 ans de l'ordre de 93% <sup>41</sup>.

### 1.5.1.2 Chirurgie : Prostatectomie radicale

La prostatectomie totale associée à l'exérèse bilatérale des vésicules séminales est le traitement de référence des tumeurs localisées de la prostate chez l'homme avec une espérance de vie de plus de 10 ans et habituellement d'un âge < 70 ans, bien qu'il n'existe pas de règle absolue concernant la limite d'âge supérieure. Le curage ganglionnaire ilio-obturateur est quant à lui optionnel pour les cancers à faible risque, mais reste souhaitable pour les cancers de risque intermédiaire. Afin de limiter les complications de la chirurgie sur la fonction sexuelle, en particulier la fonction érectile, une préservation des bandelettes neuro-vasculaires peut être envisagée dans les cancers de faible risque à condition qu'il n'y ait pas de risque d'extension extra-capsulaire. Les résultats carcinologiques de la prostatectomie totale font état d'une survie sans récurrence biologique variable suivant les séries et le stade tumoral <sup>42,43,44,45</sup>.

Pour certains patients présentant une tumeur à haut risque la prostatectomie totale reste envisageable mais doit répondre à des critères de qualité très stricts: elle doit être précédée d'un curage ganglionnaire étendu, élargie aux tissus péri-prostatiques, non conservatrice des bandelettes vasculo-nerveuses et du col vésical.

Plusieurs études ont montré qu'une radiothérapie adjuvante améliore la survie sans récurrence biologique et sans progression à 5 ans lorsque les critères anatomopathologiques post-opératoires montrent une extension extra-prostatique, un envahissement séminal ou des limites chirurgicales envahies<sup>46,47,48</sup>. Cependant aucun bénéfice en termes de survie globale n'a été rapporté à ce jour. Son rôle par rapport à une radiothérapie de rattrapage reste débattu.

### 1.5.1.3 Radiothérapie / Curiethérapie

La curiethérapie exclusive consiste à implanter par voie périnéale sous contrôle échographique et sous anesthésie générale des grains d'I<sup>125</sup>. Ce traitement ne peut être proposé qu'à des patients présentant un CaP localisé sans extension extra-prostatique de stade  $\leq$  T2b, score de Gleason  $\leq$  6 (pas de grade 4 prédominant) et PSA  $\leq$  10 ng/ml<sup>32</sup>. Les résultats carcinologiques sont comparables à ceux obtenus avec les autres techniques et font état d'une survie sans rechute biologique à 10 ans de l'ordre de 95% en cas d'implantation satisfaisante.

La radiothérapie externe utilisée depuis longtemps dans le traitement des CaP a vu, depuis les années 80', ses indications augmenter grâce aux nouvelles générations d'accélérateurs linéaires. Ainsi la radiothérapie conformationnelle et l'IMRT ont profondément modifié le traitement des CaP. Le volume cible comporte dans les formes de faible risque la glande prostatique, les vésicules séminales et la dose minimale administrée est de 70 Gy en 35 fractions<sup>49,50</sup>. Pour les formes à risque intermédiaire le volume d'irradiation dépend de l'existence d'un envahissement ganglionnaire déterminé par la lymphadectomie pré-thérapeutique. La dose totale recommandée est alors au minimum de 74 Gy. De plus, une hormonothérapie courte (6 mois) par agonistes de la LHRH associée à l'irradiation améliore la survie de ces patients<sup>51,52</sup>.

Enfin, pour les patients du groupe à risque élevé avec une espérance de vie  $>10$  ans, l'association hormono-radiothérapie conformationnelle reste le traitement de référence<sup>32</sup>. En effet, plusieurs études concordantes ont démontré l'apport d'une hormonothérapie adjuvante de 3 ans en termes de survie sans récurrence biologique<sup>53</sup>. La dose d'irradiation doit être au minimum de 70 Gy. L'irradiation des aires ganglionnaires reste optionnelle.

### 1.5.2 **Cancers de la prostate métastatiques**

L'hormonothérapie reste à ce jour le traitement de référence de première ligne du CaP au stade métastatique. Cette stratégie thérapeutique est basée sur la privation androgénique depuis la démonstration dès 1941 par Huggins et Hodges de l'androgéno-dépendance des CaP<sup>54</sup>.

## 1.6 **Hormonothérapie**

### 1.6.1 **Hormonothérapie de 1<sup>e</sup> génération**

#### 1.6.1.1 **La Castration Chirurgicale / Médicale**

L'hormonothérapie de première ligne vise à induire une privation androgénique. Les testicules représentant la source principale de production d'androgènes, la castration chirurgicale (orchidectomie bilatérale ou pulpectomie) a longtemps constitué le traitement de choix des CaP évolués. Cependant elle fut concurrencée par la castration médicale qui vise à supprimer la sécrétion d'androgènes testiculaires par l'inhibition de la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires :

- soit par désensibilisation des récepteurs hypophysaires de la LHRH au moyen d'agonistes de la LHRH à action prolongée,

- soit par blocage direct des récepteurs hypophysaires de la LHRH au moyen d'antagonistes de la LHRH (Dégarelix, Firmagon®).

Les taux de réponse et la durée de rémission obtenus par la castration chirurgicale, les agonistes et antagonistes de la LHRH sont équivalents. L'avantage des antagonistes est lié à l'absence d'effet flare-up observé avec les agonistes, la rapidité de la chute du taux de testostérone ainsi qu'à priori des effets cardiovasculaires moins marqués.

#### 1.6.1.2 **Antagonistes des récepteurs des Androgènes.**

- **1<sup>ère</sup> Génération**

Les anti-androgènes constituent la première thérapie ciblée du CaP. L'hydroxyflutamide (métabolite actif du flutamide; Eulexin®, Schering-Plough), le bicalutamide (Casodex®, Astra Zeneca) et le nilutamide (Anandron®, Roussel) sont des antagonistes non stéroïdiens du RA par opposition à l'acétate de cyprotérone (Androcur®, Bayer) qui est un antagoniste



stéroïdien. Ils se lient tous au niveau du site de liaison (LBD) du RA pour en inhiber l'activité. Les anti-androgènes non stéroïdiens ont comme particularité d'être plus sélectifs pour le RA et dépourvus d'effets anti-gonadotropes, anti-oestrogéniques et progestatifs.

Les mécanismes d'action de ces molécules restent encore obscurs. Plusieurs hypothèses ont néanmoins été émises :

- compétition des anti-androgènes avec les androgènes pour la liaison aux RA ; cependant ces antagonistes de synthèse ont une moindre affinité que le ligand naturel,
- inhibition du transport nucléaire des RA ou augmentation de l'export nucléaire, conduisant à une accumulation cytoplasmique des RA,
- inhibition de la liaison du RA à l'ADN,
- interactions avec le recrutement de co-facteurs. Masiello *et al.* rapportent ainsi que le complexe RA-bicalutamide se lierait à l'ADN en recrutant des co-répresseurs empêchant ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles <sup>55</sup>.

## 1.6.2 Résistance à la castration

Pendant de nombreuses années les CaP échappant aux hormonothérapies dites de 1<sup>e</sup> génération ont été considérés comme hormonorésistants. Il est maintenant communément admis que la voie de signalisation du RA reste active dans cette situation ce qui explique pourquoi ces CaP actuellement dénommés « cancer de la prostate résistant à la castration » (CPRC) peuvent encore répondre à des manipulations hormonales.

La résistance à la castration est définie par la reprise évolutive biologique et/ou clinique du cancer malgré une castration efficace. En effet bien que 80% des patients répondent à la première ligne d'hormonothérapie, tous les patients présentent une reprise évolutive qui survient avec un délai très variable après la mise en route de la privation androgénique. Ainsi plusieurs traitements de 2<sup>e</sup> ligne ont été proposés aux patients par le passé et qui ont fait place actuellement aux hormonothérapies dites de 2<sup>e</sup> génération.

### 1.6.2.1 Blocage androgénique complet

Lorsque la première ligne d'hormonothérapie a consisté en une castration médicale ou chirurgicale seule, il est possible d'y associer secondairement un anti-androgène afin de réaliser un blocage androgénique complet. En rajoutant un antiandrogène à un agoniste de la LHRH (ou à la pulpectomie), une réponse biologique est obtenue dans 60 à 80% des cas pour

une durée médiane de réponse de 4 à 6 mois. Après progression sous BAC, la règle actuelle est de chercher un syndrome de retrait des anti-androgènes.

### 1.6.2.2 **Syndrome de retrait**

Rapporté initialement avec le flutamide en 1993, le syndrome de retrait est observé avec les autres anti-androgènes (bicalutamide) et l'acétate de mégésterol<sup>56</sup>. Ainsi 4 à 6 semaines après arrêt de l'anti-androgène, approximativement 30% des patients présentent une baisse de plus de 50% de la valeur du PSA, avec une durée médiane de 4 mois.

### 1.6.2.3 **Historique des hormonothérapies de seconde ligne**

Le rationnel de l'hormonothérapie de 2<sup>e</sup> ligne après castration est basé sur le concept qu'une suppression supplémentaire des influences androgéniques peut entraver la survie et la prolifération de cellules tumorales restant dépendantes de la stimulation par de faibles doses d'androgènes. Trois approches ont été utilisées historiquement pour réduire l'influence ou le taux des androgènes résiduels :

- le recours aux anti-androgènes à forte dose (bicalutamide 150-200mg/j) qui présente une action chez 25% des patients en terme de diminution des douleurs et d'amélioration subjective des symptômes, mais sans réponse objective<sup>57</sup>
- le recours au Diethylstilbestrol (DES), dérivé oestrogénique bloquant la sécrétion de LHRH, avec près de 50% de réponses objectives sur le PSA et 20% sur l'amélioration subjective des symptômes<sup>58</sup>
- le recours à diverses manipulations hormonales visant à bloquer la synthèse de testostérone à partir des précurseurs surrénaliens ou la synthèse intra-prostatique de DHT à partir de la testostérone. Ces manipulations hormonales consistent en l'utilisation des :

- ***Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de la testostérone en dihydrotestostérone***

Dans la majorité des tissus-cibles, la testostérone est convertie en DHT par la 5 $\alpha$  réductase. Le *finastéride* et le *dutastéride* sont deux inhibiteurs compétitifs de la 5 $\alpha$  réductase. Bien que ces deux molécules soient essentiellement prescrites pour les hyperplasies bénignes de la prostate, les données récentes sur le maintien de l'activité du RA dans l'échappement hormonal tout comme celles sur la synthèse de testostérone *de novo* dans la tumeur supportent l'idée que les inhibiteurs de la 5 $\alpha$  réductase pourraient avoir leur place dans le traitement du CaP en échappement hormonal<sup>59</sup>.

- ***Inhibiteurs de la biosynthèse de stéroïdes surrénaliens***

Historiquement, le ***kétoconazole***, un imidazole anti-fongique, a été utilisé dans le but d'inhiber de manière non sélective plusieurs enzymes dépendantes des cytochromes P450 impliquées dans la synthèse de stéroïdes surrénaliens, ce qui induisait, à des doses élevées de l'ordre de 1200mg/j, un effondrement des taux circulants de testostérone, d'androstènedione, de DHEA et de DHEAS. La synthèse du cortisol étant également bloquée, un traitement substitutif par glucocorticoïdes y était habituellement associé. Plusieurs études rapportent des taux de réponses objectives transitoires de l'ordre de 20 à 30% au stade de résistance à la castration, mais avec une toxicité qui n'était pas négligeable (asthénie, toxicité cutanée, hépatique et pulmonaire) ce qui a conduit au retrait de l'AMM du kétokonazole.

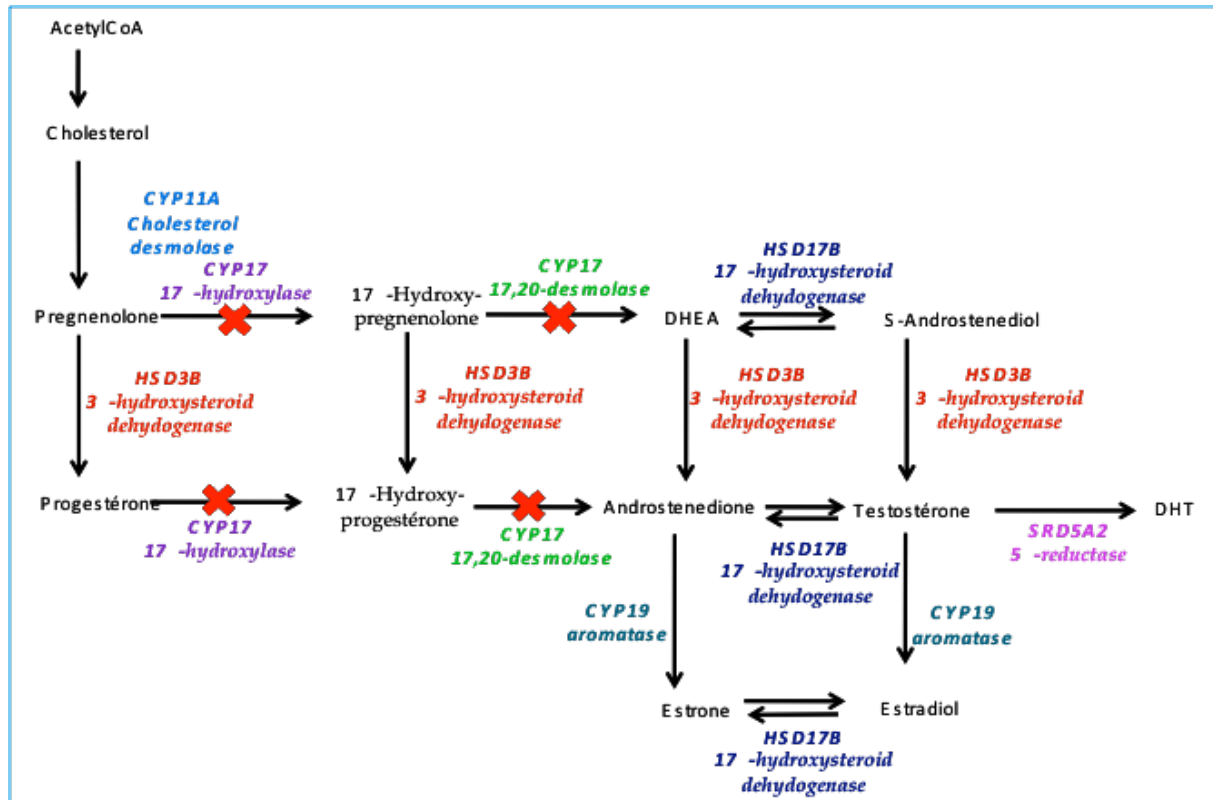
L'ensemble de ces manipulations hormonales de seconde ligne ont été largement abandonnées en raison des complications métaboliques et l'arrivée récente des hormonothérapies dites de 2<sup>nd</sup>e génération, incluant des inhibiteurs d'enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse des androgènes avec en chef de file l'acétate d'abiratérone.

### 1.6.3 Hormonothérapie de 2<sup>nd</sup>e génération

#### 1.6.3.1 Inhibiteurs de la voie de biosynthèse des stéroïdes

L'**acétate d'abiratérone** (AA) est un inhibiteur sélectif et irréversible du cytochrome CYP17A1 (aussi appelé 17 $\alpha$  hydroxylase / 17,20 desmolase) enzyme clé de la voie de biosynthèse de la testostérone au niveau testiculaire, surrénalien mais également intratumoral (Figure 5). Cette molécule a été développée suite à l'observation que les cellules de CaP étaient capables de synthétiser des androgènes au niveau intratumoral par augmentation de l'expression d'enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse. Cette stéroïdogénèse autocrine à partir du cholestérol membranaire ou d'androgènes surrénaliens constitue un mécanisme de résistance à la déprivation androgénique qui peut être ciblé par l'AA. Des études encourageantes de phase I et II ont rapporté un taux de réponses, définie par une chute de PSA, de l'ordre de 70% et associé à des réductions tumorales et une amélioration de la qualité de vie des patients<sup>60</sup>. Ces résultats ont conduit à deux études de phases III randomisées, comparant l'abiratérone à un bras placebo chez des patients avec un CPRCm après une 1<sup>e</sup> ligne de chimiothérapie par Docétaxel, (COU-AA-301) et des patients chimionatifs avec un CPRCm pas ou peu symptomatique (COU-AA-302)<sup>61,62</sup>. Les deux études ont montré une

amélioration de la survie sans progression ainsi que de la survie globale ce qui a conduit à l'obtention de l'AMM de l'acétate d'abiratéron (Zytiga®) dans ces deux indications. De nombreuses études évaluent actuellement l'utilisation de l'abiratéron dans les stades plus précoces de la maladie ainsi que dans des stratégies de combinaisons.



**Figure 6 :** Voie de biosynthèse des androgènes et cible de l'acétate d'abiraterone

### 1.6.3.2 Antiandrogènes de 2<sup>nd</sup>e Génération: Enzalutamide, ARN509

Une seconde génération d'anti-androgènes avec comme chef de file l'enzalutamide a été développée ces dernières années. L'enzalutamide présente une affinité accrue pour le RA, limite le transport nucléaire, altère la liaison de l'ADN aux éléments de réponse aux androgènes (ARE) et le recrutement de co-activateurs<sup>63</sup>. Dès l'étude de phase I-II, l'enzalutamide, alors encore appelé MDV3100, avait montré des résultats prometteurs dans les CPRCm avec des taux de réponse du PSA (diminution de plus de 50%) chez 78% des patients. Deux études d'enregistrement de phase III randomisées ont été menées versus placebo chez des patients avec un CPRCm soit avant docétaxel (PREVAIL), soit en post docétaxel (AFFIRM)<sup>64,65</sup>. Dans l'étude AFFIRM, 1199 patients atteints d'un CPRCm et prétraités par docétaxel ont été randomisés entre un bras enzalutamide et un bras placebo.

L'objectif principal de l'étude a été atteint avec une amélioration de la survie globale passant de 13.6 mois dans le bras placebo à 18.4 mois dans le bras enzalutamide (HR=0.63 ;95% 0.53-0.75 ;p<0.0001) <sup>64</sup>. Tous les objectifs secondaires ont également été atteints dans cette étude qui a conduit à l'obtention de l'AMM de l'enzalutamide dans cette indication.

Dans l'étude PREVAIL, 1717 patients asymptomatiques ou peu symptomatiques ont été randomisés entre enzalutamide 160mg/j et placebo. Les deux critères de jugement principaux ont été atteints avec une amélioration de la survie sans progression radiologique (HR=0.186, IC95% :0.15-0.23, ;p<0.0001) et un gain en survie globale, le tout avec un excellent profil de toxicité (fatigue, hypertension artérielle) <sup>65</sup>. De nombreuses études sont actuellement en cours afin d'évaluer la place de l'enzalutamide dans les formes localisées des CaP, dans les formes hormonosensibles, dans les CPRC non métastatiques ou encore dans d'innombrables combinaisons avec d'autres hormonothérapies, des chimiothérapies ou encore le radium-223. D'autres études évaluent d'autres anti-androgènes parmi lesquels l'ARN509 dans des formes plus précoces de CPRC (NCT01946204).

Cependant malgré les progrès effectués suite à l'arrivée de ces nouvelles hormonothérapies, le CaP reste incurable au stade métastatique et de nombreux efforts sont en cours afin d'améliorer nos connaissances concernant la biologie de ces tumeurs dans le but de contourner les mécanismes de résistance aux thérapeutiques actuelles et de permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

## ***1.7 Chimiothérapie :***

### **1.7.1 Un peu d'histoire : la Mitoxantrone**

Les CPRCm ont représenté pendant de longues années une impasse thérapeutique, de pronostic redoutable avec une médiane de survie d'environ 12 mois et une importante morbidité osseuse dont la prise en charge se résumait le plus souvent à des traitements symptomatiques de type radiothérapie (externe ou métabolique) à visée antalgique.

La chimiothérapie n'avait qu'une place très limitée en raison du manque de drogues cytotoxiques actives en monothérapie dans ce type de cancer. Il a fallu attendre la fin des années 1990 et l'arrivée d'un nouveau critère de jugement pour définir une réponse biologique objective : la baisse de 50% du taux de PSA <sup>66</sup>.

Ceci a permis d'inclure des patients présentant des localisations osseuses isolées dans les essais thérapeutiques. Dans les premières études de phase II, les critères de jugement se sont

focalisés sur la qualité de vie et le bénéfice clinique des patients. C'est ainsi que deux études de phase III randomisées comparant mitoxantrone (novantrone®)/ corticothérapie versus corticothérapie seule ont montré une amélioration de la qualité de vie pour le bras mitoxantrone/corticoïdes qui est devenu le traitement de référence en 2000 <sup>67,68</sup>.

### 1.7.2 Chimiothérapie de 1<sup>ère</sup> ligne :

Il a fallu attendre 2004 et l'essai TAX-327 pour montrer pour la première fois une amélioration de la survie globale par une chimiothérapie <sup>69</sup>. Cette étude comparait chez des patients présentant un CaP hormonorésistant en progression un bras docétaxel 75mg/m<sup>2</sup> (J1=J22) (Taxotère®, Sanofi-Aventis), un bras docétaxel hebdomadaire (30mg/m<sup>2</sup> 5 semaines sur 6) au schéma de référence de l'époque, à savoir la mitoxantrone à la dose de 12mg/m<sup>2</sup> en association à la prednisone. Les auteurs rapportent une amélioration de la médiane de survie globale qui passe de 16,5 mois dans le bras de référence à 18,9 mois le bras docétaxel 75mg/m<sup>2</sup> (p=0.009). Ces résultats ont été confirmés par une deuxième étude de phase III (SWOG99-16) qui comparait docétaxel/estramustine versus mitoxantrone <sup>70</sup>. Depuis lors le docétaxel à la dose de 75mg/m<sup>2</sup> est le traitement de référence du CPRCm.

### 1.7.3 Chimiothérapie de deuxième ligne :

Jusqu'en 2010 il n'y avait aucun traitement de référence en deuxième ligne après échappement au docétaxel. L'étude TROPIC a changé la donne avec l'arrivée d'une nouvelle molécule : le cabazitaxel (XRP-258, Jevtana®), qui comme son nom l'indique est un nouveau taxane qui interagit avec le fuseau mitotique en stabilisant la tubuline.

L'étude TROPIC est une étude de phase III randomisée qui compare le cabazitaxel à la dose de 25mg/m<sup>2</sup> associé à la prednisone avec un bras de référence associant mitoxantrone à la dose de 12mg/m<sup>2</sup> et prednisone chez des patients présentant un CaP hormonorésistant après échec du docétaxel <sup>71</sup>. Les auteurs rapportent une amélioration de la médiane de survie globale qui passe de 12,7 à 15,1 mois (HR = 0,70; IC 95% : (0,59 – 0,83), p < 0,0001) pour les patients du bras cabazitaxel. Suite aux résultats de cette étude le cabazitaxel devient un traitement standard de deuxième ligne thérapeutique des CaP métastatiques après échappement au docétaxel. De nombreuses études sont actuellement en cours afin d'évaluer le rôle du cabazitaxel en 1<sup>er</sup> ligne en comparaison avec le docétaxel (FIRSTANA-NCT01308567), d'évaluer la préférence des patients entre la cabazitaxel et le docétaxel

(CABADOC), mais également son rôle dans les CaP localisés de haut risque (PEACE2-NCT01952223).

## ***1.8 Nouvelles thérapeutiques : Immunothérapie, chimiothérapie, thérapies ciblées***

### **1.8.1 Sipuleucel T**

Le sipuleucel-T (PROVENGE, Dendreon Corporation) est une nouvelle immunothérapie cellulaire active autologue pour le traitement du CPRCm et asymptomatique. Les résultats de l'étude de phase III appelée IMPACT publiée en 2009 ont montré une amélioration significative de la survie globale passant de 21,7 mois de survie médiane dans le bras placebo à 25,8 mois dans le bras sipuleucel-T ( $p=0.01$ )<sup>72</sup>. Cette étude a conduit à l'obtention de l'AMM du SIPULEUCEL-T aux Etats-Unis. Toutefois, l'annonce par les autorités de sécurité sociale américaine (Medicare et Medicaid) en mars 2011 du remboursement du Sipuleucel-T a soulevé de vifs débats au sein de la communauté médicale. En effet, le gain médian obtenu dans les essais était de quatre mois. À titre de comparaison, le taxotère a obtenu dans les essais randomisés un gain médian de deux à trois mois. Aucune étude comparant les deux thérapeutiques n'est disponible. Cela pose la question de la pertinence de ces résultats. Une autre question soulevée par l'étude IMPACT est la place de ces nouvelles thérapeutiques par rapport aux traitements déjà existants. Pour preuve, des essais cliniques sont déjà en cours avec le Sipuleucel-T en néoadjuvant avant prostatectomie radicale. D'autres études sont en cours avec des molécules similaires mais la place de ces thérapeutiques reste encore à définir au sein de notre arsenal thérapeutique<sup>73</sup>.

### **1.8.2 Radiothérapie métabolique**

La radiothérapie métabolique a été très peu utilisée ces dernières années, en raison de la toxicité hématologique des deux molécules disponibles qu'étaient le strontium 89 et le samarium 153. Cependant cette option thérapeutique connaît un regain d'intérêt depuis l'arrivée récente du Radium 223.

En effet, le chlorure de radium 223 (Alpharadin<sup>®</sup>, Xofigo<sup>®</sup>) a démontré dans une population de patients métastatiques osseux symptomatiques et résistants à la castration un bénéfice en survie globale dans une étude de phase III randomisée (ALSYMPCA) versus placebo<sup>74</sup>. Le

chlorure de radium 223 est un mimétique du calcium qui a un tropisme osseux (matrice d'hydroxyapatite). Il s'agit d'un émetteur  $\alpha$ , qui délivre une forte énergie avec une pénétration dans les tissus  $<0,1\text{mm}$  et par conséquent, avec très peu d'effet de myélosuppression. De multiples études sont en cours évaluant le radium dans des combinaisons avec des hormonothérapies de nouvelle génération ou des chimiothérapies.

### ***1.9 Perspectives thérapeutiques :***

Malgré le succès clinique de l'ensemble de ces nouvelles thérapeutiques qui ont permis de prolonger de manière substantielle la survie globale des patients ( $\pm 30$ mois au stade de CPRCm), il est clair que des thérapeutiques supplémentaires sont nécessaires.

De nombreuses thérapies ciblées ont été évaluées ces dernières années, avec toutefois des résultats assez décevants pour la plupart d'entre elles. Ainsi, de nombreux essais de phase III évaluant diverses molécules telles l'atrasentan, l'oblimersen, ou encore plus récemment le bevacizumab ou l'aflibercept n'ont pas atteint leur objectif principal, à savoir l'amélioration de la survie globale.

Une possibilité envisagée est l'utilisation plus précoce des thérapeutiques afin que l'efficacité puisse être considérablement augmentée. Plusieurs essais cliniques portant sur cette question sont en cours évaluant les hormonothérapies de nouvelle génération au stade de CPRC non métastatique, au stade de CaP hormonosensible ou encore au stade localisé (NCT02003924, NCT02200614, NCT01946204, NCT02058706). Des études de combinaisons thérapeutiques sont également en cours afin d'augmenter l'efficacité du traitement. De plus de nombreuses études évaluant la séquence thérapeutique optimale sont en cours, mais le bénéfice de toutes ces stratégies thérapeutiques sera probablement assez modeste.

Enfin, de nouvelles molécules ciblant le RA de manière directe ou indirecte en bloquant les enzymes de la voie de biosynthèse des androgènes sont en cours de développement afin de contourner les mécanismes de résistance aux hormonothérapies de 1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> génération<sup>75</sup>. Certaines de ces molécules ont la capacité de se fixer sur le RA en amont du LBD, soit au niveau de l'exon 4 (VT-464) soit au niveau du domaine N-terminal (EPI-001), ou ont la capacité de le dégrader (AZD3514, EZN-4176). Enfin, les données récentes issues des études génomiques permettent d'espérer identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le développement des thérapeutiques du futur.



## **2 Partie 1 : Mutations du récepteur des androgènes dans les cancers de la prostate**

## **2.1 Introduction**

### **2.1.1 Ligand du récepteur des androgènes**

Les androgènes sont incontournables pour la régulation de la plupart des aspects du développement masculin. Leur biosynthèse comme celle de toutes les autres hormones stéroïdiennes est réalisée à partir d'un seul et unique précurseur : le cholestérol. Les androgènes ont une double origine : environ 95% sont produits, sous l'influence de l'axe hypothalamo-hypophysaire, par les cellules de Leydig au niveau des testicules, sous forme de testostérone. Les 5% d'androgènes restants sont sécrétés par la glande surrénale sous forme de précurseurs, à savoir essentiellement la DHEA et l'androstènedione, qui sont ensuite convertis en testostérone au niveau des tissus cibles.

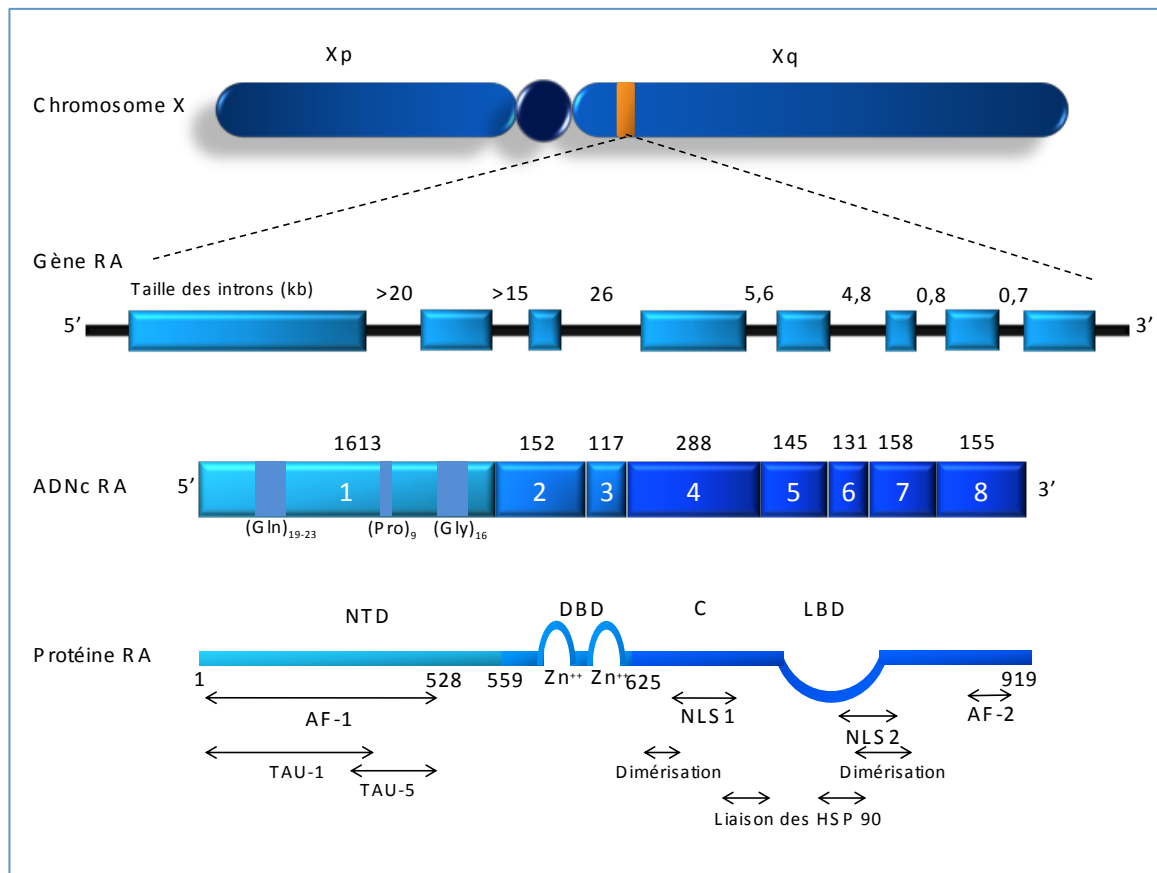
La testostérone est la forme circulante majoritaire des androgènes et existe soit sous forme liée à l'albumine (54%) avec une faible affinité, soit liée à un transporteur, la SHGB (sexual hormone binding globulin) (44%), soit encore sous forme libre (1-2%).

Au sein des tissus cibles, la testostérone est convertie par la 5 $\alpha$  réductase en un androgène plus efficace pour promouvoir la prolifération des cellules prostatiques : la dihydrotestostérone (DHT). Au niveau des cellules cibles, la DHT se lie au récepteur des androgènes (RA) maintenu sous forme inactive dans le cytoplasme par un jeu de protéines chaperonnes. Le RA joue un rôle majeur dans l'homéostasie de la prostate normale et cancéreuse en régulant tous ces événements de façon tissu-spécifique par l'activation ou l'inhibition de l'expression de gènes définis ou de réseaux de gènes.

### **2.1.2 Structure du récepteur des androgènes**

Le RA est un facteur transcriptionnel ligand-dépendant appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires (Figure 7). Son gène est localisé sur le chromosome X en position q11-q12, et s'étend sur environ 90kb. Le cadre ouvert de lecture comprend 8 exons étendus sur 2,7kb, et conduit à une protéine composée de 919 acides aminés pour un poids moléculaire de 110kDa.

Le RA est exprimé dans la plupart des tissus. Toutefois son degré d'expression est très variable selon les tissus, et pour un tissu donné selon son stade de développement, et selon le degré de différenciation cellulaire.



**Figure 7** : Structure du récepteur des androgènes (NM\_000044). d'après Gelmann et al <sup>76</sup>

Le RA est constitué de 4 domaines fonctionnels majeurs, communs à tous les récepteurs nucléaires :

- *le domaine amino-terminal (NTD) support de la fonction d'activation de la transcription AF-1 (Activation Function 1)*

Ce domaine est caractérisé par un certain nombre de répétitions comme les séquences poly-glutamine (Q), poly-glycine (G) et poly-proline (P). Les séquences poly-Q et poly-G sont polymorphiques et les courtes séquences de poly-Q seraient associées à un risque augmenté de CaP. Une diminution du nombre de résidus Q (<18-23) ou G (<16) est en effet associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle du RA.

Deux autres parties du domaine N-terminal sont importantes. En effet, les 30 premiers acides aminés sont impliqués dans l'interaction d'AF-1 avec la partie C-terminale du RA. Cette

interaction entre les deux extrémités du RA est induite par la liaison du ligand et a pour conséquence la stabilisation du récepteur. La section d'acides aminés 142-485 est quant à elle le support de la fonction d'activation de la transcription (AF-1).

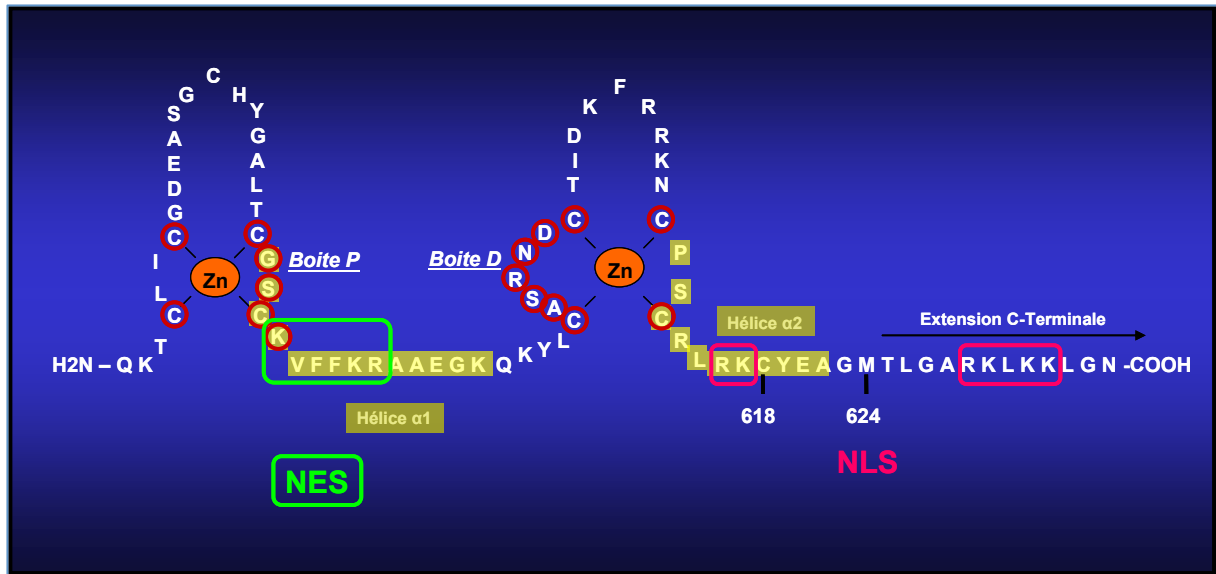
Le NTD est également le siège de nombreuses interactions avec des co-activateurs comme BRCA1, SRC-1, CBP (CREB-binding protein), et des facteurs généraux de transcription comme TFIID, TFIIF. Enfin ce domaine comporte de nombreux sites de phosphorylation du RA, à savoir les sérines 16, 81, 94, 256, 308 et 424, la sérine 94 semblant être constitutivement phosphorylée.

- ***le domaine central contenant le site de liaison à l'ADN (DBD) et la région charnière (C)***

Au niveau du noyau, le RA se lie à l'ADN double brin sous forme de dimères au niveau de séquences appelées éléments de réponse aux androgènes (ARE) situés au niveau du promoteur des gènes cibles du RA.

La liaison à l'ADN s'effectue grâce au domaine DBD qui est une région très conservée au sein de la grande famille des récepteurs nucléaires. Le DBD, codé par les exons 2 et 3, se structure en 2 doigts de zinc suivis d'une extension C-terminale (Figure 8). Une courte séquence d'acides aminés (boîte P) au niveau du premier doigt de zinc tout comme, dans une moindre mesure, l'extension C-terminale sont impliquées dans la reconnaissance spécifique des ARE. Les acides aminés conservés au sein du deuxième doigt de zinc (boîte D) interviennent quant à eux dans le processus de dimérisation. Une séquence de 15 acides aminés, situés entre les 2 doigts de zinc, constitue le signal d'export nucléaire<sup>77</sup>.

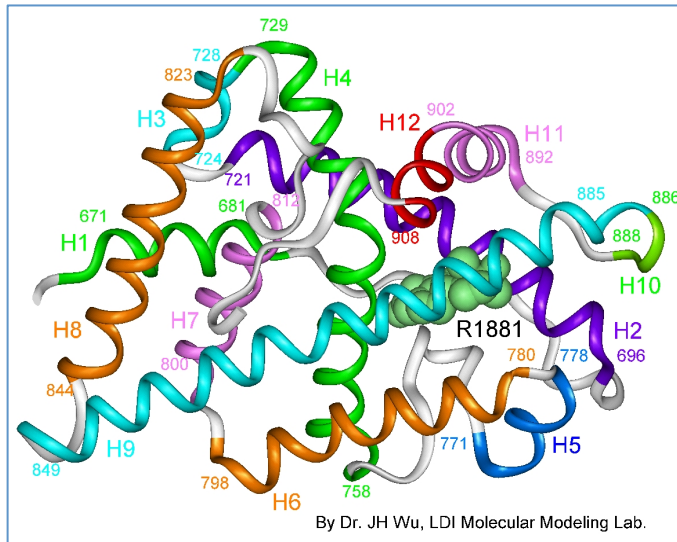
L'extension C-terminale jouxte le domaine charnière situé entre le DBD et le domaine de liaison au ligand (LBD). Ce domaine charnière abrite un signal de localisation nucléaire bipartite (NL-1) permettant la translocation nucléaire du RA par son interaction avec les importines.



**Figure 8** : Structure du domaine de liaison à l'ADN (DBD) (NM\_000044)

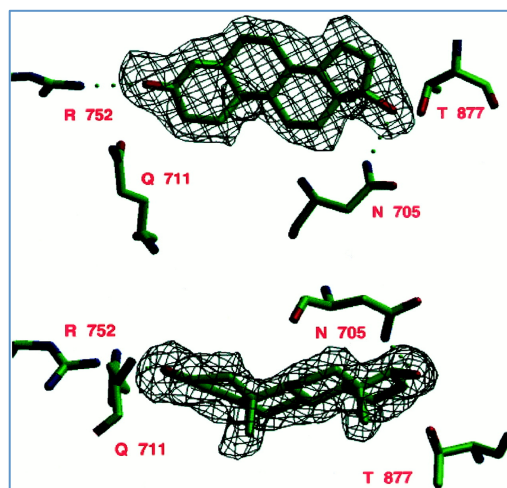
- *le domaine C-terminal avec les domaines de liaison du ligand (LBD) et d'activation transcriptionnelle (AF-2)*

La région C-terminale est un domaine multifonctionnel qui comprend le site de la liaison du ligand (LBD), le site d'homodimérisation, le site d'interaction avec les protéines de choc thermique, avec différents cofacteurs, mais aussi comme nous l'avons vu avec le site d'interactions avec le domaine AF-1 du RA. Le LBD du RA est constitué d'environ 250 acides aminés principalement hydrophobes formant 11 hélices  $\alpha$  (alors que les autres récepteurs nucléaires en comportent 12 ; le RA ne contient pas l'hélice 2), et quatre courts feuilletts  $\beta$ , formant un « sandwich » autour de la poche de liaison du ligand.



**Figure 9** : Structure 3D de la poche de liaison du ligand du récepteur des androgènes (d'après Gao et al<sup>78</sup>)

Les ligands de forte affinité comme la DHT, la testostérone et l'androgène synthétique R1881 sont en contact direct avec des acides aminés des hélices 3, 4, 5, 7 et 11, et d'un des feuilletts  $\beta$  (Figure 9). Cette poche du ligand est composée de dix-neuf acides aminés hydrophobes parmi lesquels les résidus Asn705, Gln 711, Arg752, Gln788 et Thr877, qui sont directement impliqués dans l'interaction avec le ligand (Figure 10)<sup>79</sup>.



**Figure 10a** : Représentation des interactions entre les acides aminés de la poche de liaison et le ligand (NM\_000044) (d'après Sack et al,<sup>79</sup>)

Le domaine d'activation de la transcription ligand-dépendant (AF-2) fait partie de LBD. La liaison du ligand avec le RA entraîne des changements conformationnels importants au niveau du LBD, notamment le repositionnement de l'hélice 12 sur la poche de liaison du ligand. Ce repositionnement est requis pour l'activité transcriptionnelle du RA, car il crée une nouvelle surface d'interaction avec des co-activateurs.

AF-2 ne forme pas une entité à part entière au sein du LBD, mais serait plutôt une surface d'interaction protéine-protéine constituée de l'hélice 12 repositionnée et d'autres parties du LBD.

### **2.1.3 Activité et fonction du récepteur des androgènes**

#### **2.1.3.1 Action Génomique**

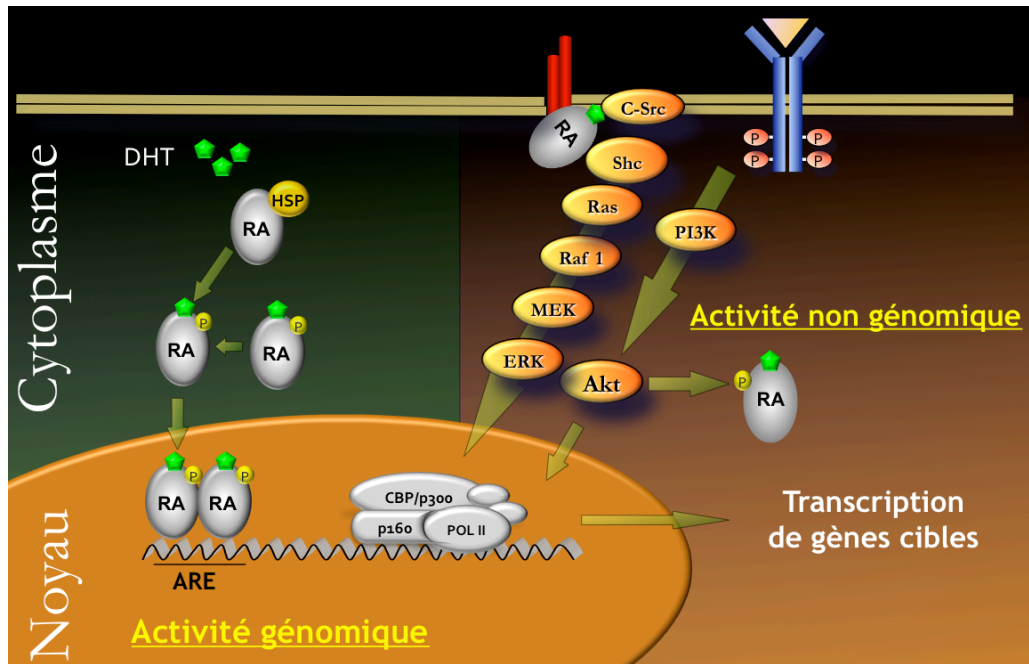
En l'absence de ligand, le RA, sous sa forme inactive, est dans le cytoplasme lié à des protéines chaperonnes telles que HSP90, HSP70 et FKDP52, elles-mêmes liées au réseau microtubulaire. La liaison du ligand naturel, la DHT, au RA entraîne un changement conformationnel, suivi de la libération des protéines chaperonnes qui démasquent les sites de dimérisation et le signal de localisation nucléaire. S'en suit l'homodimérisation du récepteur, sa phosphorylation au niveau des sites précédemment décrits, sa translocation dans le noyau, et sa fixation à l'ADN au niveau des éléments de réponse aux androgènes (ARE) des régions promotrices des gènes cibles.

La liaison à l'ADN a pour conséquence la transcription de ces gènes cibles, suite au recrutement de co-régulateurs (co-activateurs et co-répresseurs).

#### **2.1.3.2 Action non génomique**

Par ailleurs il existe une voie alterne d'activation de la signalisation qui ne requiert ni le transport nucléaire du RA, ni sa fixation à l'ADN. Cette action non génomique du RA conduit à l'activation d'autres facteurs de transcription par le biais d'interactions protéine-protéine. Le RA est ainsi capable de stimuler la voie des MAPK via la tyrosine kinase c-Src, la voie d'AP-1 ainsi que la voie NFκB.

De nombreux gènes sont régulés par le RA et codent pour des protéines impliquées dans les voies de sécrétion, de synthèse des polyamines, dans la lipogenèse et la synthèse du liquide séminal. Certains de ces gènes régulés par le RA ont été caractérisés et développés comme cibles thérapeutiques ou comme marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques (PSA).



**Figure 10b** : Mécanismes d'action du récepteur des androgènes : activité génomique et activité non génomique

#### 2.1.4 Les mécanismes de résistance à la privation androgénique : l'échappement hormonal

La résistance à la castration correspond à une reprise évolutive du CaP en l'absence d'androgènes, témoin de l'émergence d'un ou plusieurs clones cellulaires capables de proliférer en présence de taux effondrés de testostérone et de DHT. Ce processus suggère que les cellules prostatiques utilisent des voies alternatives à la signalisation RA-dépendante.

La transition vers l'échappement des CaP à l'hormonothérapie est un processus complexe impliquant à la fois la sélection et l'expansion de clones cellulaires résistants préexistants (sélection clonale), et l'adaptation du niveau d'expression de certains gènes (Bcl2, Bcl-x1...) autorisant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses dans un environnement appauvri en androgènes.

Les mécanismes possibles d'échappement à la privation androgénique sont nombreux et se subdivisent classiquement en mécanismes dits ligand-dépendants et ligand-indépendants.



#### 2.1.4.1 Activation du RA ligand-dépendante

##### 2.1.4.1.1 *Synthèse paracrine/autocrine d'androgènes*

Il est clairement établi que l'un des mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses prostatiques peuvent contourner la privation androgénique est l'augmentation de la conversion de la testostérone circulante en DHT au sein du stroma tumoral (boucle paracrine)<sup>80</sup>. Par ailleurs, les CaP métastatiques sont également capables de maintenir, malgré une castration optimale, des taux d'androgènes intratumoraux (boucle autocrine) en synthétisant eux-mêmes des androgènes. Ce maintien de taux d'androgènes intratumoraux peut résulter d'une hyper-expression ou mutation activatrice du gène de la 5 $\alpha$ -réductase permettant la conversion de l'androstènedione en 5 $\alpha$ -androstènedione puis en DHT<sup>81</sup>. Ce mécanisme permet le maintien d'un taux élevé d'androgènes au niveau des tissus tumoraux malgré un effondrement des taux sanguins circulant de DHT après castration<sup>82</sup>.

Ces mécanismes de résistance passent par une modification fonctionnelle de la machinerie enzymatique impliquée dans la stéroïdogénèse. Cette machinerie complète inclut des enzymes comme la 3 $\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (HSD3 $\beta$ 1), 17 $\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénase de type 3 (HSD17 $\beta$ 3) et de type 6, ou encore CYP17 $\alpha$ 1 qui assure la synthèse de 17-OH progestérone et 17-OH pregnénolone à partir de la progestérone et de la pregnénolone. Cette dernière enzyme impliquée dans la voie de la stéroïdogénèse a conduit au développement d'inhibiteurs de CYP17 dont l'acétate d'abiratérone (AA) ou l'orteronel (ODM201). L'AA inhibe l'activité 17 $\alpha$ -hydroxylase et 17,20 lyase de l'enzyme alors que l'orteronel inhibe préférentiellement l'activité 17,20-lyase. Cependant des mécanismes de résistance à ces nouvelles hormonothérapies ont d'ores et déjà été décrits notamment par amplification du gène CYP17 $\alpha$ <sup>83</sup>.

##### 2.1.4.1.2 *Acquisition d'une hypersensibilité aux androgènes :*

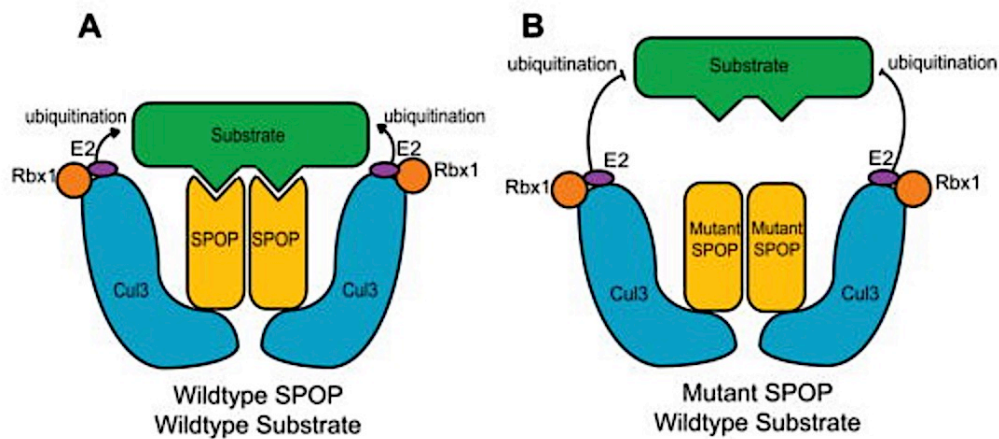
- **Par amplification ou absence de dégradation du RA**

L'amplification du gène du RA a été mise en évidence dans 25-30% des CaP au stade de résistance à la castration<sup>84</sup>. Cette amplification du RA se traduit par une surexpression du RA, qui devient dès lors sensible aux faibles taux d'androgènes résultant de la privation androgénique.

L'augmentation de l'expression du RA, en l'absence d'amplification du gène, peut être observée suite à la stabilisation de son ARNm, de la protéine ou encore suite à une

augmentation de la transcription du gène. Enfin, l'augmentation de l'expression du RA peut également résulter d'une absence de sa dégradation suite à la mutation du gène *SPOP* (Speckle-Type POZ Protein) qui code pour une ubiquitine ligase dépendante de la Culline 3. *SPOP* agit tel un suppresseur de tumeur en favorisant l'ubiquitination puis la dégradation via le protéasome de nombreuses protéines parmi lesquelles SRC-3, co-activateur du RA, ainsi que directement le RA en se fixant au niveau d'un motif de fixation de type XXLLLDDFF au niveau de sa région charnière<sup>85</sup> (Figure 11).

Les variants mutés de *SPOP*, identifiés dans 15% des CaP, ne peuvent ni interagir avec, ni dégrader SRC-3 ou le RA. Ce défaut de dégradation du RA conduit ainsi à son accumulation et une activation de la voie de signalisation d'aval. Par ailleurs *SPOP* ne peut se fixer sur les variants tronqués du RA du fait de l'absence du motif de fixation XXLLLDDFF<sup>86</sup>.



**Figure 11** : Mécanisme proposé du rôle de la protéine *SPOP* mutée (F133V) dans le CaP

(A) La protéine *SPOP* sauvage se lie à ses substrats, qui sont ensuite ubiquitinés par la *SPOP*-Cullin 3-RING box 1 ubiquitine ligase et une enzyme de conjugaison E2, ce qui va conduire à la dégradation du substrat. (B) La mutation de *SPOP* empêche toute interaction avec le substrat permettant à ce dernier d'échapper à la dégradation par le protéasome. D'après Mani et al.<sup>86</sup>

- **Par d'autres mécanismes comprenant :**

- La *synergie* avec des voies de signalisation dépendantes de facteurs de croissance (IGF-1, KGF, EGF, LHRH, neuropeptides, IL-6) est susceptible d'aboutir à la *sensibilisation* de la réponse aux androgènes par d'éventuelles phosphorylations activatrices du RA ou de ses co-activateurs<sup>87</sup>.

- La modification du jeu des co-activateurs et des co-répresseurs et en particulier l'amplification d'un co-activateur (p.ex. TIF2, SRC1, SRC3) qui facilite la transactivation du RA en augmentant la réponse à des concentrations résiduelles d'androgènes surrénaliens<sup>88</sup>.

- Des mutations du récepteur abaissant le seuil de sensibilité aux androgènes testiculaires et/ou précurseurs androgéniques surrenaliens tels que l'androstènedione et/ou DHEA<sup>89</sup>.

#### 2.1.4.1.3 *Mutations du récepteur des androgènes et conséquences fonctionnelles*

Le RA est particulièrement susceptible aux mutations, ce qui le distingue d'autres récepteurs, notamment les récepteurs oestrogéniques. De plus, en raison du caractère monosomique du RA, les mutations ont un fort potentiel d'altérations fonctionnelles.

Il est communément admis sur base notamment des données récentes issues des programmes de séquençage à haut-débit que les CaP localisés ne présentent pas ou peu de mutations du RA. Cependant certaines données plus anciennes semblent démontrer le contraire. Sanchez *et al.* ont ainsi identifié des mutations du RA dans 16% des CaP localisés et hormonaïfés, lorsque d'autres études rapportent des fréquences allant de 10 à 44%<sup>90,91,92</sup>. La fréquence de la survenue de mutations touchant le RA dans les formes localisées du CaP reste donc source de débat. L'hypothèse avancée pour expliquer ces résultats discordants repose sur l'utilisation des techniques de PCR jadis et remplacées actuellement par les techniques de séquençage de haut-débit supposées être plus sensibles et spécifiques.

Les données sont bien plus concordantes pour dire que l'émergence de récepteurs mutants est un phénomène fréquent au cours de la progression des CaP sous hormonothérapie et un phénomène récurrent dans les CPRCm.

Différents modèles expérimentaux permettent de penser que leur émergence est induite par la privation androgénique ainsi que les manipulations hormonales. Cette émergence résulte de la sélection de clones mutés trouvant dans leur environnement un ligand endogène ou exogène, présent à des taux suffisants pour soutenir leur survie et leur prolifération. La question pertinente de savoir si ces clones mutés existent très précocement dans la tumeur primitive ou s'ils apparaissent au cours de la progression et de la dissémination tumorale reste débattue. Toujours est-il que les observations cliniques et les modèles expérimentaux permettent de penser que quelques mois suffisent à l'émergence et à l'expansion de clones mutés sous la pression de sélection exercée par le milieu environnant.<sup>93</sup>

- *Conséquences fonctionnelles des mutations*

Des mutations faux-sens dans le domaine amino-terminal modulent fréquemment la capacité de transactivation des récepteurs mutés en altérant ses interactions avec des protéines co-régulatrices. Cependant les données récentes issues du séquençage à haut débit révèlent que

ces mutations du domaine amino-terminal semblent rares<sup>94</sup>. De même très peu de mutations du DBD ont été décrites à ce jour et leurs conséquences fonctionnelles restent peu étudiées. Ces mutations, de par leur localisation dans la séquence d'ADN, sont capables d'affecter la transactivation du RA et les capacités de transrépression en interférant avec l'exportation du RA nucléaire, la reconnaissance et la liaison à l'ADN ainsi que le recrutement des co-régulateurs.

La région charnière et le LBD représentent un hot spot mutationnel avec près de 45% des mutations décrites. Ces mutations ont pour caractéristiques majeures d'élargir la spécificité du récepteur aux autres stéroïdes. Ces mutations affectent à la fois l'affinité du récepteur pour son ligand et le recrutement des co-régulateurs.<sup>95</sup>

La majorité des mutations ponctuelles identifiées dans le LBD sont localisées dans 4 régions discrètes :

- Une séquence localisée à la liaison entre la région charnière et le LBD (acides aminés 670-678)
- Une région participant à la poche de liaison aux ligands et à la séquence signature directement impliquée dans le recrutement des co-régulateurs (acides aminés 701-730)
- Une séquence au sein de l'hélice 5 (acides aminés 741-763), qui participe à la constitution de la poche de liaison au ligand
- Une région qui couvre l'hélice 11, une partie de la poche de liaison aux ligands incluant la plus grande partie du domaine AF-2 et l'hélice 12 (acides aminés 872-910)

Parmi l'ensemble des mutations, quatre semblent représenter à elles seules près de 15% à 20% des mutations du RA dans les CPCR : les mutations L702H, W742C, H875Y et T878A<sup>96</sup> (nouvelle nomenclature NM\_000044.3). La mutation T878A retrouvée chez 40% des patients traités par BAC, utilisant le flutamide comme anti-androgène. Cette mutation ainsi que la mutation H875Y modifie la spécificité du RA le rendant sensible à des antiandrogènes et à certains stéroïdes tels que la progestérone. L'antagoniste devient donc agoniste en présence de l'une ou l'autre des mutations ce qui entraîne en présence de l'antiandrogène une activation du RA. Des données récentes rapportent l'implication de la mutation T878A dans la résistance à l'acétate d'abiratérone (AA) via la modification de la voie de biosynthèse des androgènes en présence d'AA en faveur de la synthèse de progestérone. L'impact clinique de cette mutation est la survenue du syndrome de retrait à l'arrêt des antiandrogènes ou de l'AA comme décrit précédemment.

La mutation W742C modifie également la spécificité du RA transformant l'antagoniste bicalutamide en agoniste du RA induisant une augmentation de son activité transcriptionnelle. De manière très récente, Balbas et al ont isolé la mutation F877L au niveau du LBD qui confère au RA une résistance in vitro et in vivo à l'enzalutamide ainsi qu'à l'ARN-509, tous deux de puissants antiandrogènes. La mutation F877L a été trouvée exclusivement chez des patients prétraités par enzalutamide ou ARN509 mais avec une fréquence très faible<sup>97-99</sup>.

Les mutations T878A, H875Y et W742C semblent quant à elles bien plus fréquentes malgré une moindre utilisation du flutamide.

L'explication la plus plausible est sans doute le fait que ces 3 mutations ainsi que la mutation L702H permettent une activation du RA par des ligands stéroïdiens d'origine surrénaliens, mais également l'oestrogène, la progestérone ou encore les glucocorticoïdes pour la mutation L702H.

- **Formes tronquées du RA : de la mutation au variant d'épissage**

Les formes tronquées du RA se caractérisent au niveau structural par l'absence de la région carboxy-terminale, région déterminante pour le contrôle des activités transcriptionnelles du RA. En effet, cette région englobe à la fois le domaine de liaison du ligand, la seconde fonction de transactivation AF-2 et plusieurs sites de phosphorylation. De plus, c'est une région majeure d'interaction protéine-protéine, responsable du recrutement ligand-dépendant de co-activateurs du récepteur. Il n'est donc pas étonnant que les propriétés fonctionnelles de ces formes tronquées du RA soient différentes de celles du récepteur sauvage.

Ces variants tronqués peuvent résulter de deux mécanismes différents :

1. L'épissage alternatif de l'ARNm du RA est un mécanisme qui conduit à des RA tronqués<sup>100</sup>.
2. Notre laboratoire a quant à lui décrit des mutations non-sens localisées au niveau de la région charnière et de la partie proximale du LBD qui induisent des codons stop prématurés<sup>101,102</sup>.

- **Variants d'épissage**<sup>103</sup>

Ces cinq dernières années de nombreux variants tronqués, en particulier ceux issus d'un épissage alternatif, ont été identifiés dans plusieurs lignées cellulaires de CaP, des modèles de xénogreffes ainsi que dans des échantillons de patients avec un CaP<sup>100,104</sup> (Figure 12). Parmi les variants d'épissage, l'AR-V7 et l'AR-V567es, ont été particulièrement étudiés en partie en raison de la disponibilité d'anticorps spécifiques qui ont permis l'étude de leur expression par immunohistochimie dans les échantillons tumoraux provenant de patients. Du fait de leurs

propriétés structurales communes, on pourrait imaginer que les 17 variants décrits partagent les mêmes propriétés fonctionnelles, à savoir une activité constitutive androgénoindépendante. Cependant seuls certains de ces variants présentent cette caractéristique. La présence d'un signal de localisation nucléaire est en effet nécessaire. Le NLS bipartite du RA situé au niveau de l'exon 3 et 4 peut être conservé comme c'est le cas pour l'ARV567es, ou un NLS peut être apporté par la séquence intronique retenue.

AR variants	Alternative names	Transcripts	Tissue expression	Cell line expression
AR23		1 2 3 4 5 6 7 8	CRPC	NA
ARQ640X		1 2 3 4	CRPC	NA
AR-V1	AR4	1 2 3 CE1	Benign, hormone-naive, CRPC	CWR-R1, 22Rv1, VCaP
AR-V2		1 2 3 3 CE1	NA	22Rv1
AR-V3	AR1/2/2b, AR6	1 2 CE4 3 CE1	NA	22Rv1
AR-V4	AR1/2/3/2b, AR5	1 2 3 CE4 3 CE1	NA	CWR-R1, 22Rv1
AR-V5		1 2 3 CE2	CRPC	22Rv1
AR-V6		1 2 3 CE2	CRPC	22Rv1
AR-V7	AR3	1 2 3 CE3	Benign, hormone-naive, CRPC	LNCaP, C-81, C4-2, C4-2B, LNCaP95, VCaP, CWR-R1, 22Rv1
AR-V8		1 2 3 I3	NA	VCaP
AR-V9		1 2 3 CE5	CRPC	VCaP, 22Rv1
AR-V10		1 2 3 I3	NA	VCaP
AR-V11		1 2 3 I3	NA	VCaP
AR-V12	ARV567es	1 2 3 4 8	Benign, hormone-naive, CRPC	LuCaP86.2, LuCaP136, 22Rv1, VCaP
AR-V13		1 2 3 4 5 6 9	CRPC	22Rv1
AR-V14		1 2 3 4 5 6 7 9	CRPC	22Rv1
AR-V15		1 2 3 4 5 6 9	NA	VCaP
AR-V16		1 2 3 4 5 6 7 8 9	NA	VCaP
AR-V18		1 2 3 4 5 6 9	NA	VCaP
AR8		1 I2 3 CE3	Benign, malignant	CWR-R1, C4-2, C4-2B, CWR22

**Figure 12** : Représentation des récepteurs des androgènes tronqués issus d'une mutation non-sens ou d'un épissage alternatif. D'après Lu et al <sup>103</sup>

L'AR-V7 constitue une exception, car il présente une localisation nucléaire et une activité constitutive ligand indépendante et ce en l'absence de signal de translocation nucléaire.

Plusieurs données concordantes montrent une augmentation de l'expression des variants tronqués au cours du temps et sous déprivation androgénique. Des taux très faibles ont ainsi été détectés dans les tissus prostatiques non cancéreux ainsi que dans les formes localisées de CaP hormonaïf alors que le taux est bien plus élevé au stade de CPRCm. Le rapport entre les variants courts du RA et les RA sauvages évolue au cours du temps.

De part sa structure, on s'est intéressé au rôle de l'AR-V7 dans les mécanismes de résistance à l'enzalutamide et à l'abiratérone dans plusieurs études cliniques. Antonarakis *et al* ont rapporté récemment que l'expression d'AR-V7 détectée au niveau de cellules tumorales circulantes sur de faibles cohortes de patients serait associée à une résistance primaire à l'enzalutamide et à l'abiratérone <sup>105</sup>. Il sera nécessaire de valider ces observations sur des cohortes plus importantes afin de valider l'AR-V7 comme un facteur prédictif de non réponse aux hormonothérapies de nouvelle génération.

#### - *Mutations non-sens*

La première mutation non sens située au niveau de l'exon 4 a été décrite en 2004 au sein d'un prélèvement de cancer de la prostate localisé. Depuis de nombreuses études fonctionnelles ont été entreprises pour caractériser les nouvelles propriétés acquises par ces variants. Le modèle étudié a été le RA Q640X qui a montré une activité constitutive. La fréquence de survenue de ces mutations à différents stades des CaP sera développée au cours de la première partie de ce travail.

### 2.1.4.2 **Activation du RA par des mécanismes indépendants du ligand**

Le RA peut être stimulé indépendamment de la fixation du ligand par un jeu de phosphorylations induites par des voies d'activation alternatives. Ce processus s'accomplit par l'intermédiaire de récepteurs à activité tyrosine kinase dont l'activation initie une cascade complexe de signalisation intracellulaire et conduit à l'activation du RA ainsi que de différentes protéines ayant des rôles importants dans la survie cellulaire.

Les mécanismes d'activation du RA comprennent ainsi :

#### 2.1.4.2.1 « *Bypass* » par le récepteur aux glucocorticoïdes<sup>106</sup>

Des travaux récents révèlent l'existence de mécanismes de résistance analogues à ceux qui sont décrits dans les thérapies ciblant les tyrosines kinases. L'activation de voies de

signalisation en aval de la cible bloquée, en l'occurrence le RA, est ainsi rétablie par l'activation d'autres récepteurs nucléaires comme le récepteur aux glucocorticoïdes (RG).

Il a été montré que la résistance à l'enzalutamide peut passer par l'activation du RG. L'analyse de biopsies de patients traités par enzalutamide soutient le rôle de l'induction des RG dans la survenue de la résistance à l'enzalutamide. Ce « bypass » par les RG semble se produire dès les premiers stades du CaP. Des données récentes suggèrent que les cellules tumorales de CaP avec une résistance précoce à la castration et l'abiratérone expriment des taux élevés de RG.

A première vue, l'hypothèse selon laquelle le RG peut conférer une résistance peut sembler discordante avec les observations cliniques de réponse thérapeutiques aux corticoïdes. Ce paradoxe apparent peut être expliqué par le fait que les glucocorticoïdes inhibent la production hypophysaire d'ACTH, induisant ainsi une réduction indirecte du taux d'androgènes circulants induisant des baisses de PSA comme observé dans les bras standard de nombreuses études de phase III randomisées récemment publiées. Cependant, en cas d'hyperexpression des RG, l'avantage lié à la baisse du taux d'androgène est probablement contrecarré par l'activation des GR au sein des cellules tumorales. A la vue de ce constat, une stratégie de combinaison thérapeutique visant à inhiber le RA et le RG pourrait être envisagée.

D'autres récepteurs nucléaires, comme celui de la progestérone ou des minéralocorticoïdes sont structurellement apparentés au RA. De par cette analogie, ces récepteurs sont également susceptibles de pouvoir réguler l'expression de gènes cibles du RA et constituer d'autres voies permettant de contourner celle du RA.

#### 2.1.4.2.2 *Une hyperexpression des récepteurs membranaires : EGFR, HER2, HER3*

L'oncogène HER2 est surexprimé dans 25% des cancers de la prostate avant traitement hormonal et 75% des CPRCm<sup>107</sup>. Ainsi la surexpression de HER2 tout comme celle de HER3 ou de l'EGFR pourrait selon certaines données de la littérature conduire à l'expression de gènes androgéno-dépendants en l'absence de ligands par phosphorylation puis activation du RA<sup>108</sup>.



### 2.1.4.2.3 *Activation des voies mitogéniques et anti-apoptotiques indépendantes du RA*

Les cellules androgéno-indépendantes présentent de nombreuses anomalies génétiques ou épigénétiques susceptibles de favoriser la prolifération et la survie cellulaire au nombre desquelles :

- ***la surexpression de l'EGFR, TGF-alpha, EGF***<sup>109</sup>

L'expression d'EGFR (HER1) et de ses ligands EGF, TGF $\alpha$ , HB-EGF et amphiréguline est corrélée au grade et au stade tumoral des CaP. Leur surexpression entraîne la stimulation de différentes voies de signalisation comme MAPK, PI3K-Akt, NF $\kappa$ B et la phospholipase C $\gamma$  et par là un accroissement de la prolifération, de la survie, de la mobilité et de l'invasion cellulaire.

- ***inhibition de l'apoptose par surexpression de Bcl2***

Plusieurs travaux suggèrent la surexpression des gènes codant pour des protéines antiapoptotiques entraînant la prolifération ou l'inhibition de l'apoptose des cellules cancéreuses<sup>110</sup>.

- ***la surexpression de la cycline D1***

L'expression des protéines impliquées dans le cycle cellulaire (p53, pRb/p130, cycline D1, p16, p21, p107, MDM2) est plus rarement modifiée au cours des phases précoces de l'adénocarcinome prostatique. Elle est possible dans les phases tardives de la maladie, alors associée au grade et au stade ainsi qu'à un mauvais pronostic<sup>111</sup>.

### ***Objectif général du travail de thèse :***

La voie de signalisation du récepteur des androgènes (RA) est une cible thérapeutique privilégiée dans les cancers de la prostate (CaP). Ce travail de thèse va aborder trois thématiques : 1) La première thématique porte sur l'identification d'altération du récepteur des androgènes susceptibles d'être impliquées dans la survenue des mécanismes de résistance à l'hormonothérapie de 1<sup>e</sup> ainsi qu'eu de 2<sup>e</sup> génération. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un PHRC (Programme hospitalier de recherche clinique) et a fait appel à une approche originale basé sur un test fonctionnel chez la levure. Au cours de la 2e partie de ce travail,

nous nous sommes intéressés à l'existence d'un lien potentiel entre les RA tronqués, résultant de mutations non-sens, et l'angiogenèse tumorale. L'objectif étant d'identifier une nouvelle cible thérapeutique pour cette population résistante aux approches d'hormonothérapie. Enfin dans la 3e partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la question de l'hétérogénéité tumorale dans le cancer de la prostate qui constitue actuellement un obstacle majeur pour le développement de nouvelles thérapeutiques.

L'ensemble du travail s'inscrit dans une démarche d'identification de différents mécanismes de résistance aux thérapeutiques et recherche de nouvelles cibles potentielles pour le développement des thérapeutiques de demain.

## 2.2 *Article : Mutations du Récepteurs des androgènes et mécanismes de résistance*

Comme cela a été décrit plus haut, l'hormonothérapie, malgré les récentes avancées thérapeutiques, demeure le traitement de référence des CaP avancés. En effet, depuis les travaux de Huggins et Hodges en 1941, la voie de signalisation des androgènes reste une cible privilégiée pour le développement de nouvelles thérapeutiques, comme en témoigne l'arrivée récente de l'enzalutamide, l'ARN509 ou encore des molécules ciblant la voie de biosynthèse des androgènes comme l'abiratérone.

Pendant de longues années il a été communément admis que l'hormonorésistance était synonyme d'hormono-indépendance. Or cette idée préconçue a été mise à mal par l'observation historique de 20-30% de réponses thérapeutiques avec des manipulations hormonales de deuxième ligne et plus récemment par l'amélioration de la survie globale des CaP métastatiques par les hormonothérapies de seconde génération. Ces résultats témoignent de la persistance de l'activité de la voie de signalisation des androgènes après échappement hormonal, renommé résistance à la castration.

Bon nombre de mécanismes d'échappement à la castration tels que l'amplification du gène codant pour le RA, la modulation de l'expression de co-régulateurs, l'augmentation de sensibilité du RA par certaines phosphorylations, ou encore la modification du spectre de sensibilité du RA par des mutations ont été décrits et de nouveaux mécanismes de résistance primaire ou secondaire aux hormonothérapies de nouvelle génération ont d'ores et déjà émergé et donnent lieu à d'innombrables études translationnelles.

Une meilleure compréhension de ces mécanismes d'échappement androgénique est donc primordiale pour identifier des biomarqueurs de résistance primaire aux molécules d'hormonothérapies qui permettrait d'éviter d'exposer les patients à de potentielles toxicités inutiles. Par ailleurs la connaissance de ces mécanismes de résistance permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour développer de nouvelles molécules ou stratégies thérapeutiques visant à contourner ces mécanismes de résistance. De nombreux efforts ont été réalisés dans ce domaine en particulier ces trois dernières années. Des études récentes portant sur la nouvelle taxonomie des CaP au stade localisé et métastatique révèlent que le RA ainsi que sa voie de signalisation font l'objet d'innombrables aberrations génomiques. Cependant ces anomalies ont été identifiées quasi exclusivement dans les formes avancées et métastatiques. Presque aucune anomalie touchant le RA n'a été identifiée au stade localisé ce

qui est troublant au regard des innombrables études plus anciennes qui tendent à prouver le contraire.

Cette première partie de ce travail s'est focalisée sur les mutations touchant le RA en privilégiant celles qui ont un impact fonctionnel. En effet, les technologies de PCR ou de séquençage à haut-débit (NGS) bien qu'extrêmement performantes n'apportent aucune indication sur la fonctionnalité des mutations en particulier lorsque celles-ci n'ont pas encore été décrites par le passé. Grâce à un test fonctionnel original développé au sein du laboratoire, il est possible de détecter des mutations ayant un impact fonctionnel à partir d'échantillons de CaP. Ce test a été à la base de l'élaboration d'une étude translationnelle qui a été menée de 2003 à 2011 dans un premier temps dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique puis poursuivie grâce à la mise en place d'une collection d'échantillons de CaP localisés et métastatiques au sein des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

L'objectif de cette 1<sup>ère</sup> partie a été de répondre à différentes interrogations qui restent débattues à ce jour. Les objectifs ont été :

1. Evaluer la fréquence réelle des mutations acquises du RA au cours de l'évolution des CaP chez l'homme permettant de déterminer si leur apparition survient précocement ou tardivement.
2. Identifier les RA mutants par séquençage et déterminer leur fonctionnalité en comparaison avec le récepteur sauvage
3. Evaluer l'impact pronostique clinique de ces mutants.

Cette première partie a donnée lieu à un article en cours de soumission.

# ARTICLE

## ***Androgen receptor mutations: New insights in potential mechanisms of resistance to hormone therapies in prostate cancer.***

*P Barthélémy<sup>1,2</sup>, E Erdmann<sup>1</sup>, M Delbecq<sup>1</sup>, F Cottard<sup>1</sup>, JP Bergerat<sup>1,2</sup>, H Lang<sup>3</sup>, V Lindner<sup>4</sup>, JE Kurtz<sup>1,2</sup>, J Céraline<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>INSERM, UMR\_S1113, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Department of Urology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>4</sup>Department of Pathology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

*Androgen receptor mutations: New insights in potential mechanisms of resistance to second-generation hormone therapies in prostate cancer.*

*P Barthélémy<sup>1,2</sup>, E Erdmann<sup>1</sup>, M Delbecque<sup>1</sup>, F Cottard<sup>1</sup>, JP Bergerat<sup>1,2</sup>, H Lang<sup>3</sup>, V Lindner<sup>4</sup>, JE Kurtz<sup>1,2</sup>, J Céraline<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>INSERM, UMR\_S1113, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Department of Urology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>4</sup>Department of Pathology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

## **Abstract:**

**Background:** Even in the setting of castration-resistant prostate cancer (CRPC), the androgen receptor (AR) is a cornerstone for both prostate cancer (PCa) cells proliferation and survival. The AR pathway harbors several aberrations directly affecting the AR through amplification and mutation. AR mutations induce resistance to first and second-generation hormone therapies, which represent the main treatment for advanced and possibly localized PCa. Recent data suggest that AR alterations rarely occur in localized PCa and are more common in CRPC. These observations are in contrast to the plethora of mutations described in localized PCa in the literature. The aim of the present study was to determine the frequency of mutations in localized and metastatic PCa samples.

**Material and Methods:** A previously described AR yeast-based functional assay (YBA) was used to detect and characterize mutant AR in localized and metastatic PCa samples. PCa samples were obtained from radical prostatectomy, transurethral resection of the prostate (TURP) (localized PCa) or bone marrow aspirates under an institutional review board-approved protocol.

**Results:** A total of 116 localized prostate cancer samples and 32 samples from metastatic PCa patients were collected between June of 2004 and June of 2011. YBA was performed in 87 localized PCa samples and 5 metastatic PCa samples. Atypical response pattern to a large hormone panel was observed in 69 localized and 5 metastatic PCa samples. We identified a total of 91 different AR mutations in PCa samples, with a high incidence of recurrent nonsense mutations (N=25). The frequency of AR mutations in localized PCa samples was 46% (N=26/56) and 100% (N=5/5) in metastatic PCa samples.

**Conclusion:** Our results suggest that AR mutations should not be considered as a rare event in localized PCa. The YBA is an original and interesting tool for studying and identifying new AR alterations with a high sensitivity. This assay, using mRNA, is able to identify post-transcriptional alterations of the AR, which can explain the contrast between our results and recent published data arising from next-generation sequencing.

## Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed malignancy in men over 50 years of age in western countries and the second leading cause of cancer-related death in Europe (1). In the era of routine PSA screening, most PCa are diagnosed at an early setting while they are confined within the prostate and potentially curable. Androgens and androgen receptor (AR) play a key role in PCa cells proliferation or survival. Androgen deprivation therapy using a gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist or antagonist alone or in combination with first generation antiandrogen agents remains the most effective treatment for advanced PCa. Moreover, hormone therapy is the most widely used treatment for biochemical recurrence and for localized PCa in combination with radiotherapy (2–4). However, all patients eventually develop resistance to androgen deprivation and progress to a castration-resistant state. A decade ago, it was generally believed that AR signaling pathway was dispensable to the biology of CRPC. However, it is now well accepted that residual androgens and the AR itself continue to play a key role in PCa progression at castration-resistant state.

Owing to long-term efforts in the understanding of molecular mechanism of resistance to first generation hormone agents, several new AR-directed therapies including enzalutamide and abiraterone acetate have been developed. Abiraterone and enzalutamide are currently approved for the treatment of advanced metastatic CRPC (mCRPC) in chemotherapy-naïve and chemotherapy-refractory patients based on large phase III trials that showed overall survival improvement. (5–8). Some other compounds including ARN509, ODM-201, VT-464, galeterone are currently in development, with the ability to reduce AR protein levels for some of them (AZD3514, EZN-4176) (9–12). All these compounds are already under investigation in early localized PCa patients (NCT number of clinical trials: NCT02064582, NCT02268175, NCT02200614, NCT01946204, NCT02003924). Unfortunately, although second generation hormone agents have provided benefit to many patients in the metastatic setting, not all patient respond to treatment, and the durability of response is limited (13). Landmark advances have been made over the past years in characterizing the molecular mechanism driving tumor initiation and progression and involve the AR gene. Indeed, a number of mutations, amplifications and splicing events affecting the AR gene have been linked to CRPC (14–16). The AR gene is the most mutated type of steroid receptor as the gene is located on the X chromosome. So far, about 1000 mutations of the AR have been reported, mostly in androgen-insensitivity syndrome (14), whereas 159 mutations have been found in PCa tissue. Considerable controversy has revolved around conflicting studies on the frequency of AR mutations in localized PCa and their functional impact (17–19). The frequency of AR mutations strongly varies among different studies from 2% up to 44% in localized PCa and up to 50% in metastatic CRPC. It has been argued that AR mutations only appear after anti-androgen treatments and mostly in advanced setting (20,21). The better understanding of the biology of AR underlying mechanism of drug resistance is of particular interest, as second-generation hormone compounds are now under investigation in early PCa setting. The early identification of AR alterations will allow clinicians to optimize treatment and to overcome primary or acquired resistance by the use of new targeted therapies or new treatment strategies.

The yeast reporter assay is an efficient, rapid model allowing high throughput screening for AR mutations. Moreover the assessment of mutant AR transactivation activity is possible using such assays. The aim of our study was to determine, using an original yeast-based functional assay, the frequency of AR mutations in

localized and metastatic PCa. Furthermore we investigated and discussed their functional impact, especially the potential role of AR mutations in mechanism of resistance to first and second-generation hormone therapies.

## **Materials and Methods**

### **Sample collection**

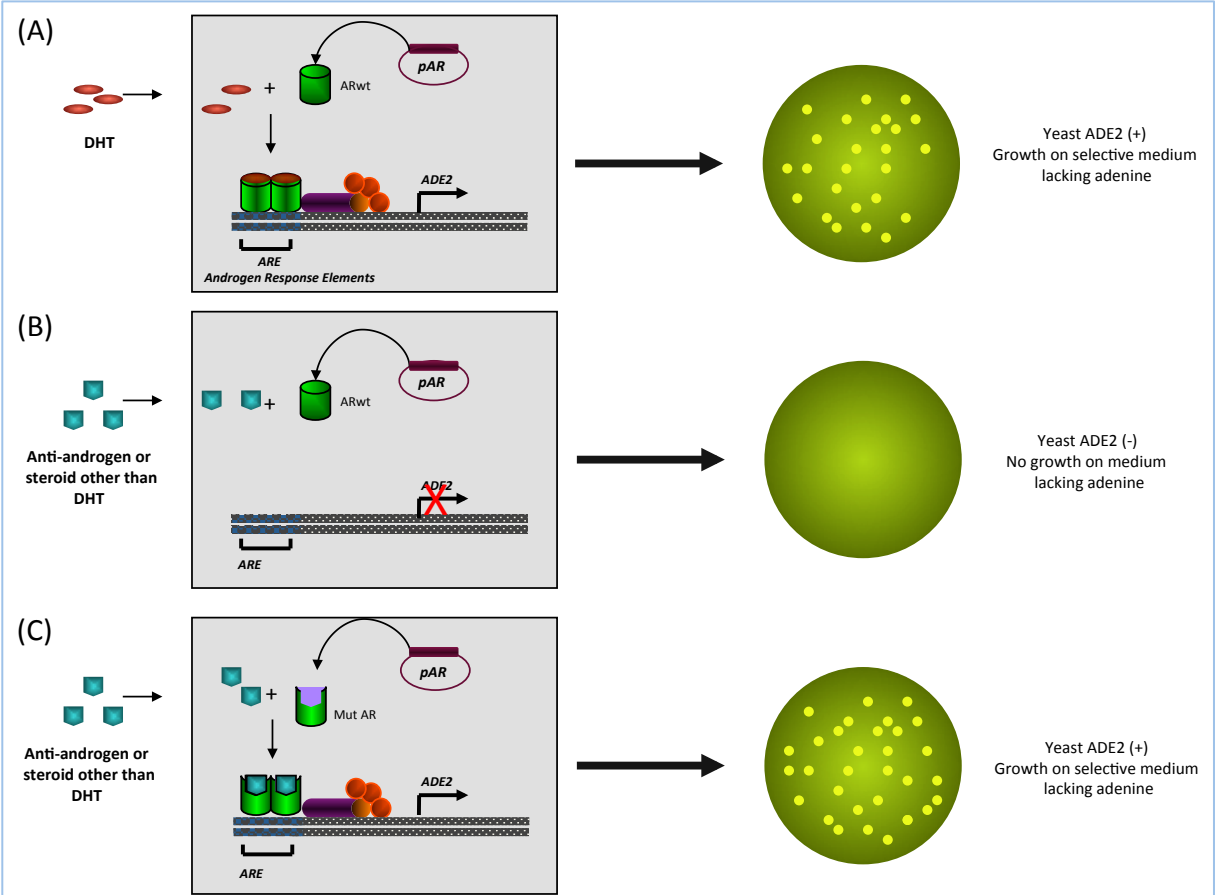
We collected prospectively localized PCa samples and metastatic CRPC samples from patients treated between 2004 and 2009 at the Strasbourg University hospital, France. PCa samples were obtained from radical prostatectomy (localized PCa), bone marrow aspirates or transurethral resection of the prostate (metastatic CRPC) under an institutional review board-approved protocol. Study pathologists determined the presence and percentage of tumor cells, the tumor histology, the tumor grade according to Gleason system (AJCC 2009), the margins and the tumor stage. Written informed consent was obtained from each patient before any study specific procedure was performed. Patients' characteristics such as age, Gleason score, administered treatments and pathological tumor stage were recorded.

### **Yeast-based functional assay:**

We used a previously described AR yeast-based functional assay (Figure 1) to detect and characterize mutant AR in localized and metastatic PCa samples (22). The assay was performed in the recombinant EJ250 yeast strain (MATa *ade2-101<sup>o</sup> his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801<sup>a</sup> trp1-Δ1 ura3-52 URA3::ARE-ADE2 (pRS/ARE-Ade2)*). In this EJ250 yeast strain, the expression of the ADE2 reporter gene, mandatory for adenine biosynthesis, was placed under the tight control of an androgen-dependent promoter. Consequently, EJ250 yeast growth relies on the transcriptional activity of a ligand-activated androgen receptor. After transformation with an AR expression plasmid as described earlier (22), yeast were plated on selective media depleted of adenine and containing either dihydrotestosterone (DHT), dehydroepiandrosterone (DHEA),  $\beta$ -estradiol, progesterone, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, flutamide, spironolactone and bicalutamide (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Based on the approval of enzalutamide (MDV3100) we subsequently added enzalutamide in our hormone panel. A negative control (vehicle) and a positive control (supplemented with adenine) were also included. In this assay, mutant AR variants were distinguished from the wild-type AR (ARwt) by comparing their response patterns to the panel of steroid and non-steroid ligands added in the medium.



Figure 1: Yeast-based functional assay. The expression of the *ADE2* gene is androgen dependent. (A) Activation of the ARwt by DHT leads to the expression of the *ADE2* gene resulting in yeast growth on selective medium lacking adenine. (B) There is no expression of the *ADE2* gene and therefore no yeast growth in the presence of steroid ligands that ARwt binds to with low affinity. (C) Mutant (Mut) AR with a broad specificity can be activated by different ligands resulting in yeast growth on selective medium lacking adenine. p, plasmid. Adapted from Céraline *et al*, (22).



## Detection of AR mutations in tumor samples

Briefly, total RNA was extracted from bone marrow samples, transurethral resection of the prostate (TURP) and prostatectomy samples using nucleospin RNA II assay (Macherey Nagel, France) according to manufacturer's procedure. RNA was quantified measuring the absorbance at 260nm and 280nm (Nanodrop 2000). AR cDNA fragments were amplified by RT-PCR with the forward (5'-TGCGGCGGCGCAGTGCCGCTAT-3') (NM\_000044.3; nucleotides 2318–2339) and reverse (5'-GGTGCCATGGGAGGGTTAGATAGGGAG-3') (NM\_000044.3; nucleotides 4075–4101) primers. The reverse transcription was performed from 400ng or 1µg of total RNA using RT Omniscript assay (Qiagen, Courtaboeuf, France). Thereafter, 100ng ARcDNA fragments were inserted by homologous recombination into a yeast expression "gap repair" plasmid containing the N- and the C-terminal parts of the AR. After plating and incubation at 30°C for 72 h, yeast colonies were scored. The wild-type AR was assayed in parallel as experimental control. The androgen receptor-dependent yeast growth in response to the steroid or antiandrogen added to the medium was evaluated by colonies scoring. Data are presented as histograms corresponding to the ratio of the number of yeast colonies scored to the number of colonies obtained in the presence of 100 nM DHT. For AR mutations characterization, the AR expression plasmid was rescued from yeast cells for sequencing. Briefly, yeasts were lysed with 150 to 212 µm acid-washed glass beads (Sigma Aldrich) and plasmid DNA was extracted with the Nucleospin plasmid kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and processed for sequencing (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany).

## Cell culture

The human prostate carcinoma LNCaP cell line, clone FGC was maintained in RPMI-1640 complete medium containing 10% fetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, France) and 1mM sodium pyruvate (Invitrogen, Fisher Scientific, France).

## Plasmids and generation of AR mutants

For immunofluorescence experiments, the wild-type androgen receptor (AR) (AR-WT) and the constitutively active AR Q640X variants were linked to EGFP as previously described (23,24). The pEGFP-ARG624E/M625K and pEGFP-ARN824K plasmids were constructed from pEGFP-AR-WT by site-directed mutagenesis with the QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France) and the respective 5'-AATGTTATGAAGCAGAGAAGACTCTGGGAGCCCGG-3' (NM\_000044.3, nucleotides 2972 – 3006) and 5'-CCAGTGGATGGGCTGAAAAAGCAAAAATTCTTTGATGAACTTCG-3' (NM\_000044.3, nucleotides 3568 – 3611) primers. The mutagenic sequences are underlined.

## Luciferase reporter gene assay

The PSA-61-Luc reporter plasmid containing a 6-kb PSA promoter fragment with the three androgen response elements (AREI, AREII and AREIII) was a generous gift from Dr Trapman (ERASMUS University, Rotterdam). LNCaP cells were seeded in 24-well plates at a density of  $1.25 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and cultures in complete medium. Forty-eight hours after, medium was changed and cells were co-transfected with 10µg of firefly luciferase reporter plasmid and pEGFP-ARG624E/M625K or pEGFP-AR-WT plasmid. For transfections, the JetPEI<sup>TM</sup> transfection reagent (Polyplus Transfection, Ozyme, France) was used according to the manufacturer's protocol.

Twenty-four hours later, the medium was changed to fresh medium containing 10nM dihydrotestosterone (DHT) or Ethanol (Vehicle). Cells were incubated up to 48 hours after transfection and luciferase activity was measured by using the Dual Glo luciferase assay system following manufacturer's protocol and the GloMax 96 Microplate luminometer (Promega). Renilla luciferase was used as an internal control for transfection efficiency. Samples were assayed in triplicates and firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity.

### **Fluorescence microscopy**

Lab-Tek II chamber slides (2 wells) were coated with LNCaP complete medium for two hours and  $1 \times 10^5$  LNCaP cells/well were seeded. LNCaP cells were transfected with 2 $\mu$ g of pEGFP-AR-WT or pEGFP-ARG624E/M625K 48 hours later. Medium was changed 24 hours after transfection to medium containing 10% charcoal-treated serum, 10 $\mu$ M MDV3100 or 10nM DHT, or vehicle. Cells were fixed 72 hours later with 2% paraformaldehyde and mounted for image capture with the Leica LAS AF6000 fluorescence microscope using LAS AF software (Leica).

## Results

### *Frequent atypical androgen response patterns in localized as well as metastatic prostate cancer samples*

A total of 116 localized prostate cancer (PCa) samples and 32 samples from metastatic PCa patients were collected between June of 2004 and June of 2011. Total RNA of good quality was extracted in 90 localized PCa samples. Among the 90 analyzed samples from localized PCa 45 were fresh-frozen samples and 45 were fresh tissue harvest from prostatectomy specimens. Presence of cell clusters corresponding to metastatic PCa cells was confirmed in 16 out of 23 (29%) bone marrow samples after microscopic observation. RNA extraction was successfully performed in 5 out of 16 metastatic PCa samples. The low cellularity of cancer cells in the samples was the main reason for total RNA extraction failure. After total RNA extraction and RT-PCR, YFB assay was successfully performed in 87 localized PCa samples and only 5 metastatic samples. The clinic-pathological characteristics of this final study population are summarized in table 1.

*Table 1: Patients characteristics*

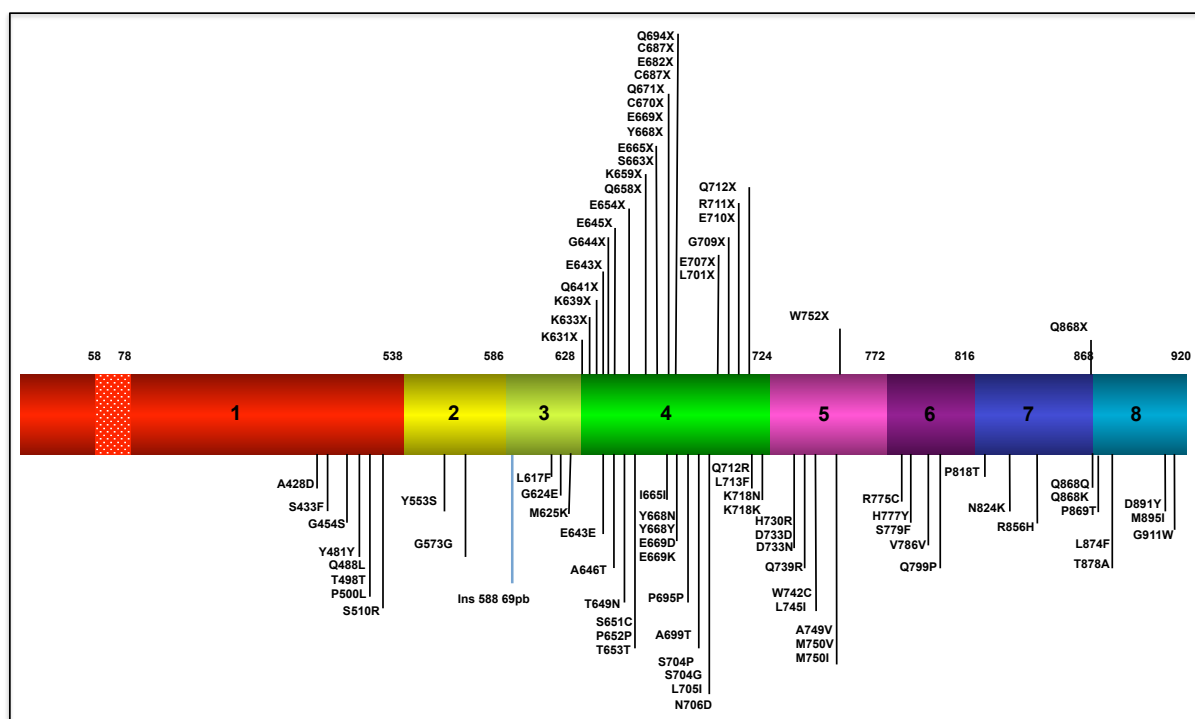
	Localized PCa (N=87)	Metastatic PCa (N=5)
Age at diagnosis, median (range)	63.6 (49-85)	70.0 (70-75)
Gleason score		
5-6	10 (11.5%)	1 (20%)
7	61 (70.1%)	0 (0%)
8-10	14 (16.1%)	4 (80%)
ND	2 (2.3%)	0
Stage		
<b>pT2</b>		
pT2a	8 (9.2%)	
pT2b	3 (3.5%)	
pT2c	57 (65.5%)	
<b>pT3</b>		
pT3a	10 (11.5%)	
pT3b	7 (8%)	
<b>RTUP</b>	2 (2.5%)	

YFB assay was performed using a broad range of steroid and non-steroid ligands in order to establish AR response pattern for each tumor sample. We found a very high incidence of atypical AR response patterns to the hormone panel in localized (N=69/87) as well as in metastatic PCa samples (N=5/5). DNA sequencing was performed for each sample with atypical response patterns to identify the underneath AR mutations. We identified mutations in 26 out of 56 localized PCa samples (46%) and in all five metastatic bone marrow samples (100%) (Table 2) (Figure 2).

**Table 2 : Mutations including insertion and deletion identified in localized and/or metastatic PCa tissues. The new amino acid numbering system based on NCBI reference sequence NM\_000044.3 has been used. Data presented in table 2 correspond to 56 out of 69 samples that were sequenced. 13 samples had insufficient quantity of residual RNA to perform sequencing. PCa: Prostate cancer ; ADE : adenine ; Prog: progesterone; BIC: bicalutamide; MDV: enzalutamide; SP: spironolactone; AND: androstenedione ;**

Domain	Mutation	Prostate Cancer	Growth Condition	Domain	Mutation	Prostate Cancer	Growth Condition
NTD	A428D	Localized Pca	ADE-	LBD	S704G	Localized Pca	ADE-
	S433F	Localized Pca	ADE+		S704P	Localized Pca	ADE-
	G454S	Localized Pca	ADE-		N706D	Metastatic CRPC (bone marrow)	ADE+
	V481Y	Localized Pca	ADE+		L705I	Localized Pca	ADE-
	Q488L	Localized Pca	ADE-		E707X	Localized Pca	ADE-
	T498T	Metastatic CRPC (bone marrow)	ADE+		G709X	Metastatic CRPC (TURP, bone marrow), Localized Pca	ADE-, PREG, MDV,BIC
	P500L	Localized Pca	ADE+		E710X	Localized Pca	ADE+
	S510R	Localized Pca	ADE+		R711X	Metastatic CRPC (bone marrow)Localized Pca	SP,ADE-,AND
	Y553S	Metastatic Pca (bone marrow)Localized Pca	PROG,ADE+		Q712R	Localized Pca	ADE+
	G573G	Localized Pca	ADE-		Q712X	Localized Pca	MDV,BIC
DBD	L617F	Localized Pca	ADE-	L713F	Localized Pca	ADE-	
	G624E	Metastatic CRPC (TURP);Localized Pca	MDV,BIC	K718K	Localized Pca	ADE+	
	M625K	Metastatic CRPC (TURP);Localized Pca	MDV,BIC	K718N	Metastatic Pca (bone marrow)Localized Pca	ADE+,BIC	
	K631X	Localized Pca	ADE-,MDV	H730R	Localized Pca	MDV	
	K633X	Localized Pca	AND	D733D	Localized Pca	AND	
	K639X	Localized Pca	MDV	D733N	Localized Pca	AND	
	Q641X	Metastatic CRPC (TURP),localized Pca	ADE-,PROG,MDV,BIC	Q739R	Metastatic CRPC (TURP, bone marrow), Localized Pca	ADE+	
	E643E	Localized Pca	ADE+	W742X	Localized Pca	ADE-	
	E643X	Metastatic Pca (bone marrow)Localized Pca	ADE-,MDV	W742C	Metastatic CRPC (TURP)	MDV	
	G644X	Metastatic Pca (bone marrow)Localized Pca	PROG,ADE+, ADE-,MDV,BIC	L745I	Localized Pca	MDV	
HR	E645X	Localized Pca	ADE-,BIC	A749V	Localized Pca	MDV	
	A646T	Localized Pca	ADE-	M750V	Localized Pca	AND	
	T649N	Localized Pca	ADE+	M750I	Localized Pca	ADE-, BIC	
	S651C	Localized Pca	MDV	W752X	Localized Pca	ADE-	
	P652P	Localized Pca	ADE+	R775C	Localized Pca	BIC	
	T653T	Localized Pca	ADE-	H777Y	Localized Pca	ADE-	
	E654X	Localized Pca, Metastatic CRPC (bone marrow)	ADE-	S779F	Metastatic CRPC (bone marrow)	ADE+	
	Q658X	Localized Pca	MDV, ADE-	V786V	Localized Pca	ADE+	
	K659X	Localized Pca	ADE-, MDV	Q799P	Localized Pca	MDV	
	S663X	Localized Pca	ADE-	P818T	Localized Pca	ADE-	
LBD	I665I	Localized Pca	ADE+	N824K	Localized Pca	MDV,BIC	
	Y668Y	Localized Pca	BIC	R856H	Metastatic CRPC (TURP)	MDV	
	Y668N	Localized Pca	MDV, ADE-	Q868X	Metastatic CaP (bone marrow), Localized Pca	ADE-	
	Y668X	Localized Pca	BIC, ADE-	Q868Q	Localized Pca	BIC	
	E669X	Localized Pca	ADE-	Q868K	Localized Pca	MDV	
	E669D	Localized Pca	ADE+	P869T	Localized Pca	MDV	
	E669K	Localized Pca	MDV,BIC	L874F	Localized Pca	BIC	
	C670X	Localized Pca	BIC,ADE-	T878A	Metastatic CRPC (TURP, bone marrow), Localized Pca	ADE-,AND,FLUT,PROG,MDV	
	Q671X	Localized Pca, Metastatic CRPC (bone marrow)	PROG,ADE-,PROG,MDV,BIC	D891Y	Metastatic CRPC (bone marrow)	SP	
	E682X	Localized Pca	BIC	M895I	Localized Pca	BIC	
LBD	C687X	Localized Pca	AND,MDV	G911W	Localized Pca	ADE+	
	Q694X	Metastatic CRPC (TURP, bone marrow),Localized Pca	ADE+,ADE-,SP,MDV,BIC	del 61pb(3071)	Localized Pca	ADE+	
	P695P	Localized Pca	ADE+	del 29pb(723)	Localized Pca	ADE-	
	A699T	Localized Pca	ADE+	del 38pb(685)	Localized Pca	ADE-	
	L701X	Localized Pca	MDV,BIC	INS 588 69pb	Metastatic CRPC (bone marrow)	ADE+	

**Figure 2: Map of identified mutations in prostate cancer samples.** The figure represents the distribution of all identified missense mutations and insertions on the AR gene. The new amino acid numbering system based on NCBI reference sequence NM\_000044.3 has been used. Nonsense mutations are represented in the upper part of the gene, as missense mutations are represented in the lower part.



Most identified mutations are single base substitutions that directly or indirectly affect the AR function. The McGill androgen receptor gene mutation database summarizes all published mutations for the AR identified in PCA and in androgen insensitivity syndromes (14). The functional impact of most of the described mutations remains unknown. However, long-term efforts over the last years were undertaken to provide information on how AR mutations may modify the AR genomic and non-genomic activity. Most mutations affect ARs transcriptional activity i) changing the specificity of the ligand-binding pocket, ii) altering the binding of cofactors (coactivators, corepressors or proteins involved in the degradation process of the AR) and iii) modifying the capacity of the AR to bind the DNA (25). Moreover, AR mutations represent a mechanism of resistance to many hormone therapies of first or second generation (26).

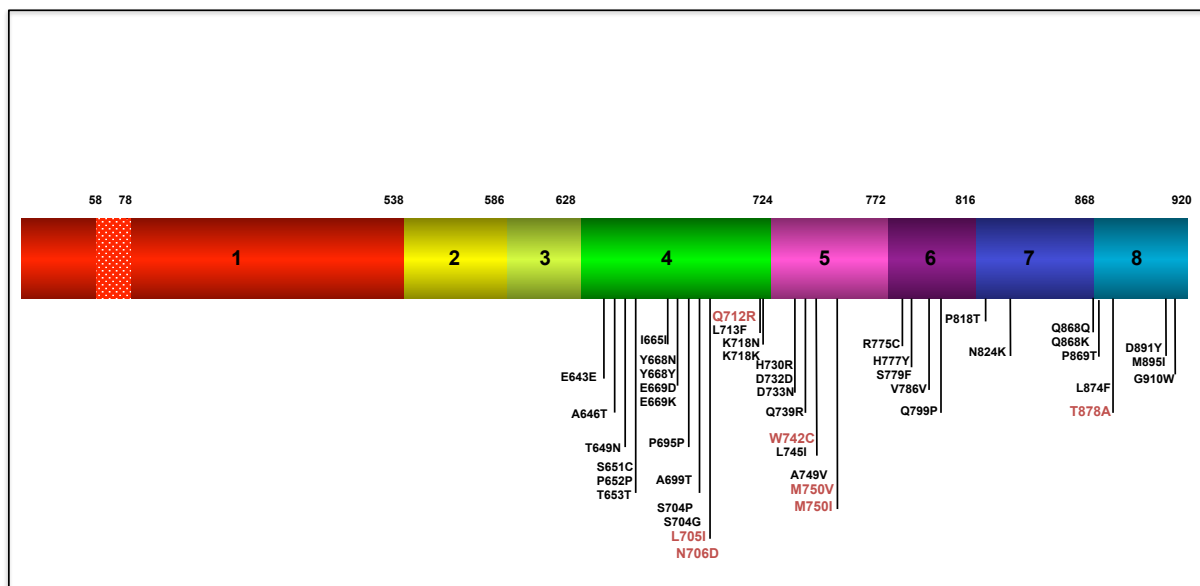
We detected 59 missense mutations, one insertion, 3 deletions and 27 nonsense mutations. Among the 90 identified mutations, 56% of mutations were localized in the LBD (N=51), 7 % (N=6) in the DBD, 28% (N=25) in the HR and 9 % (N=8) in the NTD. These findings are in accordance with previously published data showing that around 45% of the mutations identified in PCa patients occur in the LBD, 30% occur in exon 1 and only few mutations were described in the DBD (14). Moreover, the majority (79%) of reported missense AR gene

mutations identified in AR LBD cluster to three discrete regions that influence AR activity (27). These regions are codons 701–730, which constitute the “signature sequence of the NH2-terminal domain, a highly conserved loop between helices 3 and 4 of nuclear receptors that influences interactions with cellular coregulators (28), codons 874–910, which flank AF-2, and codons 670–678, which are localized at the frontier of the hinge region and LBD, and a region within helix 5 (codon 741-763) forming the ligand-binding pocket. In our study numerous missense mutations occurred in one of these three regions.

### ***Missense mutations affecting the ligand-binding pocket in the LBD***

According to previous published data, we found that most AR missense mutations (N=35) occurred in the ligand-binding domain. The distribution of all point mutations in the AR-LBD is shown in Figure 3. These mutations result in either broadened ligand specificity or constitutive protein activity. These gain-of-function mutations allow prostatic epithelial cells to grow in an androgen-independent manner, suggesting that these mutations render the AR susceptible to activation by alternative ligands such as estrogens, progesterone or adrenal steroids.

**Figure 3: Map of all point mutations within the ligand-binding domain of the AR.** Mutations targeting key residues are represented in red. The new amino acid numbering system based on NCBI reference sequence NM\_000044.3 has been used.



The AR LBD has been structurally well characterized, with key residues forming the DHT- binding pocket and interacting with different ligands: N706, Q712, T878 and R753. Notably, there are four hydrogen bonds formed between the LBD and DHT/Testosterone/R1881. Hydrophobic interactions play a crucial role in AR ligand binding, because the steroid skeleton interacts with the ligand-binding pocket largely through hydrophobic

interactions. In addition to hydrophobic interactions, hydrogen bonding in some key regions of the ligand-binding pocket, in particular Q712 and R753 residues also plays a critical role in steroidal ligand binding. Furthermore, AR ligands are also in close contact with the L705 residue and side chain of N706. The interactions between the ligand and residues N706 (N-terminal region of H3) and T878 (C-terminal region of H11) appear to be crucial to the conformational changes that pull the N-terminal region and C-terminal region toward the ligand-binding pocket, which serves as part of the mechanism to close the ligand-binding pocket upon ligand binding. N706 and T878 mutations not only decrease the binding specificity of the ligand but may also be related to the antagonist activity of the ligand. Mutations of one of these crucial residues may change the conformation of the ligand-binding pocket and modify the specificity for ligand binding.

In our study, we identified several mutations affecting essential residues interacting with AR ligands and antagonists such as T878A, Q712R, L705I and W742C. As expected, the well-known T878A mutant that confers resistance to hydroxyflutamide, abiraterone acetate and is promiscuously activated by progesterone and 17 $\beta$ -estradiol has been identified in metastatic samples from patients previously treated with androgen deprivation therapy (ADT). More surprisingly, the T878A mutation was also identified in a hormone naive localized PCa suggesting that the cell clone harboring the mutation was already present before any exposure to hormone therapy. This AR mutant may have emerged as a simple bystander, and this observation exemplifies the fact that such mutations may occur spontaneously and be eventually later selected and emerge as a consequence of hormone therapy. In addition to the T878, L705, Q712 residues, M750 and L873 residues are also crucial contact sites identified by the molecular model of AR-LBD bound to estrogen as well as contact sites in the molecular model of the AR-LBD bound to DHT. M750 is a known hot spot for mutations in AR-associated diseases as several different somatic and germline mutations have been described in PCa samples and in androgen insensitive syndrome (AIS). We detected M750V as well as M750I mutations in localized PCa samples.

The W742C mutation, associated with resistance to bicalutamide as well as enzalutamide, was only detected in metastatic PCa samples in patients previously treated by bicalutamide.

### ***Point mutations affecting interaction with AR partners***

In addition to mutations in key residues of the LBD and HR that lead to the ligand-binding pocket conformation changes resulting in altered ligand binding affinity, other missense mutations alter interactions between the NH2 and Carboxy-terminal domains of the AR, as well as AR interactions with protein such as coregulators (coactivators, corepressors) and chaperones.

These mutations are located in specific sequences such as the AR-2 core domain, the region between amino acid 872-910 that spans both helix 11, the SPOP binding motif in the AR hinge region or binding function 3 (BF3) domain, a recently described coactivator recruitment domain (29,30) Furthermore the AR NH2-terminal domain harbors several functionally important regions playing an essential role in a high number of protein-protein interactions (31,32)



The AR transcriptional activity is predominantly mediated via the constitutive activation function (AF-1) in the N terminal domain. Amino acid residues 101–370 and 360–485 have been identified as being critical for receptor-dependent transactivation, and these have been termed transcriptional activation units TAU-1 (residues 102-371) and TAU-5 (residues 361-486) (33). Mutations of these key residues or in the WxxLF motif at residues 434-437 are critical for interaction with AR LBD. Our YBA was designed to assess mutations in AR transcripts from residue 425 to amino acid 920. We identified three missense mutations within the Activating Function (AF-1) region (A428D, S433F, G454S). Interestingly the S433F flanks the WxxLF motif and has been identified and characterized in partial AIS (34). This missense mutation partially reduces the transactivation activity of the AR. The functional impact of the A428D and G454S mutations remains unclear and needs to be assessed.

We identified the A646T and T649N mutations located in the SPOP binding motif (<sup>646</sup>-ASSTT-<sup>650</sup>), which may alter the interaction between the AR and SPOP. SPOP is an E3 ubiquitin ligase able to bind and promote the destruction of the full length AR (30). The SPOP E3 ubiquitin ligase gene is frequently mutated in PCa and represents a well-described mechanism of resistance to antiandrogen therapy (35). As AR splicing variants, which lack the hinge domain harboring the SPOP binding domain, mutation of residues from the binding motif may impair the SPOP-mediated destruction of the AR. Mutations of the SPOP binding motif represent an alternative mechanism of resistance to SPOP mutations in PCa. Further studies are warranted to confirm this hypothesis.

The LBD, formed by 12 $\alpha$ -helix, harbors a major coactivator binding surface, the activation function-2 domain (AF-2). AF-2 is formed in response to agonist binding and form a hydrophobic coactivator-binding groove on the LBD-surface (36). This hydrophobic groove is formed by only 6–8 highly conserved residues (e.g., K720, M734, and M894) in the AF-2 core domain.

This domain acts as a binding site for short hydrophobic peptide motifs (NR boxes) featured in AR coactivators and in the AR NTD and mediates AR functional amino/carboxy (N/C)-terminal interaction (16–20). The coactivator-binding groove functions as an interaction surface for LxxLL- and FxxLF-like motifs containing coactivators where L is a leucine, F is a phenylalanine, and x represents any amino acid) as well as for the FxxLF motif in the AR-NTD, important in the NH<sub>2</sub>/COOH terminal domain interaction (36–38). We identified the missense mutation M894I localized in the putative core activation domain 2 (AF2) in helix 12 and which may modify N/C interactions.

The Q739R missense mutation has also been previously described (39). Published data indicate that cofactor binding to the coactivator groove is hindered by this substitution.

### ***Missense mutations in the DNA binding domain: incidence and functional impact***

DBD mutations have been rarely described in PCa as only five somatic missense mutations have been identified in PCa samples (14). Mutations in the DBD have been shown to selectively affect transactivation or transrepression functions of the AR as DBD mutations possibly reduce the DNA binding (14). Due to the high homology of the DBD across members of the nuclear receptor family, the cell and promoter specificity of different receptors is in part mediated by only a few changes in DBD sequence. It has been proposed that DBD

mutations could result in AR variants binding to response elements of other nuclear receptors, leading to an inappropriate activation or repression of critical pathways.

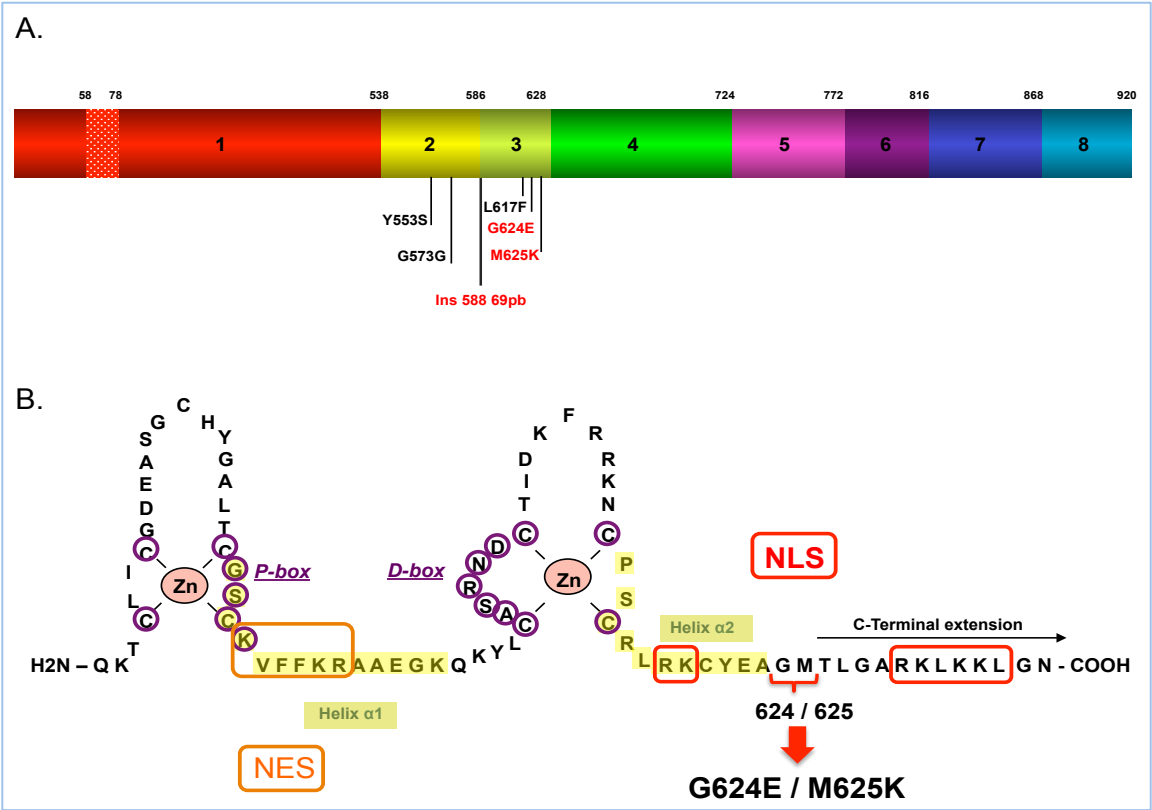
In our study we identified 6 new point mutations (Figure 4A). Two AR variants seem to be of particular interest: a double missense mutation G624E/M625K and an insertion of 69 nucleotides in position 2882 (Genbank NM\_000044.3) between two zinc fingers. This AR23 variant characterized by an insertion of 23 amino acids is the result of an alternative splicing (40). The insertion of 23 additional amino acids abolishes both AR nuclear translocation and AR DNA binding capacity. After DHT stimulation, AR23 remains cytoplasmic and form multiple aggregates, explaining the lack of genotropic activity. However, this variant appears to have an improved cytoplasmic non-genomic activity. Functional studies have shown that this variant AR23, although although being inactive by itself, increases the transcriptional activity of the wild-type AR in case of coexpression. Indeed, it looks like that the AR23 variant is able to sequester antiandrogens as well as some wild-type AR interaction partners (40). Moreover, as evidenced by cytoplasmic aggregates, the AR23 interacts with the chaperone system allowing the wild-type AR as some interacting proteins to escape degradation (40).

The second AR mutant is characterized by a double mutation affecting residues G624 and M625, which are part of the bipartite nuclear localization signal (NLS). The NLS (residues 617–633) is localized at the junction between the DBD and the hinge region (residues 626–665) and responsible for AR nuclear import. The NLS is composed of two clusters of basic amino acids separated by ten residues (617-RKCYEAGMTLGARKLKK-634), a motif that is highly conserved alongside with glucocorticoid, mineralocorticoid and progesterone receptors, all steroid hormone receptors (41) (Figure 4B). Mutations affecting this critical region can modify protein interaction and AR nuclear translocation. The G624E/M625K mutations, which flank the bipartite NLS, were detected in 20 different localized PCa samples. Regarding this very high incidence, we decided to perform functional analysis of this mutant. To assess whether these mutations could influence the nuclear localization of the mutant AR, we further analyzed the cellular localization of the mutant AR after DHT stimulation in the LNCaP cell line (Figure 5). As expected, wild-type AR exhibited a nuclear translocation upon DHT stimulation and remained mainly cytoplasmic in vehicle-treated cells. In contrast, mutant AR remained cytoplasmic following exposure to 10 nM DHT and formed cytoplasmic and perinuclear aggregates similar to those observed with the AR23 variant. These aggregates appear to be DHT dependent regarding the absence of aggregates in vehicle treated AR mutants.

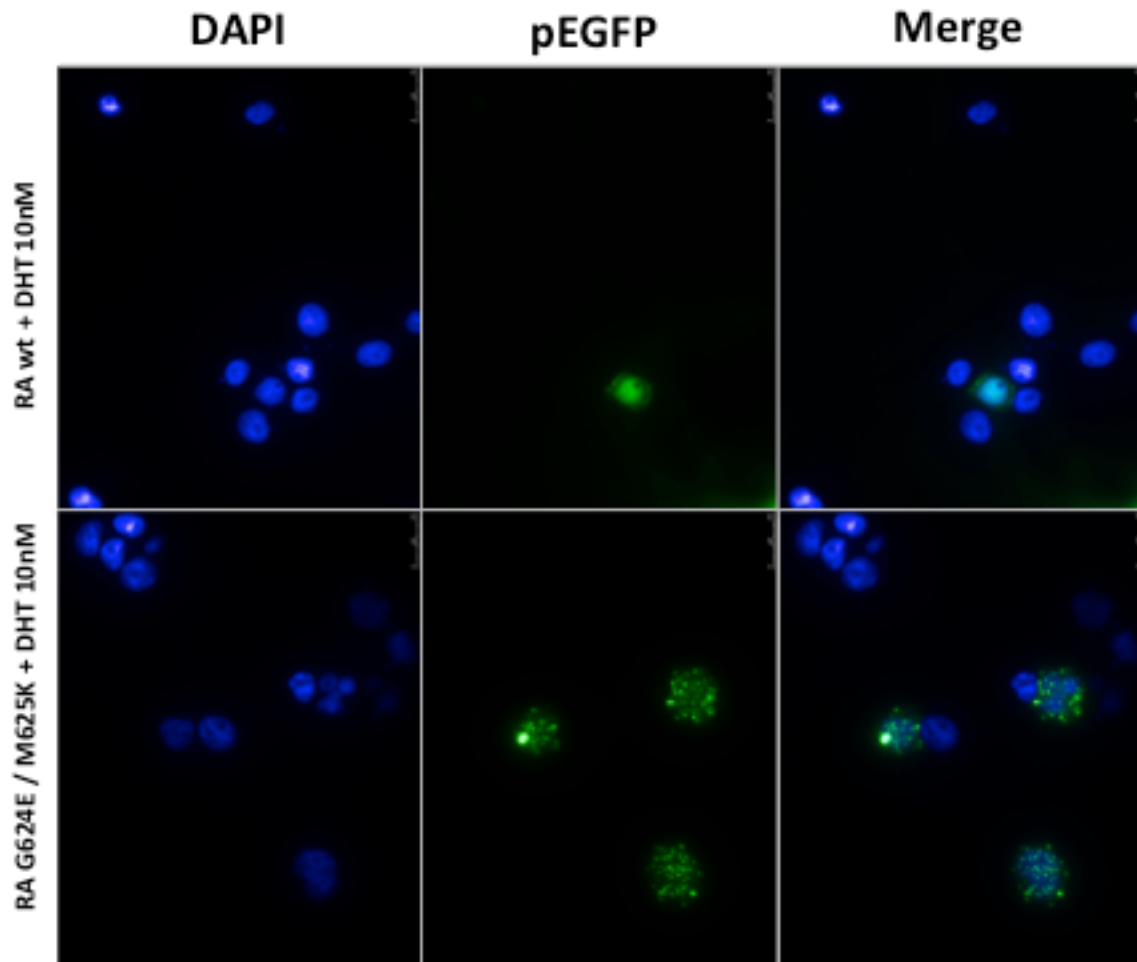
We further assessed mutant AR transactivation activity using different androgen-responsive promoter constructs. LNCaP cells were co-transfected with pEGFP-ARG624E/M625K, pEGFP-AR-WT, pEGFP-C3 and ARE-PSA-Luc. Following exposure to 10nM DHT, the mutant AR did not exhibit any significant transcriptional activity compared to AR-WT. No AR transcriptional activity was observed in LNCaP cells expressing AR-WT or ARG624E/M625K after stimulation with 10 $\mu$ M MDV3100 (figure 6).

Taken together, these data suggest that the AR G624E/M625K mutant could have a similar mechanism of action as the AR23 variant. This role of "decoy" seems to be an ingenious escape mechanism to anti-androgens and need to be further studied.

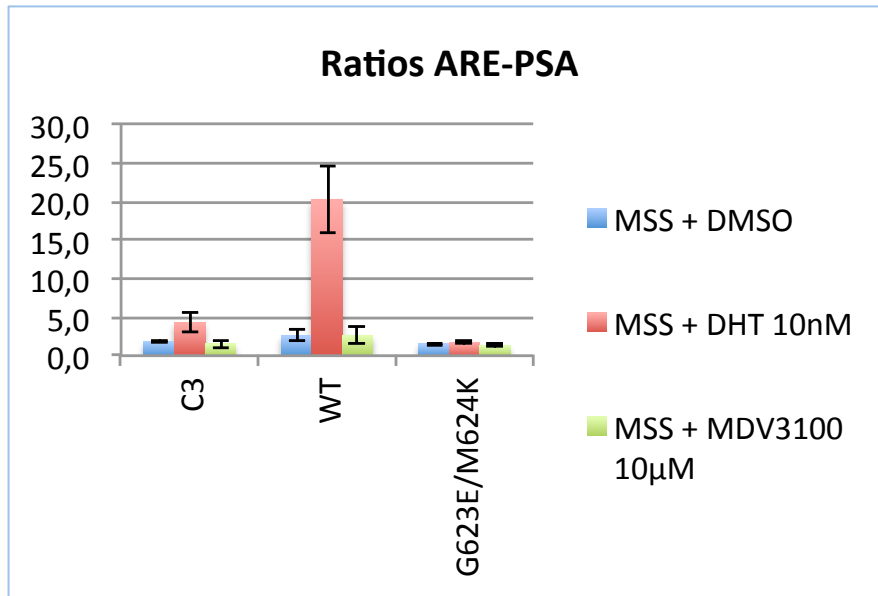
**Figure 4:** A. Map of point mutations and insertion within the DBD. The insertion of 69 nucleotides and G624E/M625K mutations are represented in red. The 69-nucleotide insertion in AR23 results from an exon/intron splicing error. B. Schematic representation of the human AR DBD showing the two zinc fingers, the P- and D-boxes, the nuclear export signal (NES), the bipartite nuclear localization signal (NLS) and the G624E/M625K mutations within the bipartite NLS (GenBank NM\_000044.3)



**Figure 5:** *The G624E/M625K double mutation affects the AR intracellular trafficking. LNCaP cells were transfected as described in Materials and Methods with the indicated pEGFP construct, and the intracellular localization of the EGFP-ARWT, or EGFP-ARG624E/M625K was assessed using fluorescent microscopy. Localization of pEGFP-ARWT or pEGFP-ARG624E/M625K fusion proteins, 24 h after DHT treatment. ARG624E/M625K was unable to enter in the nucleus upon DHT stimulation but formed rather cytoplasmic and perinuclear aggregates.*



**Figure 6: Transcriptional activity of AR-G624E/M625K mutant from ARE-PSA firefly Luciferase-reporter assay.** Results show no transcriptional activity of AR mutant with DHT as compared to the wild-type AR). No transcriptional activity was observed with MDV3100. Results are presented as mean relative LUC units  $\pm$  SD from triplicate samples.





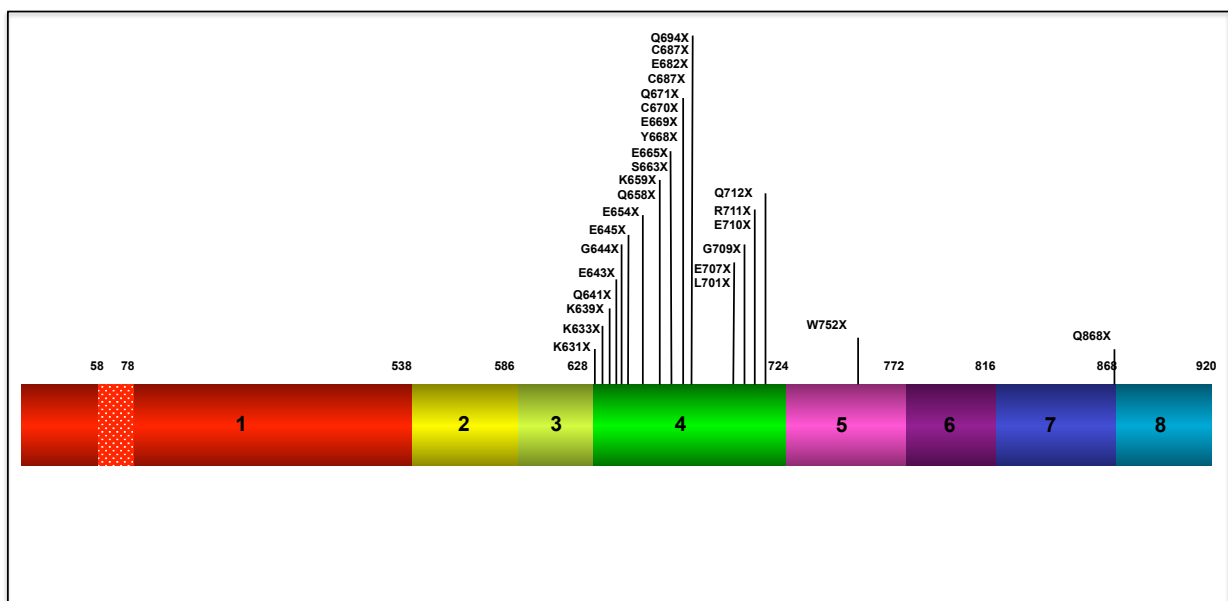
### *C-terminal Truncated Androgen receptor variants*

Surprisingly, a large number of nonsense mutations were detected in prostatectomy specimens and in metastatic PCa samples. A total of 27 different nonsense mutations have been identified. The presence of these nonsense mutations is characterized by an atypical hormone response pattern with the presence of an increased background noise

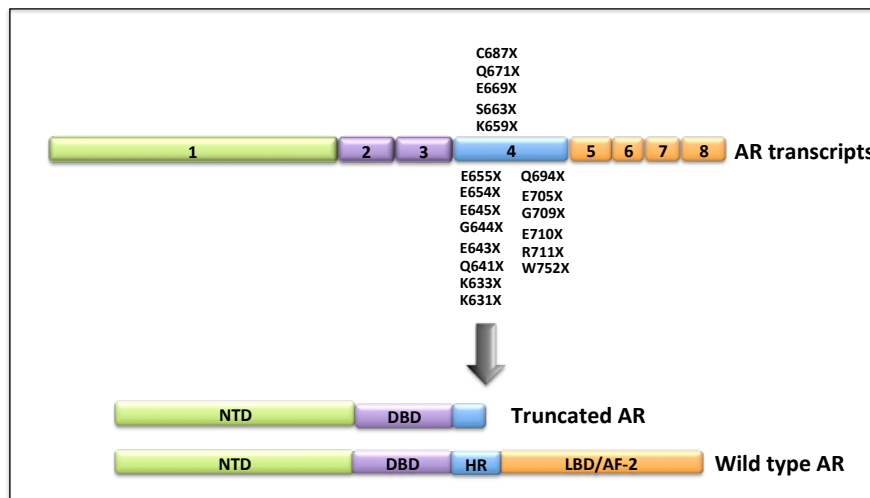
The majority of these nonsense mutations have not been described. The distribution of nonsense mutation in AR transcripts suggest that exon 4 is a mutational hot spot for nonsense mutation as this exon harbors nearly all nonsense mutations. (Figure 8)

This location of nonsense mutations between the hinge region and the CTE lead to truncated AR variants, in which the entire or a part of the CTE region is missing (Figure 9).

**Figure 8: Map of all identified nonsense mutations of the AR.** Nonsense mutations occur mostly in exon 4. Most nonsense mutations were never described in the past. The new amino acid numbering system based on NCBI reference sequence NM\_000044.2 has been used.



**Figure 9: Representation of a truncated androgen receptor variant.**



Transcriptional activities of the AR are tightly controlled by several processes including ligand binding, phosphorylation at key serine residues and interaction with coregulators (24). As all these processes involve amino acids, motifs or domains within the CTE, the loss of this region due to nonsense mutations is presumed to disturb dramatically AR function.

Currently five somatic nonsense mutations have been previously described in PCa samples (42). The Q641X has been extensively studied *in vitro*. The CTE loss dramatically disturbs AR transcriptional activity. Truncated AR variants acquire specific properties including the expected ligand-independent transcriptional activity, but also the capacity to specifically upregulate a panel of genes as evidenced for some genes involved in epithelial-to-mesenchymal transition (43).

Nonsense mutations have been detected in 26 out of 56 localized PCa samples. To our knowledge, this is the first study identifying nonsense mutations leading to truncated AR in localized PCa samples. The distribution of these nonsense mutations in localized PCa samples is represented in figure 8. This distribution is similar to our findings in the metastatic samples analysis.



## **Discussion:**

The AR regulates normal prostate development, as well as critical growth and survival of PCa cells in response to hormone signals. As PCa is androgeno-dependant, the AR pathway is a cornerstone in PCa pathogenesis. Since the pioneer work of Huggins *et al.* back to 1941, hormone therapy still represents the mainstay of PCa treatment (4). The AR signaling pathway remains the foremost target of several therapies in castration-resistant prostate cancer (CRPC) as it is now well accepted that the pathway continues to be crucial for the progression to CRPC and for its persistent growth.

The McGill androgen receptor gene mutation database (<http://androgendb.mcgill.ca/>) website provides an extensive list of all reported AR mutations (14). To date, there are over 1,000 known mutations described in the AR and 159 have been reported in PCa tissues. Most of reported mutations consist of single-base substitutions due to somatic rather than germline mutations and result in loss-of-function and gain-of-function.

While the number of reported mutation is permanently increasing, the exact relevance of these mutations in PCa remains unclear. Previous studies reported conflicting results with AR mutation frequency varying between 2% up to 44% in human PCa samples (17,18,44). Such differences might be attributed to variability in the methodology for the detection of AR mutations, tissue sampling and PCa heterogeneity. AR mutations are more frequent in metastatic PCa samples. Nearly 10-30% of patients with metastatic CRPC or recurrent PCa carry AR *mutations* especially after androgen deprivation therapies, supporting the hypothesis that mutations in the AR gene provide a survival and proliferative advantage to cells in androgen-deprived conditions (xx).

In contrast, our results suggest that AR mutations are not rare events in early prostate cancer. Surprisingly, each PCa sample harbored several mutations reflecting the tumor heterogeneity and the presence of different subclones.

Recent data from the Tumor Cancer Genome Atlas mRNA sequencing assays suggest that several AR splice variants, in particular the AR-V7, can be detected in hormone-naïve primary tumors and in few cases in adjacent benign tissue (45). However their expression was not associated with differential expression of AR target genes and the clinical impact of low levels of AR splicing variants remains largely unknown. Most of published data suggesting the absence of AR mutation in early PCa setting used assays based on DNA (45,46). In our study we used mRNA in order to assess the functional impact of AR alterations. This difference can in part explain our findings contrasting with previous data.

Another explanation comes from data suggesting that AR gene transcript RNA editing may represent a non-genomic molecular mechanism for introducing and accumulating AR mutations (47). The authors suggested that missense mutations could be incorporated into the AR gene transcript by the post-transcriptional process of RNA editing. This non-genomic process is able to introduce nucleotide transitions into pre-mRNA transcripts, which results in codon changes that modify the activity of a target protein (48).

RNA editing might explain the AR gene transcript missense mutations if the nucleotide transitions correlated to the substrate of RNA editing enzymes. The substrate specificities of RNA editing enzymes include A-to-I nucleotide transitions, which are mediated by so called adenosine deaminase RNA-specific enzymes (ADAR1, ADARB1), C-to-U transitions, which are mediated by the APOBEC 1 cytidine deaminase, and U-to-C and G-to-A transitions, which are mediated by enzymes not yet identified (48–50). Our yeast-based functional assay, using

RNA transcripts is capable to identify the genomic as well as non-genomic mutations.

Finally, we can suppose that somatic mutations of the AR may be the consequence of the intrinsic slight infidelity of the DNA replication machinery, enzymatic modification of DNA or defective DNA repair. However, our understanding of the mutational processes that cause somatic mutations in most cancer classes is clearly limited. Recent data suggest that the mutational signature in prostate cancer may be associated with patients' age and DNA mismatch repair deficiency.

All of identified mutations have a functional impact as they were identified by a functional assay. However, the YFA assay is very sensitive and is able to identify mutations at very low levels. The question whether low levels of AR mutants have a clinical impact remains unclear. We found no significant association between atypical androgen response patterns and biochemical recurrence free survival (data not shown). However, our study has some limitations including a small sample size, which does not allow assessing the prognostic impact of atypical androgen response pattern.

Interestingly, the nonsense mutations were preferentially identified in cell clones growing in ADE-microenvironment but also in clones growing despite the presence of bicalutamide and enzalutamide. The identification of cells harboring truncated AR mutant in presence of enzalutamide suggests that the loss of the C terminal domain represents a mechanism of resistance to enzalutamide. These findings are in accordance with recent clinical data published by Antonarakis *et al* showing that patients with AR-V7 do respond neither to enzalutamide nor to abiraterone acetate. A growing body of evidence suggests that truncated AR mutant play a crucial role in PCA progression, and resistance to anti androgens.

Moreover, we identified some samples harboring several mutations, which may further suggest intratumor heterogeneity emerging very early in hormone naive PCa. This observation supports the hypothesis that localized PCa is already a heterogeneous disease harboring several different clones including truncated AR variants and some AR mutants known to confer resistance to AR targeted therapies. Furthermore, we identified several missense mutations previously identified in AIS, suggesting these mutations lead to loss of function. In the light of tumor heterogeneity, we speculate that some of our AR mutants might be bystander rather than driver variants. These observations exemplify the fact that such mutations may occur spontaneously and be eventually later selected and emerge as a consequence of hormonal therapy.

A better understanding of the AR signaling pathway in early setting will be crucial in the future to pave the way to personalized medicine. Next generation hormone therapies are currently under investigation in phase II randomized controlled trials in localized PCa setting. Mutations in CRPC patients may provide essential information to decipher the mechanisms of ineluctable resistance to treatments that target the AR LBD. Further investigations are needed to determine the function of AR mutations throughout the disease.

## References :

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374–403.
2. Jones CU, Hunt D, McGowan DG, Amin MB, Chetner MP, Bruner DW, et al. Radiotherapy and Short-Term Androgen Deprivation for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2011 Jul 14;365(2):107–18.
3. van Poppel H, Nilsson S. Testosterone surge: rationale for gonadotropin-releasing hormone blockers? *Urology*. 2008 Jun;71(6):1001–6.
4. Huggins C, Hodges CV. 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*. 1941 Apr 1;1(4):293–7.
5. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med*. 2014 Jul 31;371(5):424–33.
6. Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, et al. Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2012 Oct;13(10):983–92.
7. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PFA, Sternberg CN, et al. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve 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*. 2015 Feb;16(2):152–60.
8. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin M-E, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2012 Sep 27;367(13):1187–97.
9. Omlin A, Jones RJ, van der Noll R, Satoh T, Niwakawa M, Smith SA, et al. AZD3514, an oral selective androgen receptor down-regulator in patients with castration-resistant prostate cancer - results of two parallel first-in-human phase I studies. *Invest New Drugs*. 2015 Jun;33(3):679–90.
10. Loddick SA, Ross SJ, Thomason AG, Robinson DM, Walker GE, Dunkley TPJ, et al. AZD3514: a small molecule that modulates androgen receptor signaling and function in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2013 Sep;12(9):1715–27.
11. Bianchini D, Omlin A, Pezaro C, Lorente D, Ferraldeschi R, Mukherji D, et al. First-in-human Phase I study of EZN-4176, a locked nucleic acid antisense oligonucleotide to exon 4 of the androgen receptor mRNA in patients with castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*. 2013 Nov 12;109(10):2579–86.
12. Dellis A, Papatsoris AG. Phase I and II therapies targeting the androgen receptor for the treatment of castration resistant prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016 Mar 22;1–11.
13. Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Dec;15(12):701–11.
14. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat*. 2012 May 1;33(5):887–94.
15. Marcias G, Erdmann E, Lapouge G, Siebert C, Barthélémy P, Duclos B, et al. Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCa) cell line. *Hum Mutat*. 2010 Jan;31(1):74–80.

16. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res.* 2008 Jul 1;68(13):5469–77.
17. Sanchez D, Rosell D, Honorato B, Lopez J, Arocena J, Sanz G. Androgen receptor mutations are associated with Gleason score in localized prostate cancer. *BJU Int.* 2006 Dec;98(6):1320–5.
18. Tilley WD, Buchanan G, Hickey TE, Bentel JM. Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1996 Feb;2(2):277–85.
19. Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, de Borja R, Trudel D, Lalonde E, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet.* 2015 Jul;47(7):736–45.
20. Steinkamp MP, O'Mahony OA, Brogley M, Rehman H, Lapensee EW, Dhanasekaran S, et al. Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4434–42.
21. Hyytinen E-R, Haapala K, Thompson J, Lappalainen I, Roiha M, Rantala I, et al. Pattern of somatic androgen receptor gene mutations in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2002 Nov;82(11):1591–8.
22. Céraline J, Erdmann E, Erbs P, Deslandres-Cruchant M, Jacquemin D, Duclos B, et al. A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc.* 2003 Jan;148(1):99–110.
23. Céraline J, Cruchant MD, Erdmann E, Erbs P, Kurtz J-E, Duclos B, et al. Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2004 Jan 1;108(1):152–7.
24. Lapouge G, Erdmann E, Marcias G, Jagla M, Monge A, Kessler P, et al. Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harboring a new class of androgen receptor mutation—a new paradigm for cooperation among prostate tumor cells. *Int J Cancer.* 2007 Sep 15;121(6):1238–44.
25. Brooke G., Bevan C. The Role of Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancer Progression. *Curr Genomics.* 2009 Mar;10(1):18–25.
26. Hu R, Denmeade SR, Luo J. Molecular processes leading to aberrant androgen receptor signaling and castration resistance in prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2010 Sep;5(5):753–64.
27. Buchanan G, Greenberg NM, Scher HI, Harris JM, Marshall VR, Tilley WD. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2001 May;7(5):1273–81.
28. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol.* 1996 Feb;3(2):206.
29. Estébanez-Perpiñá E, Arnold LA, Nguyen P, Rodrigues ED, Mar E, Bateman R, et al. A surface on the androgen receptor that allosterically regulates coactivator binding. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Oct 9;104(41):16074–9.
30. 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.* 2014 Feb 27;6(4):657–69.
31. McEwan IJ. Intrinsic disorder in the androgen receptor: identification, characterisation and drugability. *Mol Biosyst.* 2011 Dec 1;8(1):82–90.

32. McEwan IJ. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr Relat Cancer*. 2004 Jun 1;11(2):281–93.
33. Jenster G, Korput HAGM van der, Trapman J, Brinkmann AO. Identification of Two Transcription Activation Units in the N-terminal Domain of the Human Androgen Receptor. *J Biol Chem*. 1995 Mar 31;270(13):7341–6.
34. Holterhus P-M, Werner R, Struve D, Hauffa BP, Schroeder C, Hiort O. Mutations in the amino-terminal domain of the human androgen receptor may be associated with partial androgen insensitivity and impaired transactivation in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc*. 2005 Sep;113(8):457–63.
35. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat J-P, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet*. 2012 Jun;44(6):685–9.
36. Trapman J, Dubbink HJ. The role of cofactors in sex steroid action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Sep;21(3):403–14.
37. Dubbink HJ, Hersmus R, Verma CS, van der Korput HAGM, Berrevoets CA, van Tol J, et al. Distinct recognition modes of FXXLF and LXXLL motifs by the androgen receptor. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2004 Sep;18(9):2132–50.
38. van de Wijngaart DJ, van Royen ME, Hersmus R, Pike ACW, Houtsmuller AB, Jenster G, et al. Novel FXXFF and FXXMF motifs in androgen receptor cofactors mediate high affinity and specific interactions with the ligand-binding domain. *J Biol Chem*. 2006 Jul 14;281(28):19407–16.
39. Elfferich P, Juniarto AZ, Dubbink HJ, van Royen ME, Molier M, Hoogerbrugge J, et al. Functional analysis of novel androgen receptor mutations in a unique cohort of Indonesian patients with a disorder of sex development. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol Sex Determ Differ*. 2009;3(5):237–44.
40. Jagla M, Fève M, Kessler P, Lapouge G, Erdmann E, Serra S, et al. A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits exclusively cytoplasmic actions. *Endocrinology*. 2007 Sep;148(9):4334–43.
41. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002 Jul 1;20(13):3001–15.
42. Lapouge G, Marcias G, Erdmann E, Kessler P, Cruchant M, Serra S, et al. Specific properties of a C-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2008;617:529–34.
43. Cottard F, Asmane I, Erdmann E, Bergerat J-P, Kurtz J-E, Céraline J. Constitutively Active Androgen Receptor Variants Upregulate Expression of Mesenchymal Markers in Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 May 2 [cited 2016 Apr 6];8(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3642121/>
44. Taplin M-E, Rajeshkumar B, Halabi S, Werner CP, Woda BA, Picus J, et al. Androgen Receptor Mutations in Androgen-Independent Prostate Cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J Clin Oncol*. 2003 Jul 15;21(14):2673–8.
45. Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015 Nov 5;163(4):1011–25.
46. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*. 2011 Feb 10;470(7333):214–20.

47. Martinez HD, Jasavala RJ, Hinkson I, Fitzgerald LD, Trimmer JS, Kung H-J, et al. RNA Editing of Androgen Receptor Gene Transcripts in Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31;283(44):29938–49.
48. Nishikura K. Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Dec;7(12):919–31.
49. Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:321–49.
50. Nishikura K. A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Feb;17(2):83–96.

## 2.3 *Matériel et méthodes supplémentaires*

### 2.3.1 **Test fonctionnel chez la levure**

#### 2.3.1.1 **Extraction d'ARN et transcription inverse (RT)**

Les ARN messagers (ARNm) totaux sont extraits à partir des échantillons de prostatectomie et de moelle osseuse à l'aide du kit Nucléospin RNAII de Macherey-Nagel (Hoerd, France) selon les instructions du fournisseur.

Des réactions de RT sont ensuite réalisées à partir de 400ng à 2µg d'ARN dans un volume final de 20µL en présence de 4 unités de transcriptase inverse Omniscript (kit RT Omniscript Qiagen, Courtaboeuf, France), 1x de tampon RT, 0,5 mM de chaque dNTP, 1µM d'amorce oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen, Fisher Scientific, Illkirch, France) et 10 unités d'inhibiteur de RNase (RNase OUT, Invitrogen, Fisher Scientific, Illkirch, France). Après dénaturation des ARN 5 min à 65°C et ajout du mélange de RT, la réaction est incubée 1h à 37°C, puis conservée à -20°C.

#### 2.3.1.2 **Amplification du fragment de RA**

Après cette étape de RT, un fragment du RA (1786pb, position 2315- 4101) est amplifié par PCR à partir d'ADNc de chaque échantillon tumoral et conservé à -20°C ou, en contrôle, à partir des plasmides pAR contenant un RA sauvage ou muté.

La réaction de PCR est réalisée à l'aide des amorces sens AR1 et antisens AR2 et en présence de 1,25 unités de polymérase Platinum Pfx, 2x de solution Enhancer, 0,3mM de chaque dNTP, 1mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,3µM de chaque amorce et 4µL de réaction de RT-PCR ou 100ng de plasmide cible. Le programme consiste en une première dénaturation (2 min. à 94°C) 30 cycles d'amplification (45 sec à 94°C, 45 sec à 55°C, 2 min 30 sec à 68°C), et une élongation finale de 5 min à 68°C. L'amplification est contrôlée par migration électrophorétique (gel d'agarose 0,8%). Les fragments sont ensuite purifiés et quantifiés par spectrophotométrie (Nanodrop 2000).

#### 2.3.1.3 **Transformation des levures**

Des aliquots de 50µL de levures ( $2 \times 10^9$  cellules/ml) sont transformés par la méthode LiAc/PEG avec 100ng de vecteur gap repair linéarisé, 100ng de fragment RA purifié et 100µg

d'ADN simple brin (ADN de sperme de saumon dénaturé, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les levures sont incubées 30min à 30°C puis 30min à 42°C. Après centrifugation, les culots de levures sont repris dans 400µL d'eau déionisée stérile. 100µL de levures sont ensemencés soit sur milieu sélectif seul (contrôle négatif sans ajout d'adénine), soit sur milieu sélectif additionné de l'hormone à tester. Les hormones sont testées aux concentrations de 10nM, 100nM, 1µM et 10µM. Après 72h d'incubation à 30°C, les colonies de levures formées sur chaque milieu sont comptées (logiciel Quantity One, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). A chaque test, un contrôle négatif sans récepteur (vecteur gap repair linéarisé seul) est inclus.

Si l'échantillon tumoral étudié contient des clones cellulaires exprimant un RA muté, le produit de PCR résultant sera un pool d'ADNc du RA sauvage et d'ADNc du RA muté. Ces fragments d'ADNc sont ensuite directement intégrés dans un plasmide d'expression de levure par recombinaison homologue après transformation des levures. Dans la levure ainsi transformée, il y aura alors expression d'un RA qui sera ou sauvage ou muté.

#### 2.3.1.4 Souche de Levures

Pour ce test, nous avons établi une souche de levure recombinante et androgéno-dépendante appelée EJ250, dont la croissance est conditionnée par l'expression du gène rapporteur *ADE2*. Ce gène code pour une enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'adénine. Les levures qui n'ont pas cette enzyme sont incapables de pousser sur un milieu de culture dépourvu d'adénine. Dans notre système, l'expression du gène *ADE2* est placée sous le contrôle d'un promoteur androgéno-dépendant contenant des éléments de réponse aux androgènes (AREs). Le gène *ADE2* est transcrit seulement si le RA exprimé dans la levure reconnaît le ligand que nous ajoutons dans le milieu de culture. Dans ce système, la croissance des levures dépend de l'affinité du RA qu'elles expriment pour le ligand ajouté au milieu de culture, et nous permet d'étudier in vitro le spectre de sensibilité du RA à différentes hormones stéroïdes et à différents agonistes et antagonistes de synthèse.

Deux cas de figure peuvent se présenter :

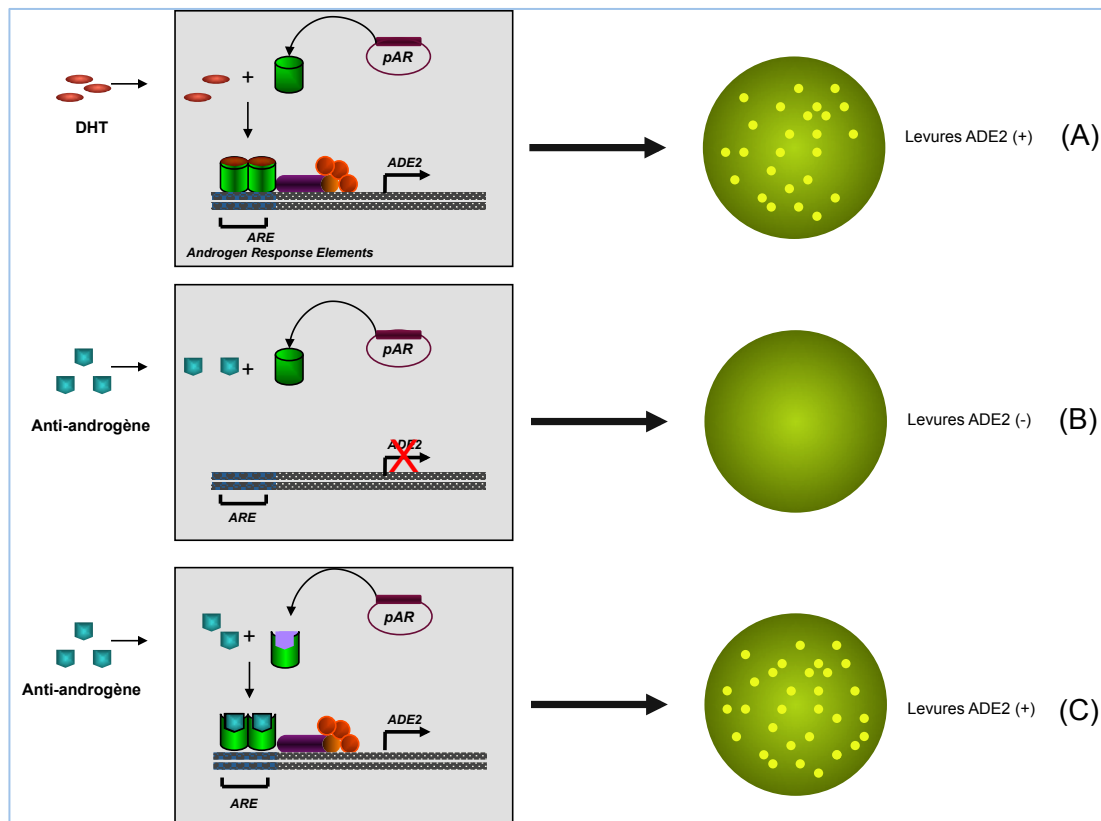
- **le RA exprimé dans les levures est sauvage** ; Il sera activé par son ligand naturel la DHT, mais aussi par quelques stéroïdes endogènes et va conduire à l'expression du gène *ADE2*. Les levures deviennent *ADE2+* et vont pouvoir pousser sur le milieu sélectif dépourvu d'adénine. Il y aura formation de colonies. En présence d'un antagoniste ou d'une hormone autre que les



ligands naturels, il n'y aura pas d'activation du RA sauvage et, par conséquent, pas d'expression du gène *ADE2*. Les levures restent ADE2- et ne poussent pas sur le milieu sélectif (Figure 13 (A) (B)).

- **le RA exprimé dans les levures porte une mutation** ; Si cette mutation modifie le spectre de sensibilité hormonale du RA, il y aura formation de colonies en présence de stéroïdes autres que ceux normalement reconnus par le RA sauvage, et voire même en présence d'un anti-androgène comme le flutamide dans le cas de la mutation T878A. (Figure 13 (C)).

**Figure 13** : Test fonctionnel chez la levure. (A) Profil d'un RA sauvage activé par la DHT. (B) Profil d'un RA sauvage en présence d'un anti-androgène. (C) Profil d'un RA muté reconnaissant un anti-androgène



### 2.3.1.5 Hormonogramme

Ce système permet d'établir un « hormonogramme », c'est à dire le profil de réponse d'un RA donné en présence de différentes hormones stéroïdiennes et de différents agonistes et antagonistes de synthèse. Nous pouvons ainsi isoler et caractériser des mutants du RA dans

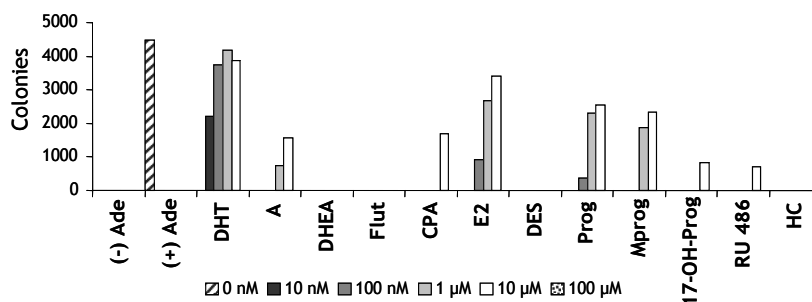
les cancers de la prostate avec l'avantage que le gène du RA soit localisé sur le chromosome X chez l'homme et soit par conséquent monoallélique. Les changements de propriété (spécificité, fonctionnalité) conférés au RA par la mutation peuvent ainsi être extrapolés au phénotype de la cellule ou du clone cellulaire qui porte cette mutation.

En cas de profil de réponse aux hormones atypique, comme par exemple la présence de colonies de levure en présence de l'anti-androgène flutamide, des colonies de levure ont été prélevées de la boîte en question afin d'en extraire le plasmide portant l'ADNc du RA muté, et d'identifier la mutation par séquençage (Figure 12).

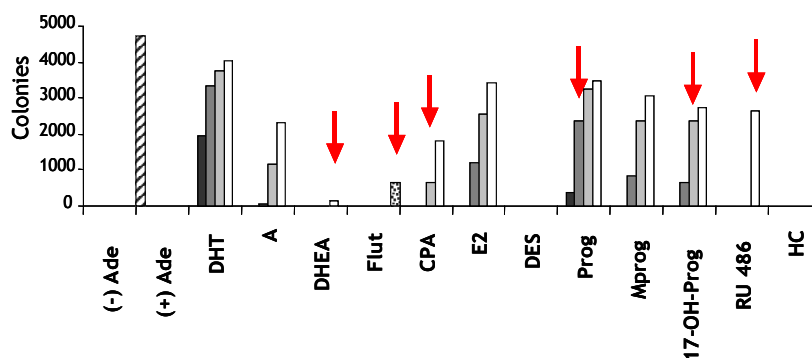
Cette technique nous permet à l'échelon moléculaire de repérer 1% d'ADNc muté dans 99% d'ADNc normal. La sensibilité de la technique à l'échelon cellulaire dépend bien sûr des facteurs impondérables que sont le degré d'expression du RA dans le clone cellulaire muté d'une part, et de la proportion de cellules non tumorales au sein de l'échantillon d'autre part.

**Figure 14 :** Représentation d'un hormonogrammes « sauvage » et atypique. Les histogrammes représentent le nombre de colonies de levure ayant poussées pour chaque condition expérimentale

### RA sauvage



### RA mutant T878A



### 2.3.2 **Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS.

Les estimations des survies sans récurrence ont été réalisées selon la méthode de Kaplan -Meier.

La comparaison des courbes de survie sans récurrence a été faite selon le test du Logrank. Les analyses univariées et multivariées ont été réalisées avec un modèle de Cox .

## 2.4 Résultats supplémentaires

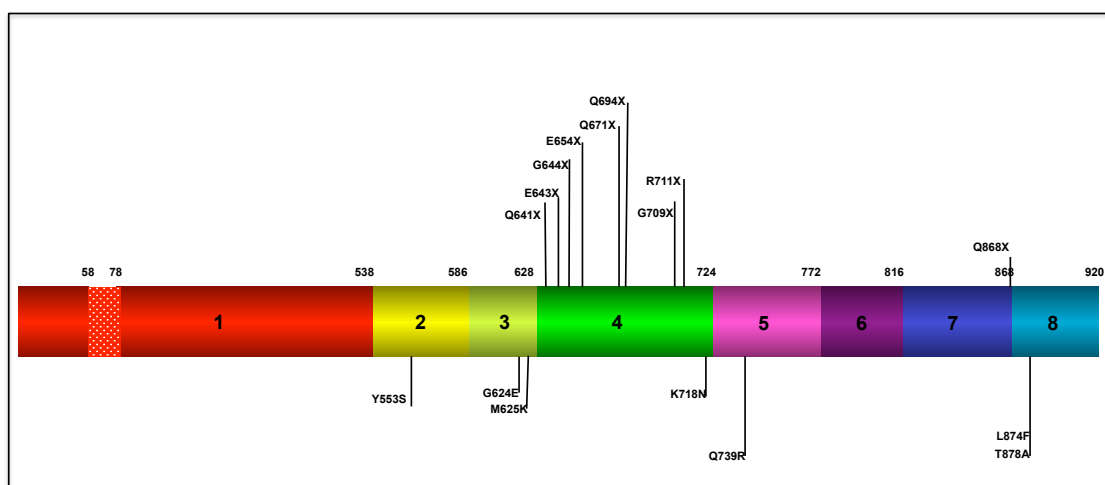
### 2.4.1 Fréquence, récurrence et signification physiopathologique

Nous avons détecté dans notre étude, un grand nombre d'échantillons tumoraux qui renfermaient plusieurs mutations. Cette observation témoigne de l'hétérogénéité tumorale avec la coexistence de plusieurs clones cellulaires. Cependant, nous ne pouvons exclure l'implication de l'amplification du gène du RA comme autre cause de coexistence de plusieurs mutants au sein du même échantillon. En effet plusieurs copies du gène du RA pourraient exister au sein de la même cellule et chacune de ces copies pourrait être le siège d'une mutation. Nous n'avons pas exploré cette possibilité, cependant seuls 1-2% des CaP localisés semblent surexprimer le RA <sup>112</sup>.

Par ailleurs, cette multiplicité des mutations du RA au sein d'un même échantillon, avec une moyenne de 8,4 mutations / échantillon, suggère l'existence d'une forte instabilité génétique et d'un phénotype mutateur.

La plupart des mutations de notre étude n'ont été détectées qu'au sein d'un échantillon unique. Leur caractère non récurrent suggère qu'elles ne confèrent qu'un faible avantage de prolifération et que certaines mutations ne sont que des mutations dites de passage. Cependant d'autres mutations sont récurrentes à la fois au sein de plusieurs clones du même échantillon tumoral, dans plusieurs échantillons différents de CaP localisés mais également au stade métastatique dans les échantillons de moelle osseuse (Figure 15).

**Figure 15 :** Représentation schématique des mutations récurrentes du RA à différents stades de la maladie (localisé, métastatique)

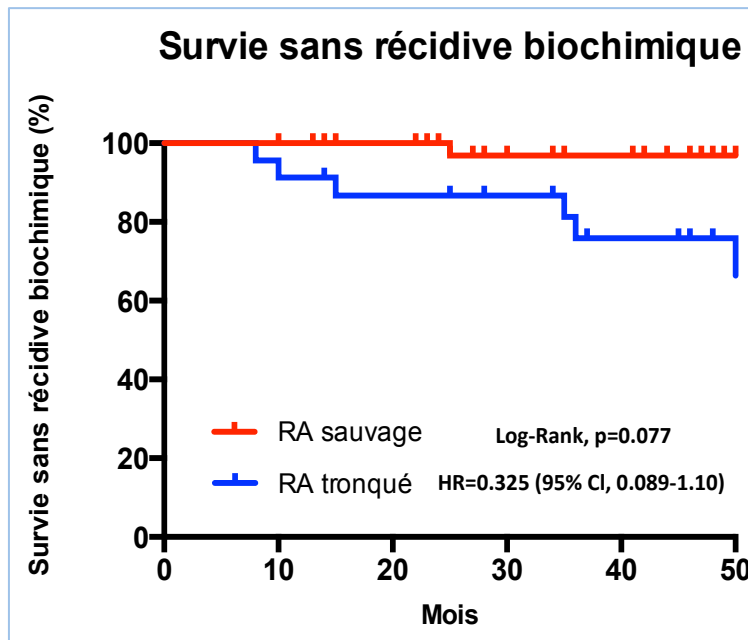


Ces mutations récurrentes retrouvées à différents stades de la progression des CaP indiquent que ces mutations procurent aux clones cellulaires un avantage prolifératif et qu'elles ne sont pas liées au hasard. L'analyse de la localisation de ces mutations récurrentes révèle que la majorité d'entre elles sont de type non-sens et se concentrent au niveau de la région charnière ainsi que de la partie proximale du LBD. Cette concentration de mutations au niveau d'une région très restreinte du gène du RA témoigne du rôle crucial joué par cette région.

#### **2.4.2 Mutations du RA et Impact pronostique :**

Après avoir identifié de nombreux variants tronqués du RA au sein des échantillons de CaP localisés, nous avons souhaité explorer l'impact pronostique potentiel des formes tronquées du RA. Pour cela nous avons recherché à savoir si la présence d'une mutation nonsense au sein de l'échantillon modifiait la survie sans rechute biologique. Pour cela nous avons réalisé une analyse de la survie sans récurrence biochimique à partir des patients pour lesquels nous avons établi le statut du RA avec certitude (N=54). Les courbes de survie réalisées par analyse de Kaplan-Meier en fonction de la présence d'une mutation tronquée du RA sont représentées en Figure 16. Malgré une différence de survie sans récurrence en faveur du bras RA sauvage, cette différence n'atteint pas le seuil de la significativité.

**Figure 16** Représentation de la survie sans récurrence biochimique après prostatectomie selon le statut du RA .



Les raisons de cette absence de significativité sont probablement multiples, dont le faible nombre d'échantillons analysés. De plus, malgré un recul médian de 46 mois (8-72mois) on observe qu'un faible nombre de récurrences biochimiques (N=14). L'hétérogénéité tumorale, qui sera abordé dans la 3<sup>e</sup> partie de ce travail, est également un paramètre qui a pu contribuer à nos résultats négatifs. Enfin, l'analyse a pu être biaisée par la présence de variants AR-V7, que nous n'avons pas recherchés. Plusieurs techniques sont actuellement disponibles pour identifier ces variants AR-V7 sur des échantillons paraffinés. Plusieurs études ont suggéré le rôle pronostic de la présence d'AR-V7 <sup>113</sup>. Nous avons voulu vérifier si la présence de mutation pouvait être un facteur pronostic indépendant de récurrence biochimique par une analyse univariée et multivariée.(tableau 6)

De manière non surprenante seule la présence de marges chirurgicales positives constituent un facteur de mauvais pronostic en analyse univariée, mais reste non significative en analyse multivariée. Le statut mutationnel semble associé à une augmentation du risque de récurrence mais qui n'est pas significative ni en analyse univariée ni en multivariée.

**Tableau 6 :** Facteurs pronostics associés à la récurrence biochimique. Une analyse univariée et multivariée selon un modèle de COX a été réalisée. Les marges chirurgicales envahies sont associées à un risque augmenté de récurrence biochimique en analyse univariée. Le statut mutationnel du RA n'est pas significatif.

Variable	Analyse univariée		Analyse multivariée	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b>Gleason</b>		0.242		
2-6	1		1	
7	0.41 (0.10-1.71)		0.25 (0.06-1.15)	0.076
8-10	1.54 (0.24-9.89)		0.48 (0.06-3.73)	0.486
<b>pT*</b>	//	0.413	//	//
<b>Marges chirurgicales</b>		0.029		
Saines	1		1	
Non saines	4.88 (1.15-20.66)		3.86 (0.80-18.55)	0.092
<b>Statut RA</b>		0.129		
RA sauvage	1		1	
RA muté	2.73 (0.70-10.6)		2.50 (0.50-12.47)	0.264

## 2.5 *Discussion et perspectives :*

Malgré les récentes avancées thérapeutiques, le CaP reste de par son incidence et sa mortalité élevée un réel défi quant à sa prise en charge thérapeutique. De nombreuses différentes voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse du CaP ont été explorées ces dernières années au travers de multiples essais thérapeutiques avec cependant des résultats assez décevants pour la plupart d'entre eux. De nombreuses molécules parmi lesquels l'atrasentan, le satraplatine, l'oblimersen ou encore plus récemment le bevacizumab ont connu un destin tragique. Une des principales raisons en est le manque de biomarqueurs prédictifs de réponse permettant de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier de ces nouvelles thérapeutiques ciblées.

Parmi les nombreuses cibles thérapeutiques potentielles, la voie de signalisation des androgènes a tiré son épingle du jeu. En effet, la voie des androgènes a été remise sous le feu des projecteurs avec l'arrivée de nouvelles molécules interférant avec la biosynthèse des androgènes comme l'acétate d'abiratérone ou encore la dernière génération d'anti-androgènes avec comme chef de file l'enzalutamide. Depuis la démonstration, par les travaux pionniers de Huggins et Hodges, de l'androgéno-dépendance des CaP, l'hormonothérapie demeure le traitement de référence des CaP lorsqu'ils ne sont plus accessibles à un traitement local. Cette stratégie thérapeutique visant à induire une privation androgénique permet d'obtenir une réponse thérapeutique dans près de 80% des CaP mais vient se heurter à un problème de taille : l'échappement hormonal.

Diverses stratégies, parmi lesquelles le blocage androgénique complet ou l'hormonothérapie intermittente, ont été développées pour contourner cet échappement hormonal mais sans succès. La résistance acquise à l'hormonothérapie a fait l'objet de nombreuses études biologiques et cliniques sans toutefois aboutir à une conclusion claire. Les mécanismes d'échappement hormonal sont en effet divers et complexes. De nombreux mécanismes d'échappement à la castration tels que l'augmentation de l'expression du RA, la modulation de l'expression de co-régulateurs, l'augmentation de sensibilité du RA par certaines phosphorylations, ou encore la modification du spectre de sensibilité du RA par des mutations restent des voies d'activation androgéno-dépendantes et donc potentiellement accessibles à des manipulations hormonales.

Parmi les différents mécanismes d'échappement hormonal décrits dans la littérature nous sommes focalisés au cours de ce travail sur l'émergence de mutations du RA, pierre angulaire de la voie de signalisation des androgènes. En effet, bien que de nombreuses études



se soient penchées sur le sujet il n'en demeure pas moins que l'origine, la fréquence et la signification exacte de ces mutations au cours de l'histoire naturelle des CaP restent débattues.

Nous avons pu démontrer par notre étude que les mutations du RA sont des événements précoces et non rares au stade localisé avec une fréquence atteignant 46%.

Un autre apport de la première partie de ce travail a été sans nul doute la description d'une nouvelle classe de RA tronqués pour leur région C-terminale incluant le domaine de liaison au ligand, présentant une activité transcriptionnelle constitutive, et donc par essence résistants à aux hormonothérapies de 1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> génération. Notre étude a permis de compléter la liste des mécanismes par lesquels le RA peut être impliqué dans l'échappement hormonal du CaP avec notamment la description d'innombrables nouvelles mutations du RA. Nos résultats soulèvent également d'innombrables questions : Quel est l'impact clinique et thérapeutique de ces mutations du RA au stade localisé ? Pourquoi une telle discordance entre nos résultats et ceux issus des dernières études de séquençage à haut-débit ? Quelques pistes ont été abordées dans la discussion de notre article. Cependant de nombreux efforts seront nécessaires pour tenter de répondre à ces questions. De nombreux projets sont susceptibles de découler de cette étude compte tenu de la nécessité de caractériser l'ensemble des mutations sur le plan fonctionnel afin de valider nos hypothèses.

L'identification de nouveaux variants du RA a permis d'améliorer les connaissances de la physiopathologie de l'échappement hormonal des CaP et permet d'ores et déjà de s'interroger sur la pertinence de certaines mesures visant à éviter la sélection et l'émergence de clones mutés au stade localisé, pour tenter de retarder l'évolution vers l'échappement hormonal.

Ainsi la détection précoce d'un clone muté stimuable par les anti-androgènes permettrait d'interrompre l'administration de cet agent et d'éviter la sélection positive de clones de spécificité élargie. De plus, la présence de certains mutants pourrait faire envisager un recours à un cocktail d'antagonistes différents permettant de diminuer la probabilité de voir émerger des clones susceptibles de s'adapter à l'ensemble des agents thérapeutiques administrés, ou l'association d'emblée à une chimiothérapie, pour retarder l'émergence de clones résistants à l'hormonothérapie. Plusieurs études sont actuellement en cours pour évaluer ces nouvelles stratégies thérapeutiques

A un stade plus évolué de la maladie, après échappement à la privation androgénique la recherche systématique de mutants du récepteur des androgènes et l'analyse de leur profil d'hormonosensibilité pourrait permettre :

- d'éviter de traiter un patient, chez lequel un clone mutant a émergé, par une molécule « agoniste » (anti-androgène, glucocorticoïde, progestatif) susceptible de stimuler la prolifération du clone pathologique
- d'interférer si possible avec la synthèse ou l'activité des agonistes endogènes responsables du soutien de la croissance tumorale
- de recourir à des antagonistes spécifiques des mutants considérés et le cas échéant à des thérapies ciblées comme des inhibiteurs de kinases activatrices du récepteur des androgènes ou encore des anti-angiogéniques.

Il convient toutefois de considérer que les mécanismes moléculaires de l'échappement hormonal des cancers de la prostate sont complexes et multifactoriels. Cette complexité couplée à la plasticité des RA et à la rapidité de l'émergence de nouveaux clones nous incite à rester prudent dans l'état actuel de nos connaissances quant aux implications thérapeutiques potentielles que l'on pourrait retirer de la recherche systématique de mutations du récepteur des androgènes.

### **3 Partie 2 : Formes tronquées du récepteur des androgènes et mécanismes d'angiogenèse**

### 3.1 **Introduction :**

#### 3.1.1 **Angiogenèse et Cancer :**

L'angiogenèse est un processus crucial impliqué dans la carcinogenèse et le développement des métastases <sup>114,115</sup>, et constitue l'une des principales caractéristiques des cellules cancéreuses décrites par Hanahan et Weinberg <sup>116</sup>.

L'angiogenèse tumorale correspond à la formation de néovaisseaux à partir de l'endothélium vasculaire préexistant destiné à répondre aux besoins métaboliques de la tumeur. L'essor de l'angiogenèse tumorale a commencé avec les travaux de Judah Folkman en 1971. Ce dernier partait d'un postulat simple: une tumeur a comme n'importe quel autre tissu besoin de nutriments et d'oxygène apportés par la circulation sanguine. La tumeur ne peut pas se développer au-delà de quelques millimètres cubes si elle n'a pas de vascularisation propre. En effet, les vaisseaux sanguins sont trop distants pour permettre l'arrivée d'oxygène et des nutriments nécessaires au développement tumoral par diffusion. Différents signaux, parmi lesquelles l'hypoxie, mais aussi l'activation d'oncogènes va aboutir à la sécrétion de nombreux facteurs proangiogéniques permettant le passage à une phase vasculaire à partir de laquelle la tumeur va pouvoir reprendre son expansion.

L'angiogenèse en situation physiologique est orchestrée par une grande variété d'activateurs et d'inhibiteurs qui sont en équilibre. Le déséquilibre de ce rapport va aboutir au switch angiogénique, étape fondamentale de l'angiogenèse, conduisant à la prolifération des cellules endothéliales, leur migration puis leur agencement en vaisseaux fonctionnels (figure 17). Contrairement à ce que l'on peut observer dans les phénomènes physiologiques, l'angiogenèse tumorale est caractérisée par une organisation anarchique ainsi qu'une perméabilité vasculaire accrue avec des parois fenêtrées ainsi qu'un recouvrement non optimal par les péricytes<sup>117,118</sup>. Cette structure désorganisée est responsable d'une vascularisation anarchique induisant l'apparition d'une hypertension interstitielle. L'ensemble de ces caractéristiques entraîne un défaut de perfusion de la tumeur qui limite la pénétration des molécules thérapeutiques<sup>117</sup>. De plus, la tumeur reste hypoxique malgré la néo-angiogenèse ce qui entraîne une surproduction continue du facteur de croissance des cellules endothéliales, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

Dans plusieurs cancers comme le cancer du poumon, le mélanome ou encore le cancer de la prostate, la densité microvasculaire est considérée comme un facteur de mauvais pronostic indépendant <sup>119,120,121</sup>. En effet, la néoangiogenèse tumorale facilite l'invasion des cellules tumorales <sup>122</sup> et favorise la dissémination métastatique.

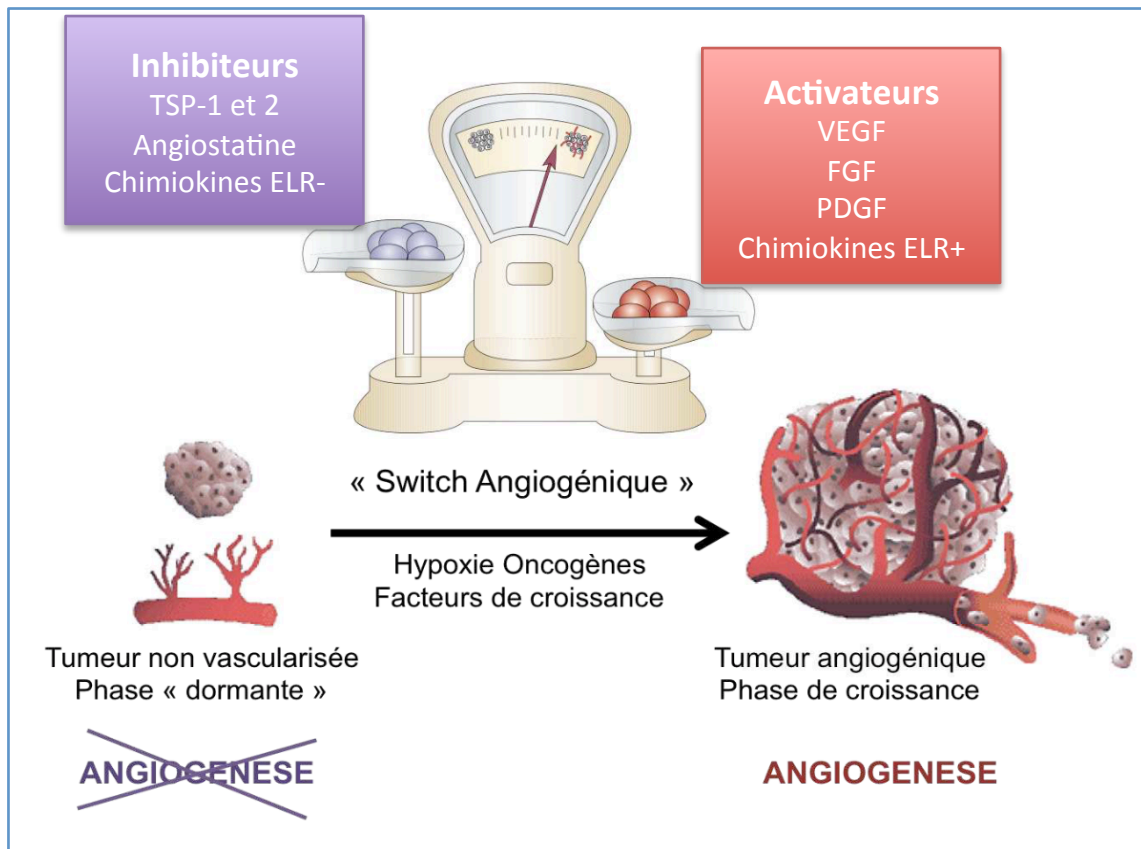


Figure 17 : Les principales étapes du « Switch Angiogénique » d'après Bergers et Benjamin<sup>117</sup>. L'hypoxie, certains oncogènes et facteurs de croissance favorisent la synthèse de facteurs pro-angiogéniques et inhibent celle des facteurs anti-angiogéniques. Le déséquilibre de cette balance en faveur des facteurs pro- angiogéniques active l'angiogenèse et favorise la croissance tumorale et la dissémination métastatique.

### 3.1.2 Mécanismes d'angiogenèse : du VEGF en passant par HIF

#### 3.1.2.1 Facteurs pro-angiogéniques

Le switch angiogénique résulte du déséquilibre entre inhibiteurs de l'angiogenèse (thrombospondine, angiostatine, endostatine) et facteurs proangiogéniques qui deviennent prépondérants. Ces facteurs pro-angiogéniques sont extrêmement nombreux et sont sécrétés non seulement par les cellules tumorales mais également par les cellules du microenvironnement tumoral. Parmi l'ensemble de ces facteurs les plus étudiés appartiennent à la famille du VEGF.

#### 3.1.2.2 VEGF

La famille du VEGF (Vascular endothelial growth factor) est une famille de glycoprotéines comprenant plusieurs membres : le VEGF-A, B, C, D et le PlGF (Placental Growth Factor).

Le principal médiateur de l'angiogenèse tumorale est le VEGF-A communément appelé VEGF. Il est impliqué dans la régulation de l'angiogenèse physiologique et pathologique par l'intermédiaire de sa fixation sur le récepteur VEGFR-2. Ce récepteur est donc considéré comme la cible principale des effets mitogènes, angiogéniques et inducteur de la perméabilité vasculaire du VEGF. Le VEGF-A se lie également au récepteur VEGFR-1 mais pas au VEGFR-3. L'activité induite par le VEGF peut être amplifiée par l'activation de deux corécepteurs, les neuropilines 1 et 2 (NRP-1 et NRP-2). Le VEGF est le prototype du facteur angiogénique dans des conditions physiologiques et pathologiques et constitue le facteur clé de la régulation de l'angiogenèse tumorale <sup>124</sup>.

##### 3.1.2.2.1 *VEGF-A: différentes isoformes*

Le gène du VEGF-A est situé sur le chromosome 6 et se compose de huit exons séparés par sept introns <sup>125</sup>. Un mécanisme d'épissage alternatif génère plusieurs isoformes en fonction de l'exclusion des exons 6 et 7. Les parties protéiques codées par les exons 6 et 7 sont responsables de l'adhésion du VEGF à la matrice extracellulaire et déterminent la biodisponibilité des différents variants. Ces isoformes sont nommées en fonction du nombre d'acides aminés de la protéine : VEGF 121, 145, 165, 189 et 206. Les formes majoritaires sont le VEGF121, 165 et 189.

L'activité de ces isoformes est variable ce qui permet une réponse biologique graduelle et contrôlée <sup>126</sup>. Cette différence d'affinité pour la matrice extracellulaire permet la formation d'un gradient spatial de VEGF. Le VEGF121 diffuse librement et agit sur de longues distances alors que le VEGF165 agit lui à distance et sur les cellules voisines. Enfin le VEGF189 lié à la matrice extracellulaire permet la mise en place de signaux à très courte distance. Le VEGF121 est considéré comme l'isoforme la plus tumorigène dans de nombreux cancers parmi lesquels le cancer du sein <sup>127</sup>, le cancer du colon <sup>128</sup> ou ce qui nous intéresse, le cancer de la prostate <sup>129</sup>.

L'augmentation du ratio VEGF121/VEGF165-VEGF189 dans les cellules de cancer de la prostate augmente la tumorigenèse *in vivo* suggérant un rôle important de cette isoforme dans la croissance tumorale. Ces résultats soulignent l'importance de l'expression relative des différentes isoformes de VEGF dans la régulation du développement des cancers de la prostate.

Le VEGF165 quant à lui semble jouer un rôle primordial dans les tumeurs colorectales, du sein, du poumon, du rein ou encore de l'ovaire.

#### 3.1.2.2.2 *Les récepteurs du VEGF-A*

L'action du VEGF-A passe par son interaction avec les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, récepteur à activité tyrosine kinase.

Le **VEGFR-1** se présente à la fois sous forme soluble et sous forme transmembranaire. Son rôle n'est pas très clair. L'affinité du VEGF pour ce récepteur est dix fois supérieure que pour le VEGFR-2. Cependant, la transduction du signal après liaison du VEGF est très faible <sup>130</sup>. Il pourrait donc piéger le VEGF et empêcher sa fixation sur le VEGFR-2.

Le **VEGFR-2** est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales et des progéniteurs endothéliaux circulants. La liaison du VEGF entraîne la dimérisation du récepteur et active différentes voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération, la migration des cellules endothéliales et favorise la perméabilité vasculaire <sup>130</sup>.

L'expression des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 et des corécepteurs NRP-1 et NRP-2 n'est pas limitée aux cellules endothéliales. Certaines observations suggèrent que l'expression des récepteurs à la surface des cellules cancéreuses et que le VEGF jouerait le rôle de facteur

de croissance autocrine sur les cellules tumorales. La fixation sur son récepteur entraîne la dimérisation, l'autophosphorylation et l'activation des voies de signalisation *RAS/RAF/MEK/ERK* («Extracellular signal Regulated Kinase») et *PI3K* («Phosphoinositide 3 Kinase») impliquées dans la prolifération, la survie et la migration des cellules endothéliales.

### 3.1.2.2.3 *La régulation de l'expression du VEGF par HIF*

Dans les conditions physiologiques, l'expression du VEGF est extrêmement contrôlée. L'expression anarchique des facteurs pro-angiogéniques et en particulier celle du VEGF entraîne la néo-angiogenèse tumorale. De nombreux facteurs contrôlent l'expression du VEGF comme l'hypoxie, la diminution du pH, les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance, les hormones, les oncogènes et certaines chimiokines<sup>109</sup>.

Même si l'induction d'expression la plus importante est observée après stimulation par des facteurs de croissance ou des oncogènes, la condition d'induction de VEGF la plus étudiée est l'hypoxie. Cette dernière régule la transcription, la stabilité et la traduction de l'ARNm du VEGF<sup>132</sup>. Le VEGF possède dans son promoteur un élément de réponse à l'hypoxie, HRE (Hypoxia Response Element). Cette séquence permet la transcription du VEGF en réponse à l'hypoxie par la fixation du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor). HIF-1 fonctionne sous la forme d'un hétérodimère, composé d'une sous-unité HIF-1 $\alpha$  dont l'expression est constitutive et d'une sous-unité régulatrice HIF-1 $\beta$  dont l'expression est régulée par l'hypoxie<sup>133</sup>. En normoxie, la demi-vie de HIF-1 $\alpha$  est extrêmement courte. La protéine VHL (Von Hippel-Lindau) possède une activité E3 ubiquitine ligase et cible HIF-1 $\alpha$  permettant ainsi sa dégradation par le protéasome<sup>134</sup>. En situation d'hypoxie, la protéine VHL est inactive et entraîne ainsi la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . La translocation dans le noyau et l'interaction avec HIF-1 $\beta$  entraîne l'activation de la transcription du VEGF en réponse à l'hypoxie.

Ce mécanisme permet le contrôle de la stabilité de la protéine en fonction de la concentration en oxygène et de réguler l'expression du VEGF en hypoxie. L'expression du VEGF en situation d'hypoxie n'est pas uniquement régulée au niveau transcriptionnel. En effet, en situation d'hypoxie, la transcription du VEGF n'est augmentée que de 3 fois alors que les quantités d'ARNm sont augmentées de 12 fois. Cette différence s'explique par une régulation de la stabilité de l'ARNm du VEGF et au niveau de la traduction de son ARNm<sup>135</sup>. L'expression du VEGF peut également être régulée indépendamment de l'hypoxie. Certains



facteurs de croissance et certains oncogènes peuvent via la voie de signalisation ERK induire la phosphorylation du facteur de transcription Sp-1, qui à son tour va activer la transcription du gène VEGF<sup>136</sup>. Même en réponse à l'hypoxie, l'expression de l'ARNm du VEGF peut être induite indépendamment de HIF<sup>137</sup>.

#### 3.1.2.2.4 *La régulation du facteur HIF*

Les facteurs de transcription HIF sont des facteurs hétérodimériques composés de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La réponse des cellules à l'hypoxie est majoritairement régulée par les facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2. Contrairement aux sous-unités  $\beta$  dont l'expression est constitutive, les sous-unités  $\alpha$  sont régulées par l'hypoxie. Ils régulent la transcription d'un grand nombre de gènes cibles, impliqués dans la réponse à l'hypoxie. Ces deux isoformes régulent un grand nombre de gènes en commun mais possèdent également des cibles plus spécifiques.

Le facteur HIF-1 $\alpha$  est le membre le plus étudié de la famille des facteurs de transcription HIF. La plupart des gènes dont l'expression est régulée par HIF possèdent dans leur promoteur une séquence régulatrice de type HRE. L'expression de HIF-1 $\alpha$  est induite à partir d'un pourcentage d'oxygène inférieur à 6% et est maximale à environ 0,5% d'oxygène. Dans des conditions d'oxygénation normale, l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$  entraîne sa poly-ubiquitinylation par la protéine VHL et sa dégradation par le protéasome. D'autres facteurs régulent l'expression de HIF-1 $\alpha$ . Des modifications post-traductionnelles régulent son activité. La phosphorylation de HIF-1 $\alpha$  par les MAPK joue un rôle important et augmente l'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$ <sup>138</sup>.

### 3.1.3 Angiogenèse et cancers de la prostate :

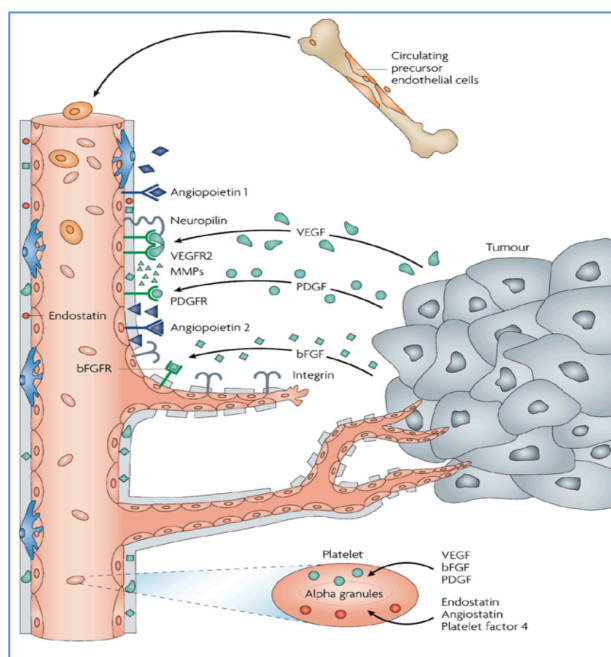
#### 3.1.3.1 Le rationnel scientifique

Dans le cancer de la prostate, le rôle de l'angiogenèse reste un débat controversé. De nombreuses données suggèrent que la densité microvasculaire est corrélée à l'expression de VEGF et/ou de FGF, au score de Gleason et constitue un facteur de mauvais pronostic indépendant<sup>139,140,141</sup>.

D'anciennes études avaient suggéré que la castration pouvait agir via une activité anti-angiogénique. Ainsi la castration pouvait avoir un double effet : direct sur les cellules épithéliales entrant alors en apoptose et indirecte par l'hypoxie créée induisant la destruction des vaisseaux liée à l'apoptose androgéno-dépendante des cellules endothéliales prostatiques<sup>142</sup>.

De manière plus récente le succès de l'acétate d'abiratéron et enzalutamide dans les CPRC avancés confirme que la voie de la signalisation RA et que son ciblage reste une stratégie efficace pour le contrôle des CPRCm. Il est admis que le RA est capable de moduler l'expression de nombreux gènes en interagissant directement avec des éléments de réponse aux androgènes spécifiques (AREs) dans les régions régulatrices des gènes cibles<sup>143</sup>, parmi lesquelles certains facteurs pro-angiogéniques. L'augmentation dose-dépendante de l'expression de FLT1 (FMS-tyrosine kinase apparentés 1) codant pour VEGFR-1 en présence d'androgènes suggère que FLT1 est un gène cible des androgènes, reliant la signalisation du RA à l'angiogenèse. L'expression de VEGFR-1 a été corrélée avec le score de Gleason élevé et la densité microvasculaire dans la néoplasie intraépithéliale de la prostate (PIN) et le CaP<sup>144,145</sup>. Les liens entre la voie de signalisation des androgènes et les mécanismes d'angiogenèse restent cependant peu compris. Les facteurs angiogéniques clés impliqués dans les CaP comprennent le VEGF, les angiopoïétines, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) (Figure 18)<sup>146,147,148,149</sup>.

L'expression du VEGF est augmentée par les androgènes, bien que le mécanisme moléculaire sous-jacent n'est pas clair. En effet, le promoteur du gène VEGF ne contient aucun élément de réponse aux androgènes, suggérant ainsi que l'expression du VEGF est androgéno-dépendante de par un mécanisme indirect. Plusieurs hypothèses ont été avancées en particulier une régulation passant par HIF-1 $\alpha$  ou encore Sp-1.



**Figure 18 :** Représentation des facteurs angiogéniques impliqués dans le CaP. D’après Folkman et al 2007

Des études réalisées en immunohistochimie ont montré que le VEGF, est surexprimé par une sous-population de cellules ayant des caractéristiques neuroendocrines<sup>150</sup>. Harper et al ont ainsi montré une corrélation significative entre le taux tissulaire du VEGF et le nombre de cellules exprimant la chromogranine A<sup>151</sup>.

### 3.1.3.2 Les données cliniques

Alors que les nouvelles thérapies ciblant la voie de signalisation du RA ont amélioré la survie globale dans les cancers de la prostate métastatiques résistant à la castration (CPRCm), les études de phase III évaluant des agents anti-angiogéniques dans ces mêmes CPRCm ont toutes manqué leur objectif principal<sup>152</sup>. La première étude de phase III a porté sur la combinaison entre le docétaxel, et le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF<sup>153</sup>. Alors que le survie sans progression a été améliorée dans le bras combinaison (9.9 mois versus 7.5 mois,  $p < 0.001$ ), aucune amélioration de la survie globale n’a été observée. Des résultats sensiblement similaires ont été obtenus avec la combinaison docétaxel et de l’aflibercept, qui se compose d’une partie du VEGFR-1 et VEGFR-2 ainsi que d’un fragment Fc d’immunoglobuline humaine. L’aflibercept est un récepteur-leurre à très haute affinité pour le VEGF-A et le Placenta Growth Factor (PlGF) qui empêche leur interaction avec les vrais récepteurs VEGFR-1 et 2 des cellules endothéliales<sup>154</sup>. D’autres études de phase III portant sur l’utilisation des agents anti-angiogéniques de type inhibiteurs de tyrosine kinase,

comme le sunitinib et le lénalidomide ont toutes été abandonnées pour futilité<sup>155,156</sup>. Enfin, malgré des données prometteuses issues d'une étude de phase II, le double blocage des voies de signalisation du VEGF et de c-MET par le cabozantinib, inhibiteur de la tyrosine kinase, n'a pas non plus atteint son objectif principal qui était l'amélioration de la survie globale. Il n'y a donc actuellement que peu d'espoir de voir apparaître dans les années à venir un anti-angiogénique dans les CPRCm.

La raison de ces échecs est sans aucun doute liée à l'absence totale de biomarqueur qui permettrait d'identifier les patients qui pourraient bénéficier de cette stratégie thérapeutique. La découverte récente de variants tronqués du RA pourraient-ils constituer ce biomarqueur tant attendu ? Nous avons voulu explorer cette hypothèse en étudiant le rôle des formes tronquées du RA dans la régulation de l'angiogenèse via le VEGF-A.

#### 3.1.4 Objectifs

Les formes tronquées du RA se caractérisent par une perte de la partie C-terminale du RA comportant le LBD, cible de la DHT et des anti-androgènes. L'étude récente d'Antonarakis et al. portant sur 62 patients a montré que la présence d'un variant tronqué, en l'occurrence le variant d'épissage AR-V7, dans les cellules tumorales circulantes (CTC) était associée à une résistance primaire aux molécules d'hormonothérapie de nouvelle génération comme l'enzalutamide ou l'acétate d'abiratéron.

La présence de formes tronquées semblent par ailleurs être associées à un plus mauvais pronostic et leur fréquence augmente au cours du temps avec une incidence maximale dans les formes de CPRCm.

Compte tenu de ces observations, il y aura sous peu un cruel manque d'alternatives thérapeutiques pour les patients qui expriment des formes tronquées du RA. Une meilleure compréhension des propriétés fonctionnelles de ces récepteurs tronqués est donc indispensable pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Par conséquent, ces patients résistant aux thérapeutiques de nouvelle génération, pourraient être orientés plus rapidement vers d'autres traitements plus appropriés. En raison de la fréquence élevée de ces formes tronquées du RA dans les CPRCm nous avons voulu étudier leur lien potentiel avec les mécanismes d'angiogenèse qui est une étape clé dans la progression métastatique. Pour ce faire nous avons étudié l'angiogenèse à partir d'un modèle *in vitro* de cellules LNCaP exprimant de manière stable un variant tronqué du RA, le variant RA-Q641X, avant de

valider nos résultats sur des échantillons de cancers de la prostate dans le cadre d'une étude translationnelle.

### 3.2 *Matériel et méthodes*

#### 3.2.1 **Cellules : LNCaP, HUVEC, LNCaP inductibles**

La **lignée LNCaP** (Lymph Node Cancer Prostate) clone FGC (Fast Growth Cells) est une lignée de cellules épithéliales humaines du cancer de la prostate provenant de la collection ECACC (European Collection of Cell cultures, Royaume-Uni). Ces cellules dérivent d'une adénopathie métastatique sus-claviculaire gauche d'un patient âgé d'une cinquantaine d'années avec un diagnostic confirmé d'adénocarcinome prostatique métastatique. Cette lignée androgéno-dépendante exprime un RA portant la mutation T878A dans laquelle la thréonine en position 878 est substituée par une alanine. Cette lignée cellulaire possède du fait de son androgéno-sensibilité toute la machinerie enzymatique nécessaire pour l'étude de l'activation de la voie des androgènes. Ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté avec 100U/mL de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine, 2mM de L-Glutamine, 10mM de HEPES (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 1mM de sodium pyruvate (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Les **cellules HUVEC** (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)(Cambrex , Wakeville , MD , USA) sont des cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical. Les cellules sont cultivées dans du milieu 200 (Cascade Biologies ) supplémenté de 2mM de L-glutamine et de 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

La lignée de cellules **LNCaP « stable »** a été mise au point au sein du laboratoire en utilisant le système d'expression inductible à la doxycycline (Lentiviral Tet-On 3G Inducible Expression Systems, Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). Des clones stables de cellules LNCaP exprimant de façon inductible les différents variants tronqués du RA (AR-V7, Q641X) ont été établis d'après le protocole du fournisseur.

### **3.2.2 Milieu conditionné : Surnageant de cellules LNCaP**

Les LNCaP stables exprimant de manière inductible le RA sauvage (RA wild type, RA-WT), le RA tronqué (RA-Q641X) ou un plasmide vide (C3) sontensemencées dans une plaque 24 puits à une densité de  $5 \times 10^4$  cellules dans du milieu complet de LNCaP. Soixante-douze heures après, les cellules sont rincées au PBS et le milieu complet est remplacé par du milieu sans sérum (MSS). L'induction de l'expression du RA est obtenue par ajout de 20ng/ml doxycycline. De plus, 10nM de DHT ou le diluant (éthanol) sont rajoutés dans chaque puits. Après 72h de culture, le milieu de culture est récupéré, centrifugé à 1700 rpm pour éliminer les débris cellulaires. Ces surnageants de culture correspondent aux milieux conditionnés (MIC).

### **3.2.3 Test ELISA**

Le dosage du VEGF-A isoforme 165 dans les surnageants de culture des cellules LNCaP-RA-WT, LNCaP-C3, LNCaP-RA-Q640X et LNCaP-RAV7 a été réalisé par test ELISA (Human VEGF Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA) selon des instructions du fournisseur. L'ensemble des dosages a été réalisé en duplicat sur 3 expériences indépendantes.

### **3.2.4 RT-PCR quantitative en temps réel**

#### **3.2.4.1 Extraction des ARN totaux**

Les LNCaP stables exprimant de manière inductible le RA sauvage (RA wild type, RA WT), le RA tronqué (RA Q641X) ou un plasmide vide (C3) sontensemencées dans une plaque 24 puits à une densité de  $5 \times 10^4$  cellules dans du milieu complet de LNCaP. Soixante-douze heures après, le milieu complet est remplacé par du milieu sans sérum (MSS) additionné de 20ng/ml de doxycycline, de 10nM de DHT ou du diluant (éthanol). Soixante-douze heures après induction par la doxycycline, les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit total RNA isolation (Nucleospin RNA II, Macherey-Nagel, Hoerdt, France) conformément aux instructions du fournisseur.

#### **3.2.4.2 Synthèse de l'ADNc par transcription réverse**

La transcription réverse (RT) est réalisée conformément au protocole du fournisseur du kit Omniscript Reverse Transcription (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ARN des cellules LNCaP stables sont dilués de manière à avoir  $1 \mu\text{g}$  d'ARN dans  $13 \mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  « Rnase-free »

pour les LNCaP. Les ARN dilués sont ensuite dénaturés 5 min. à 65°C puis on ajoute 7µL de mélange réactionnel comprenant un tampon RT1x, 0,5mM de chaque dNTP, 1µM d'oligo dT, 0,5U/µL d'inhibiteurs de Rnase et 0,2U/µL de transcriptase inverse (Qiagen, Courteboeuf, France). Les mélanges sont incubés pendant 1 heure à 37°C puis les ADNc obtenus sont stockés à -20°C.

### 3.2.4.3 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel

L'ADNc des cellules LNCaP stables a été amplifié par le Lightcycler 480 (Roche Diagnostic, Meylan, France), en utilisant le kit Master SYBR Green qPCR. La PCR quantitative est réalisée dans un volume de 10µL en présence de 1µM d'amorces spécifiques du gène d'intérêt VEGF-A (QuantiTect® QT01682072) ou HIF1α (QuantiTect® QT3083664), 3µL d'H<sub>2</sub>O, de 5µL de réactif Light Cyler 480 SYBR Green I Master Mix et 1µL d'ADNc (200ng).

### 3.2.5 Test de formation de tube capillaire sur matrigel.

Afin d'évaluer la capacité des cellules endothéliales HUVEC à former un tube capillaire in vitro, du Matrigel (Geltrex LifeTech, Royaume-Uni) congelé appauvri en facteurs de croissance a été décongelé et 130µL ont été soigneusement déposés dans chaque puits d'une plaque à 24 puits pour recouvrir le fond de chaque puits. Après solidification du matrigel obtenue à 37°C pendant 30 min, 5x10<sup>4</sup> cellules HUVEC ont été déposées dans chaque puits. Les surnageants issus de cultures de LNCaP inductibles RAQ641X, C3, WT ont été déposés à raison de 200µL dans chacun des puits. Des expériences ont été réalisées en triplicat avec respectivement du surnageant pur et dilué au ½ dans du milieu de culture frais. Pour l'évaluation de la formation de tubes capillaires, les cellules endothéliales ont été laissées en contact avec le surnageant conditionné pendant une durée totale de 17h dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Des Photomicrographies du centre de chaque puits ont été capturées en utilisant un microscope Leica inversé (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Allemagne) après 17h d'exposition aux différents surnageant conditionnés (grossissement original, 200x). Une évaluation quantitative a été menée en mesurant la longueur totale des tubes capillaires dans quatre champs de chaque puits. Au cours des expériences, les cellules ont été constamment

maintenues à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Trois expériences indépendantes ont été réalisées en triplicata.

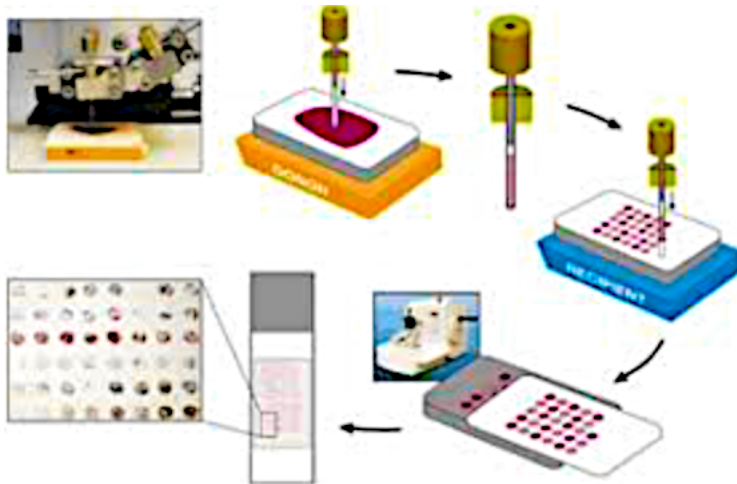
### 3.2.6 Tissue Micro-array - Construction d'un TMA

Pour construire un TMA, des carottes de tissus issues de blocs en paraffine sont sélectionnées à partir de coupes histologiques adjacentes (Figure 19). Les carottes mesurant de 0,6 à 4mm de diamètre sont ensuite incluses de manière orthonormée selon un plan préétabli dans un bloc receveur. L'appareil permettant cette opération est appelé « tissue arrayer ».

Le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Strasbourg a acquis un tissue arrayeur (Alphelis), pour réaliser des TMA à façon.

Le projet a consisté à construire un TMA spécifique de la cohorte d'adénocarcinomes prostatiques localisés. L'étape initiale consiste à regarder les lames histologiques correspondant à chaque bloc et à choisir les blocs ainsi que les zones d'intérêts à carotter. Trois carottes de tumeur et une carotte de tissu sain associé, de 1 mm de diamètre, ont été réalisées pour chaque cas, ce qui a permis d'obtenir deux blocs TMA

Les blocs ainsi obtenus ont été coupés au microtome pour réaliser des coupes de 4µm d'épaisseur qui ont été étalées sur des lames de verre superfrost.



**Figure 19** : Construction d'un tissue microarray (TMA)

#### 3.2.6.1 Protocole d'Immunohistochimie

Après déparaffinage et inhibition des peroxydases endogènes dans de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pendant 10 min, les lames ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-RA et anti-CD31 (Tableau 7).



Après rinçage, les coupes ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé, rincées 3 x 5 min avec du PBS, incubées avec le complexe Avidine-Biotine-Peroxydase (kit LSAB de MICROM). L'activité peroxydase a été révélée en présence de diaminobenzidine (DAB) (0,3mg/mL) pendant quelques minutes puis les lames ont été déshydratées et montées avec l'Eukitt. L'ensemble des analyses immunohistochimiques a été réalisé sur automate Ventana (Ventana Medical Systems, Arizona, USA). Des contrôles ont été réalisés en absence d'anticorps primaire afin de s'assurer de la spécificité de la réaction. Les lames ont été observées au microscope optique.

**Tableau 7** : Caractéristiques des anticorps primaires utilisés pour les analyses IHC sur TMA

Anticorps primaires	Fournisseur	Clone	Traitement	Dilution
RA	DAKO	AR441	Automate Ventana	1:25
CD31	TEBU	1A10	Automate Ventana	1:20

### 3.2.6.2 Mesure de la densité microvasculaire

L'étude de l'angiogenèse est réalisée par la mesure de la densité microvasculaire ou densité capillaire par quantification du nombre de capillaires après immunomarquage à l'aide des anticorps anti-CD31 dirigés contre les cellules endothéliales.

La densité microvasculaire a été évaluée en utilisant les critères de Weidner et al.<sup>157</sup> Les secteurs avec le plus grand nombre de microvaisseaux ont été identifiés par un pathologiste expérimenté. Toute cellule ou amas de cellules endothéliales nettement séparées de microvaisseaux adjacents, des cellules tumorales, et d'autres éléments du tissu conjonctif a été considéré comme un seul microvaisseau. Les microvaisseaux ont été comptabilisés dans un champ de 0,739 mm<sup>2</sup> à un grossissement de 200x. Au moins deux champs ont été analysés pour chaque tumeur.

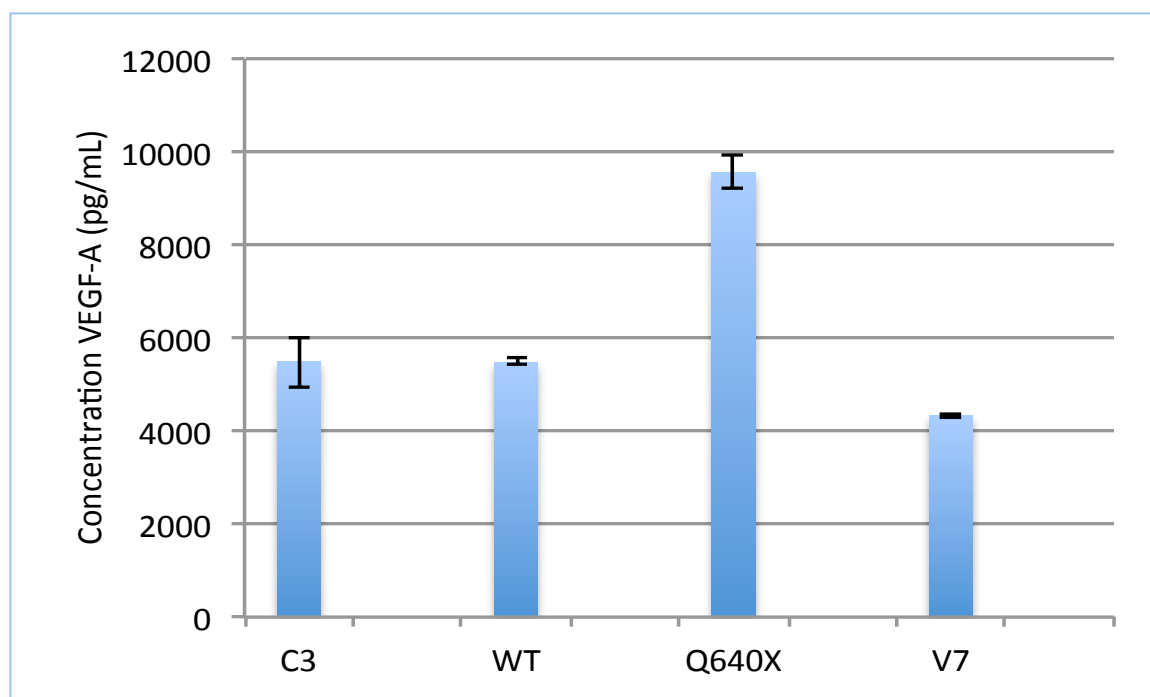
### 3.2.7 **Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism V.6 et SPSS1. Les comparaisons entre groupes ont été réalisées par un test du Chi2 ou un test de Student. Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne +/- écart-type.

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Augmentation significative des taux de VEGF-A en présence du variant RAQ641X

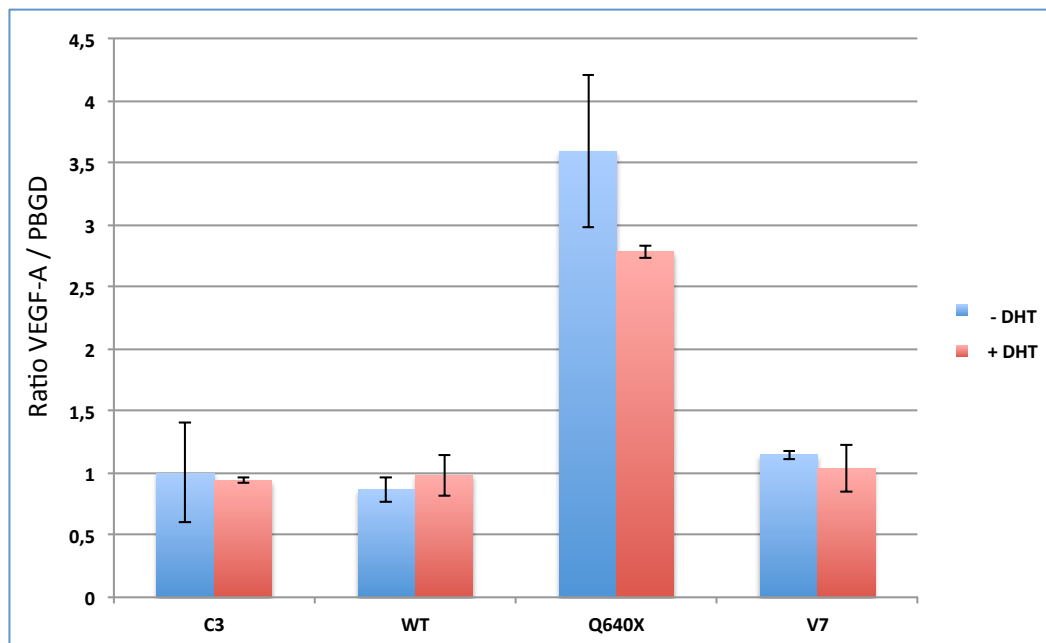
L'étude de la concentration du taux de VEGF-A dans les surnageants de cellules LNCaP stables RA-C3, RA-WT, RA-Q641X et RA-V7 a été réalisée par test ELISA. On observe une augmentation statistiquement significative du taux de VEGF-A dans le surnageant de cellules LNCaP exprimant le RA-641X en particulier en présence de DHT en comparaison aux conditions RA-WT ou RA-C3. Ces résultats suggèrent un lien entre un RA fonctionnel et la présence de VEGF-A dans le surnageant. L'augmentation particulièrement importante en présence de formes tronquées du RA suggère de plus un effet potentialisateur du RA-Q641X sur le VEGF-A. De manière surprenante l'augmentation du taux de VEGF-A ne s'observe qu'en présence du variant Q641X et non en présence du variant AR-V7. (Figure 20)



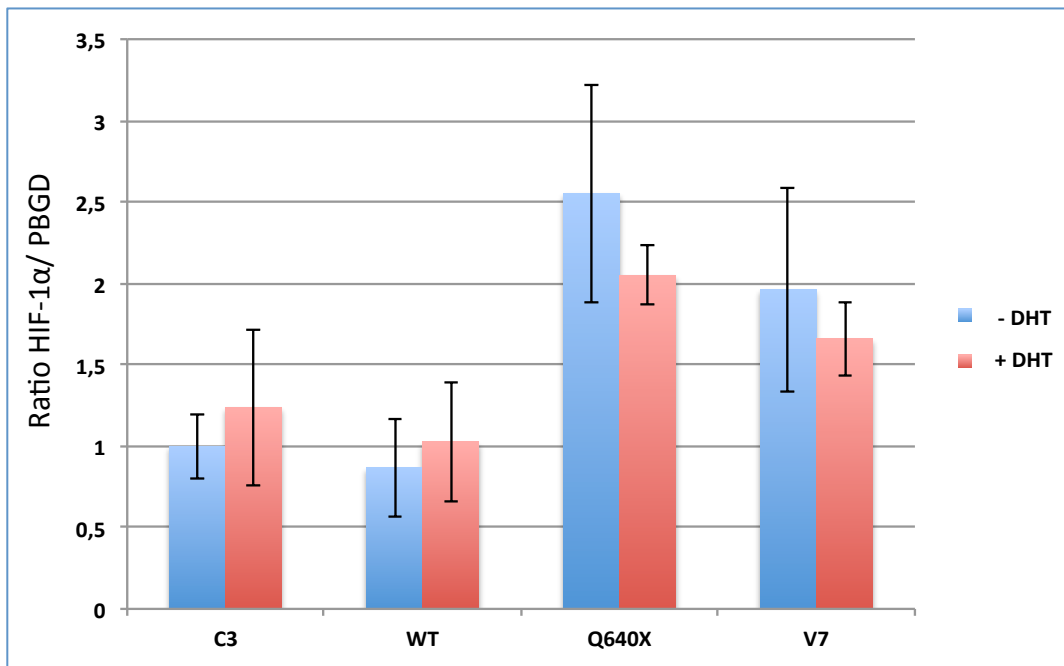
**Figure 20** : Concentration du VEGF-A déterminée par test ELISA dans le surnageant de cellules LNCaP exprimant différents variants du RA. Les valeurs sont exprimées en moyennes +/- écart-type. L'ensemble des expériences a été réalisé en duplicat sur 3 manipulations indépendantes. WT : RA sauvage ; C3 : plasmide vide ; Q640X : Variant tronqué RA-Q640X ; V7 : Variant d'épissage 7 du RA

### 3.3.2 Augmentation significative de l'expression du gène du VEGF-A et HIF-1 $\alpha$ en présence du RAQ640X et du RA-V7

Afin d'explorer les mécanismes moléculaires susceptibles de pouvoir expliquer l'augmentation du taux circulants de VEGF-A dans le surnageant de cellules LNCaP inductibles, nous avons réalisé des extractions d'ARN à partir des cellules LNCaP dans les mêmes conditions que celles ayant permis de recueillir les surnageants de culture. Les analyses en RTqPCR portant sur l'expression du gène codant le VEGF-A, révèlent une augmentation significative de l'expression du gène du VEGF-A en présence du variant RA-Q640X par rapport aux cellules LNCaP exprimant le RA sauvage (RA-WT) (Figure 21). Cette augmentation s'observe à la fois en présence et en absence de DHT. De manière surprenante on n'observe pas d'augmentation du taux de VEGF-A en présence du RA-V7. Ces données suggèrent que tous les variants tronqués, selon leur mécanisme d'origine, ne semblent pas partager les mêmes propriétés biologiques.



**Figure 21** : Représentation de l'expression du VEGF-A par les cellules LNCaP inductibles en RTqPCR. Augmentation significative de l'expression du VEGF-A dans les cellules de la lignée LNCaP exprimant le RA tronqué Q640X. Les cellules de la lignée LNCaP stables expriment les plasmides RA sauvage (WT), plasmide vide (C3) le variant d'épissage RA-V7 ou le variant tronqué RA-Q640X. Les expériences ont été réalisées pour chacune des conditions (C3, WT, Q640X, V7) en présence et en absence de DHT. Les valeurs sont exprimées en moyennes +/- écart-type. Trois expériences indépendantes ont été réalisées en triplicat.

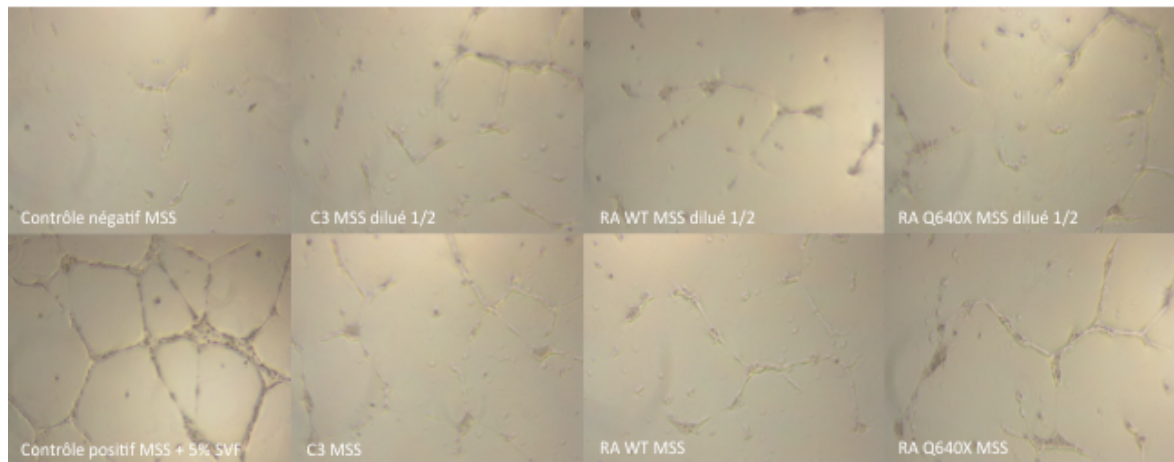


**Figure 22 :** Représentation de l'expression du HIF-1 $\alpha$  par les cellules LNCaP inductibles en RTqPCR. Augmentation significative de l'expression de HIF1 $\alpha$  dans les cellules de la lignée LNCaP exprimant le RA tronqué Q640X et ARV7. Les cellules de la lignée LNCaP stables expriment les plasmides RA sauvage (RA-WT), plasmide vide (C3) le variant RA tronqué V7 ou Q640X. Les valeurs sont exprimées en moyennes +/- écart-type. Trois expériences indépendantes ont été réalisées en triplicat.

Le gène du VEGF ne comporte pas d'éléments de réponse au RA, ce qui suggère que l'augmentation de l'expression du VEGF-A en présence du variant RA-Q640X se fait de manière indirecte. Deux hypothèses potentielles ont été rapportées dans la littérature : l'augmentation d'expression du VEGF-A pourrait passer soit par HIF-1 $\alpha$ , soit par Sp1. Nous avons voulu évaluer la première hypothèse selon laquelle l'augmentation serait directement liée à HIF-1 $\alpha$ . Pour ce faire, nous avons étudié l'expression de HIF-1 $\alpha$  en RTqPCR dans les mêmes conditions expérimentales que décrites précédemment. Les résultats présentés en figure 22 montrent une augmentation significative de l'expression de HIF-1 $\alpha$  en présence du variant RA-Q640X. Cette augmentation d'expression s'observe en présence tout comme en l'absence de DHT. L'augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  observée en présence du variant d'épissage AR-V7 est moins importante et d'interprétation plus délicate. Ces résultats suggèrent que l'augmentation d'expression du VEGF-A est secondaire à une augmentation de l'expression de HIF1 $\alpha$ . Compte tenu de ces résultats nous n'avons pas poursuivi les analyses concernant l'hypothèse Sp1.

### 3.3.3 Absence d'impact biologique de l'augmentation des taux de VEGF-A

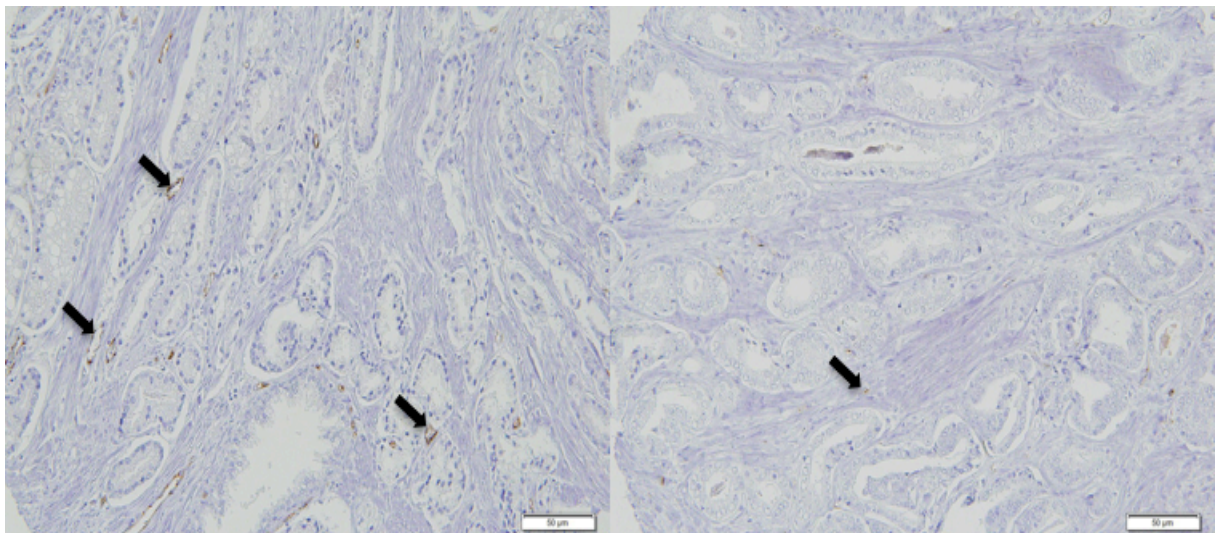
Afin de vérifier si l'augmentation de l'expression du VEGF ainsi que de sa concentration dans le surnageant de cellules LNCaP exprimant le RA-Q640X peut avoir un impact biologique nous avons étudié la formation d'un réseau vasculaire à partir de cellules endothéliales HUVEC sur du matrigel. Malgré l'utilisation de plusieurs conditions expérimentales et des résultats préliminaires encourageants, nos résultats finaux n'ont pas permis d'observer la formation de réseaux vasculaires par les cellules HUVEC en présence de surnageant de cellules LNCaP exprimant le RA tronqué Q640X. Bien qu'augmentée avec un ratio de 2 en présence du RA-Q640X, la concentration de VEGF-A n'a pas atteint le seuil à partir duquel il y a stimulation de l'angiogenèse avec formation de néovaisseaux. Les résultats iconographiques sont représentés en figure 23.



**Figure 23** : Représentation de la formation de réseaux vasculaires sur matrigel en présence de surnageant de cellules LNCaP inductibles exprimant un plasmide vide (C3), un RA sauvage (RA-WT) et un RA tronqué (RA-Q640X). Le contrôle négatif est constitué de milieu sans sérum (MSS) et le contrôle positif de milieu sans sérum avec 5% de sérum de veau foetal contenant du VEGF. Les expériences ont été réalisées avec du surnageant dilué au  $\frac{1}{2}$  puis du surnageant non dilué.

### 3.3.4 Corrélation entre densité microvasculaire et présence de formes tronquées du RA

Plusieurs études ont montré que la densité microvasculaire (DMV) constitue un facteur de mauvais pronostic dans les CaP localisés. Par ailleurs, nous avons mis en évidence dans notre modèle *in vitro* une association entre présence de formes tronquées du RA et surexpression du VEGF. Nous avons voulu évaluer l'existence d'une corrélation entre la présence d'une forme tronquée du RA et la DMV. Pour ce faire nous avons construit un TMA avec 43 échantillons de CaP localisés pour lesquels le statut du RA est connu. La DMV a été évaluée et corrélée à la présence de variant tronqués du RA. Le nombre moyen de vaisseaux est de 28/champ de 0.789mm<sup>2</sup> ce qui témoigne d'une faible DMV dans l'ensemble des prélèvements tissulaires examinés. Des exemples d'échantillons avec une DMV élevée et faible sont représentés en figure 24.

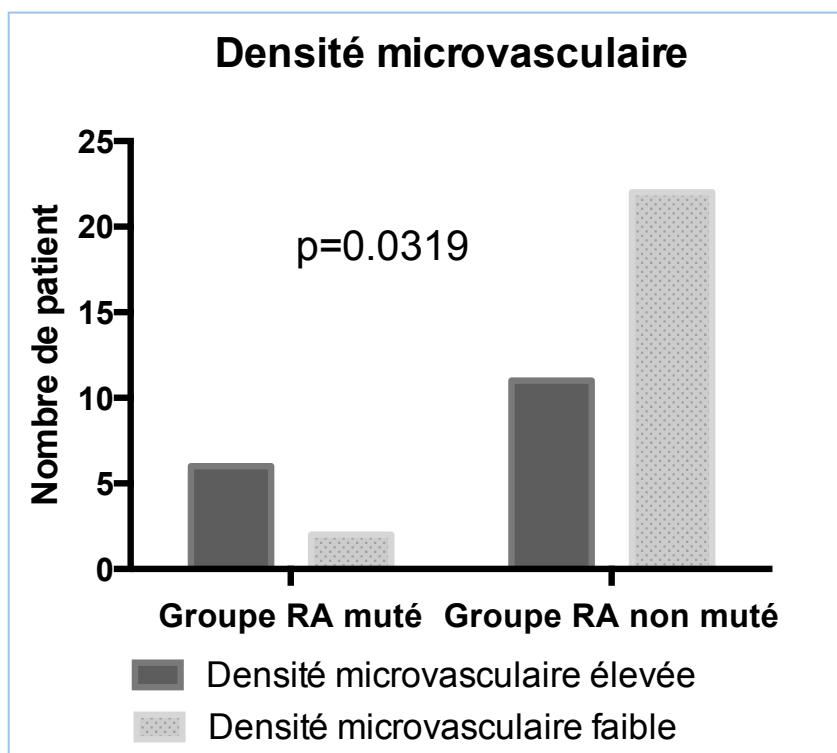


**Figure 24** : Représentation de la densité microvasculaire déterminée en IHC par marquage anti-CD31. (A) Echantillon de CaP sur TMA avec une DMV élevée (63/champ). (B) Echantillon de CaP sur TMA avec une DMV faible (12/champ) ; Marquage anti-CD31 marqué par la flèche.

En comparant la DMV des échantillons porteurs d'un RA sauvage avec ceux porteur d'un RA muté on observe une médiane de microvaisseaux de 19/champ versus 36/champ et une moyenne de 29/champ et 34.75/champ pour les échantillons respectivement sans et avec mutations du RA.

Afin d'étudier la corrélation entre RA tronqué et DMV, nous avons opté pour un cut-off à 28microvaisseaux/mm<sup>2</sup> pour séparer une DMV élevée (> 28/champ) et faible (< 28/champ mm<sup>2</sup>).

Les résultats de cette analyse de corrélation sont présentés en figure 25. Nos résultats suggèrent l'existence d'une corrélation entre la présence d'une forme tronqué du RA et une DMV élevée. En effet, 6/8 échantillons avec un RA tronqué présentent une DMV élevée. Afin de limiter le risque de biais lié au cut-off choisi nous avons refait les mêmes analyses en choisissant comme cut-off la médiane et les résultats restent identiques. (Résultats non présentés ; p=0.052).



**Figure 25 :** Représentation de la corrélation entre DMV et statut du RA. Le cut-off utilisé est de 28 microvaisseaux/champ de 0.789mm<sup>2</sup>. L'analyse de corrélation a été réalisée par réalisation d'un test du chi<sup>2</sup>.



### 3.4 *Discussion*

L'angiogenèse est un mécanisme primordial dans la dissémination métastatique de nombreux cancers y compris le cancer de la prostate. Malgré de nombreux efforts réalisés ces dernières années force est de constater que le ciblage de l'angiogenèse par de multiples thérapeutiques demeure un échec. La raison principale en est l'absence de biomarqueurs fiables permettant d'identifier une sous-population susceptible de pouvoir bénéficier de cette classe thérapeutique.

De nombreuses études ont tenté d'identifier divers biomarqueurs circulants ou tissulaires. Il a ainsi été supposé que les taux plasmatiques de VEGF et VEGFR-2 puissent constituer le biomarqueur idéal. Cependant bien que les concentrations initiales de ces variables semblent avoir une valeur pronostique, que leur taux circulant varie avec les inhibiteurs de la voie du VEGF, leurs concentrations plasmatiques ne sont en aucun cas des facteurs prédictifs de réponse aux antiangiogéniques<sup>158</sup>. D'autres recherches ont porté sur les cellules endothéliales circulantes et leurs précurseurs dérivés de la moelle osseuse. Bien que le nombre de cellules endothéliales diminue sous traitement antiangiogénique, la valeur de leurs concentrations sanguines avant toute initiation de traitement n'a pas pu être établie comme facteur prédictif de réponse aux thérapeutiques anti-angiogéniques<sup>159,160</sup>.

D'autres biomarqueurs tissulaires ont fait l'objet de nombreuses études tels que l'expression du VEGF et VEGFR-2 et la densité microvasculaire. Tous ont montré leur rôle pronostique sans jamais toutefois avoir démontré un quelconque intérêt prédictif<sup>161</sup>.

Les variants tronqués du RA jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de résistance aux molécules d'hormonothérapie dite de nouvelle génération<sup>105</sup>. Les variants d'épissage, avec en chef de file le variant AR-V7, ont été identifiés dans les formes localisées de cancers de la prostate et l'AR-V7 constitue à lui seul un facteur de mauvais pronostic indépendant<sup>162</sup>. De plus, il a été montré que les formes tronquées du RA s'accumulent avec l'évolution de la maladie et l'exposition aux thérapeutiques. L'incidence est ainsi augmentée dans les CaP d'emblée métastatiques et atteignent une fréquence maximale dans les CPRCm<sup>162</sup>. Il semble que les formes tronquées jouent un rôle primordial dans la dissémination métastatique et compte tenu du lien établi entre mécanismes d'angiogenèse et androgènes, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les formes tronquées puissent favoriser l'angiogenèse tumorale dans les CaP. A ce jour aucune donnée n'a été publiée montrant un quelconque lien entre les formes tronqués et l'induction de l'angiogenèse tumorale. Nos résultats montrent,

conformément aux données de la littérature que l'expression du VEGF est augmentée en présence de DHT <sup>163,164,165,166</sup>. Le mécanisme moléculaire qui induit cette augmentation d'expression du VEGF-A en présence d'androgènes reste débattu. En effet, la région promotrice du VEGF ne contient aucun élément de réponse aux androgènes (ARE) ce qui ne permet donc pas de régulation androgéno-dépendante directe du gène du VEGF. Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer la régulation du VEGF par les androgènes. Eisermann et al ont montré que la région promotrice du VEGF contient des sites de fixation pour le facteur transcriptionnel SP1 qui lui même est soumis à une régulation androgéno-dépendante <sup>167</sup>. Un blocage de SP1 ou de ses sites de fixation au niveau du promoteur du VEGF diminue l'expression de ce dernier en présence d'androgènes. Mabeesh et al ont quant à eux montré que la régulation de l'expression du VEGF par les androgènes pouvait passer par HIF1 $\alpha$ . En effet, l'expression d' HIF-1 $\alpha$  est augmentée en présence de DHT dans les cellules de la lignée LNCaP alors qu'elle ne l'est pas dans les cellules PC3 n'exprimant pas le RA. Cette augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  par les androgènes passerait par une boucle autocrine impliquant l'EGF qui active par sa fixation sur son récepteur la voie PI3K/protéine kinase B qui à son tour induirait l'expression de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ . Nos résultats sur l'expression de VEGF et HIF-1 $\alpha$ , suggèrent que l'augmentation d'expression du VEGF est la conséquence de l'augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$ . Cependant, il est à noter que les conditions expérimentales ont pu influencer l'expression d'HIF-1 $\alpha$  de par l'induction d'une certaine hypoxie.

Nos résultats montrent une surexpression du gène VEGF en présence du variant RA-Q640X par rapport au RA-WT en présence de DHT. Cette observation témoigne de l'existence d'une propriété spécifique et propre au RA-Q640X. Cette caractéristique est celle d'induire par un mécanisme encore inconnu l'expression du VEGF. Cette augmentation de l'expression du VEGF se traduit par une augmentation du taux de VEGF-A dans le surnageant de cellules LNCaP exprimant la forme tronquée RA-Q640X du VEGF avec un rapport de 2.5. De manière surprenant on n'observe pas ce phénomène avec le variant d'épissage AR-V7.

Cette différence suggère l'existence potentielle de propriétés spécifiques pour chacun des variants tronqués du RA qui se distinguent de par le mécanisme moléculaire dont ils sont issus, à savoir une mutation non-sens pour le variant Q640X ou un épissage alternatif pour le variant AR-V7.

L'augmentation de l'expression du VEGF ainsi que de sa concentration protéique dans le surnageant ne semble pas suffisante pour induire un effet biologique. En effet, aucun effet du

surnageant issu de cellules LNCaP porteuses de formes tronqués du RA sur la formation de réseaux sur nos test in vitro n'a pu être observé. Bien qu'aucun impact biologique n'ait pu être mis en évidence, ces résultats suggèrent l'existence d'un lien fort entre RA et les mécanismes d'angiogenèse. Le modèle *in vitro* est probablement imparfait malgré les avancées réalisées avec la constitution d'une lignée LNCaP stable inductible. De nombreux obstacles ont été rencontrés lors des différentes expériences utilisant initialement des cellules de la lignée LNCaP transfectées avec différents variants de RA puis les LNCaP inductibles, notamment des problèmes de reproductibilité. D'autres lignées cellulaires comme la lignée VCaP et 22Rv1 seraient intéressantes pour explorer l'impact des formes tronquées du RA résultant d'un épissage alternatif sur l'angiogenèse. En effet ces lignées cellulaires expriment des RA tronqués issus d'épissage alternatif<sup>100,104</sup>. Par ailleurs, afin de confirmer ou infirmer le rôle biologique potentiel des RA tronqués sur l'angiogenèse il serait nécessaire de passer à des expérimentations animales puis à des études translationnelles à partir d'échantillons tumoraux. C'est dans cet esprit que nous avons établi dès 2010 une collection d'échantillons tumoraux issus de pièces de prostatectomies radicales, de résections transurétrales de prostate ainsi que de biopsie de métastases viscérales et/ou ganglionnaires. Cette collection nous a permis d'explorer les hypothèses de travail issues des expérimentations in vitro. La mesure de la densité microvasculaire a ainsi pu être mesurée suite à la conception d'un « Tissue Microarray » (TMA) à partir des échantillons tumoraux pour lesquels nous disposons avec certitude le statut du RA.

De nombreuses études ont montré le rôle pronostique de la densité microvasculaire dans les cancers de la prostate. Par ailleurs il est clairement établi que cette densité microvasculaire est étroitement liée à la voie de signalisation du RA dans la mesure où les hormonothérapies diminuent la densité microvasculaire ;

Les résultats du TMA suggèrent l'existence d'une corrélation entre la présence d'une forme tronquée du RA et la densité microvasculaire élevée. Cependant, ces résultats certes positifs sur le plan statistique sont à interpréter avec la plus grande prudence.

En effet, la construction du TMA comporte des limites non négligeables, en particulier la représentativité tumorale. En effet, les secteurs tumoraux pour construire le TMA ont été sélectionnés au hasard et ne reflètent pas obligatoirement l'ensemble de la tumeur. Ce problème de représentativité est particulièrement marqué dans les CaP qui sont caractérisés par une forte hétérogénéité au travers de divers territoires de différenciation, et de leur caractère fréquemment multifocal.

Par ailleurs, le nombre de microvaisseaux reste très faible dans l'ensemble des échantillons analysés avec une moyenne de 28 microvaisseaux/champ de 0.739mm<sup>2</sup> et atteignant au maximum 62 microvaisseaux/champ, ce qui est loin de ce que l'on peut observer dans d'autres études. De nombreuses données concordantes de la littérature suggèrent le rôle pronostique de la densité microvasculaire. Cependant l'évaluation de la densité microvasculaire n'est pas chose aisée. De nombreuses études s'accordent à dire que le comptage des microvaisseaux présente une variabilité interobservateur. De plus il n'existe à ce jour aucun consensus sur les modalités de détermination de cette densité microvasculaire. Plusieurs anticorps peuvent être utilisés pour marquer les cellules endothéliales comme l'anticorps anti-CD31, anti-CD34 ou encore le facteur VIII<sup>168</sup>. De même le cut-off est très variable selon les études témoignant d'une forte hétérogénéité des résultats. Cependant un lien réel semble exister entre certaines formes tronquées du RA et les mécanismes d'angiogenèse. L'ensemble de nos observations nous encourage à poursuivre l'étude de cet axe de recherche. Par ailleurs des études translationnelles rétrospectives pourraient être envisagées à partir des banques d'échantillons obtenues dans le cadre des essais de phase III ayant exploré les antiangiogéniques dans les CaP métastatiques.

Si nos hypothèses de travail se confirmaient, cela permettrait d'identifier une sous-population de patients susceptibles de pouvoir bénéficier de thérapies antiangiogéniques en fonction de la présence ou non de certaines formes tronquées du RA.

**4 Partie 3 : Hétérogénéité tumorale et cancer de la prostate:  
Etude exploratoire a propos d'un cas**

#### 4.1 **Introduction:**

La prise en charge des cancers s'est considérablement améliorée ces 30 dernières années grâce au renforcement de l'arsenal thérapeutique. Cependant, la survie globale des patients a quant à elle relativement stagnée, ce qui a encouragé le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La recherche fondamentale et translationnelle ont permis une meilleure compréhension de la biologie des cancers. Au cours de la dernière décennie, le séquençage complet du génome humain et l'avènement de méthodes de séquençage à haut débit ont permis de grandes avancées dans notre capacité à identifier des altérations moléculaires dans les cancers individuels en particulier certaines aberrations clés impliquées dans la carcinogénèse<sup>169</sup>. Une profusion de données biologiques interconnectées, utilisant de nouvelles technologies qui explorent l'ADN, l'ARN, les protéines issues de cellules tumorales mais également du microenvironnement tumoral et / ou de l'hôte peuvent actuellement être générées à partir d'échantillons biologiques limités. Ces nouvelles technologies “-omiques” incluent le séquençage à haut-débit, les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ou la CGH (Comparative Genomic Hybridization), mais également l'analyse du transcriptome et la RPPA (Reverse Phase Protein Array).

L'ensemble de ces avancées ont ouvert la voie à la médecine personnalisée encore appelée médecine de précision (MP) définie comme “une médecine qui utilise les informations moléculaires et environnementales du patient (gènes, protéines) pour prévenir, diagnostiquer et traiter”. La MP s'impose ainsi comme une option attrayante dans la lutte contre le cancer avec des premiers succès obtenu au début des années 2000 avec l'imatinib dans les leucémies myéloïdes chroniques ou le trastuzumab dans les cancers du sein surexprimant le récepteur HER2. Cependant plusieurs obstacles de taille restent à surmonter parmi lesquels l'existence d'une hétérogénéité tumorale. L'étude de cette hétérogénéité tumorale est indispensable pour guider nos approches thérapeutiques notamment dans le contexte actuel de médecine personnalisée. De nombreux efforts sont désormais déployés pour une meilleure compréhension de cette hétérogénéité tumorale.

Depuis longtemps, on sait que le cancer résulte d'un processus complexe d'expansion clonale, de diversification génétique et de sélection clonale au sein d'un microenvironnement défini. Les innombrables interventions thérapeutiques itératives que l'on exerce induisent des contraintes entravant l'expansion clonale et sélectionnant au cours du temps des clones

cellulaires de plus en plus résistants. Ce processus complexe à la fois sur le plan spatial et temporel est à la base de l'hétérogénéité tumorale. On observe dans le temps et l'espace une accumulation des aberrations génomiques liée à l'altération des mécanismes de réparation de l'ADN. Il en résulte une adaptation des cellules cancéreuses à l'évolution de leur microenvironnement. Par ailleurs, une sélection « naturelle » s'effectue avec une expansion des cellules qui présentent des anomalies génomiques leur conférant un avantage prolifératif et de survie. L'objectif de la 3<sup>e</sup> partie de ce travail de thèse a été d'étudier cette hétérogénéité tumorale et l'évolution clonale du cancer de la prostate (CaP) à partir d'un cas patient par une approche de séquençage à haut-débit.

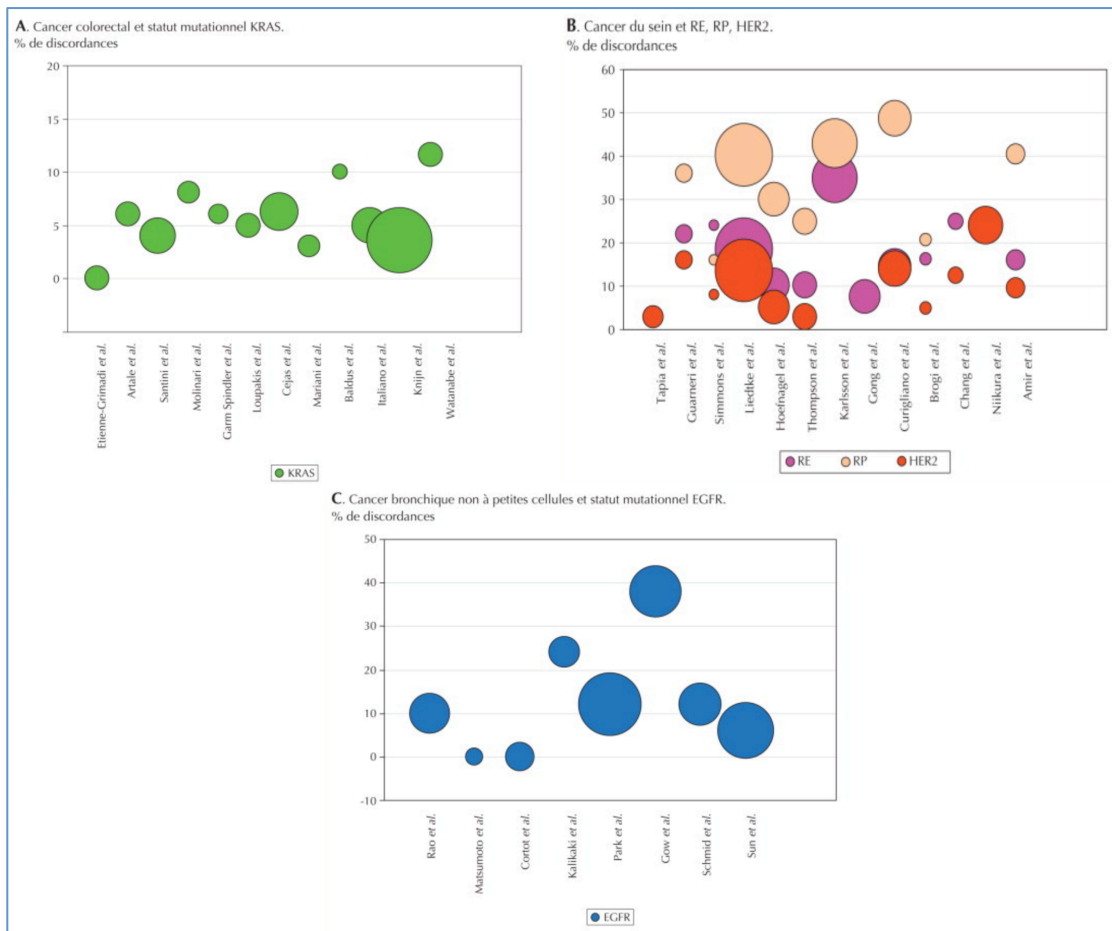
#### **4.1.1 Hétérogénéité tumorale : de l'immunohistochimie à la biologie moléculaire**

##### **4.1.1.1 Hétérogénéité tumorale phénotypique**

Il est possible d'identifier sur le plan anatomopathologique des sous-types histologiques de cancers qui se caractérisent par des évolutions cliniques et des pronostics distincts <sup>170</sup>. Cette hétérogénéité morphologique a été particulièrement étudiée dans les cancers du sein pour lesquels une classification anatomopathologique complexe a vu le jour avec l'identification d'une multitude de sous-types histologiques <sup>171</sup>. Pendant plusieurs décennies ce type de classification a permis d'apporter des informations pronostiques et guider la prise en charge thérapeutiques dans plusieurs cancers. Cependant ces classifications se sont vite avérées être imparfaites.

Au début des années 2000, les résultats concernant des biomarqueurs d'intérêt thérapeutique comme HER2 dans les cancers du sein, KRAS dans le cancer du colon ou EGFR dans les cancers du poumon non à petites cellules ont mis en lumière les discordances entre tumeur primitive et métastases sans savoir si elles n'étaient pas en rapport avec les conditions techniques d'évaluation des biomarqueurs. L'exemple le plus étudié porte sur l'évolution du statut hormonal et du statut HER2 au cours du temps dans le cancer du sein avec d'importantes discordances entre tumeur primitive et métastases. Des études similaires ont été menées sur le statut KRAS des cancers du colon ou encore le statut EGFR des cancers du poumon non à petites cellules (Figure 26)<sup>172</sup>.

**Figure 26 :** Représentation des études ayant étudié les discordances entre tumeur primitive et métastase. Chaque bulle représente une étude ; la taille de chaque bulle représente le nombre de patients dans l'étude. A. Etudes sur l'hétérogénéité de KRAS dans les cancers du colon. B. Etudes sur l'hétérogénéité du statut hormonal et HER2 dans les cancers du sein. C. Etudes sur l'hétérogénéité de l'EGFR dans les cancers du poumon non à petites cellules. D'après Vignot et al, 2013<sup>172</sup>



Cependant les résultats publiés sur les discordances tumeur primitive/métastases, ne rapportent que rarement des informations sur l'impact évolutif des variations observées. De plus, en l'absence d'informations cliniques comme les traitements antérieurement reçus par les patients, il n'est pas possible d'analyser si la discordance est liée à une évolution naturelle temporelle et spatiale du profil tumoral ou s'il peut s'agir de la sélection d'un profil tumoral sous l'exercice d'une pression thérapeutique<sup>173</sup>.



#### 4.1.1.2 **Hétérogénéité tumorale moléculaire**

Le développement des analyses moléculaires à haut débit a permis récemment d'aborder la problématique de l'hétérogénéité tumorale avec une vision plus globale en mettant en évidence des hétérogénéités moléculaires. De nombreuses études ont tenté de répondre à une question : l'hétérogénéité reflète-t-elle la capacité des cellules « souches » cancéreuses à s'engager partiellement dans un processus de différenciation, ou traduit-elle la présence de sous-populations cellulaires différentes de par leurs aberrations génomiques? Une des premières études à s'être intéressée à l'hétérogénéité intratumorale a été menée par Gerlinger et al dans le cancer du rein <sup>174</sup>. Dans cette étude conduite chez 4 patients atteints de carcinome rénal, des biopsies multiples ont été réalisées au niveau des tumeurs primitives et des métastases puis analysées par séquençage mettant alors en évidence une forte discordance entre les différents sites considérés, soulignant ainsi l'instabilité génétique au sein des lésions tumorales et proposant une reconstruction phylogénétique de la progression tumorale. Depuis, plusieurs études similaires menées dans bon nombre de cancers ont pu confirmer l'existence d'une hétérogénéité génétique intratumorale.

Il existe donc bien un certain degré de mosaïcisme tumoral dans les tumeurs solides. Chaque tumeur est ainsi unique, dans le sens où différentes tumeurs issues d'un même tissu peuvent avoir des caractéristiques moléculaires complètement différentes.

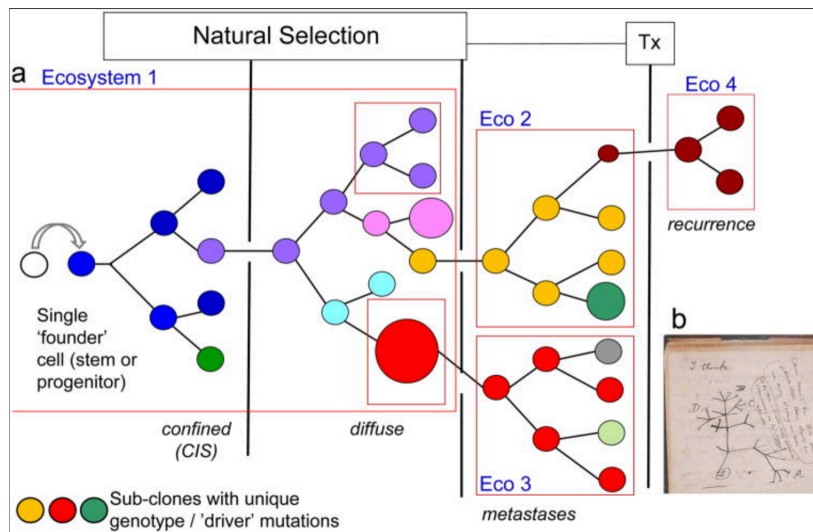
Deux explications ont été avancées pour rendre compte de cette diversité intratumorale <sup>175</sup>:

##### 4.1.1.2.1 *Concept de l'évolution clonale*

Selon le modèle d'évolution clonale proposé par Nowell en 1976, une tumeur cancéreuse a pour origine une cellule unique qui est la cible de multiples mutations la libérant des mécanismes physiologiques bloquant sa prolifération. Ainsi, la cellule subit des altérations génomiques successives qui lui confèrent un avantage sélectif suivi de périodes d'expansion clonale, qui aboutissent à la formation d'une tumeur maligne <sup>176</sup>. L'acquisition de nouvelles anomalies génomiques suit un phénomène dû au hasard selon lequel des mutations aléatoires sont constamment produites en raison d'une grande instabilité génomique. Intervient ensuite un phénomène de sélection naturelle de type Darwinien. Seule une minorité de ces mutations confère réellement des avantages prolifératifs à ces clones cellulaires (mutations « drivers ») et changent l'évolution de la tumeur aboutissant ainsi à la coexistence de différents clones à des temps différents. Selon cette théorie d'évolution clonale, la masse tumorale est conçue

comme un ensemble dynamique de plusieurs populations de cellules en voie de transformation ou déjà transformées, dont une population est majoritaire correspondant à celle en phase de dominance clonale. Trois variables sont importantes dans le modèle d'évolution darwinien : la taille de la population, le taux de mutations et la pression de sélection (figure 27).

**Figure 27** : Représentation de l'évolution clonale. D'après Greave et al, Nature 2012<sup>177</sup>



- (a) Représentation de l'évolution clonale. La pression de sélection thérapeutique permet à certains sous-clones cellulaires de se développer alors que d'autres disparaissent.  
 (b) Arbre d'évolution des espèces selon Darwin (issu de ses notes de 1837) ; Eco 1–4 (boîtes rouges) : différents écosystèmes / tissus ; Tx : traitement ; CIS : carcinome in situ.

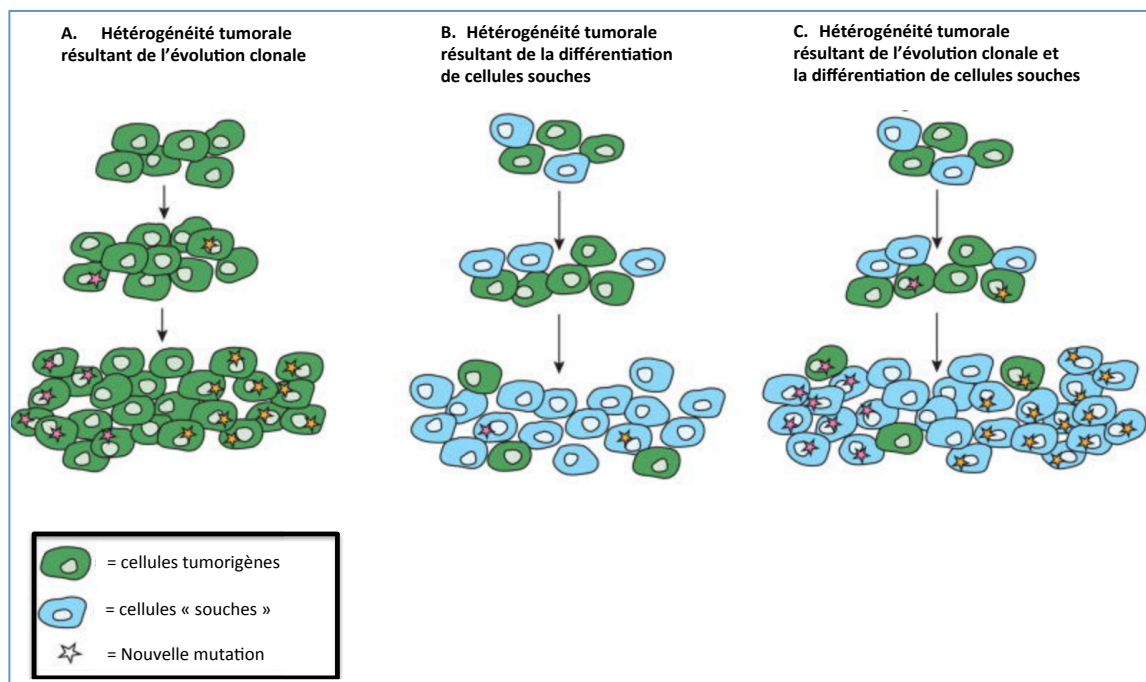
#### 4.1.1.2.2 *Concept de cellules souches*

Une autre explication a été avancée pour expliquer cette hétérogénéité intratumorale. Celle-ci implique l'existence de cellules « souches » cancéreuses (CSC) dont la capacité à donner naissance à différents types cellulaires contribuerait à la diversité phénotypique d'une même tumeur. Selon ce concept, seules les CSC seraient responsables de la progression de la tumeur. Cette population de cellules aurait des propriétés semblables à celles des cellules souches, à savoir la capacité d'autorenouvellement, de différenciation et de quiescence expliquant ainsi les rechutes tardives. La CSC peut ainsi se diviser de manière symétrique afin d'augmenter le nombre de CSC en générant deux CSC. Elle peut également se diviser de manière asymétrique permettant de générer une cellule progénitrice plus différenciée ainsi

qu'une CSC. L'auto-renouvellement assure ainsi le développement tumoral pendant que la différenciation conduit à l'hétérogénéité tumorale.

Pour autant, ce dernier modèle ne permet pas de comprendre la dynamique évolutive à l'origine de sous-populations de cellules malignes différentes par leur génotype. Il est actuellement admis que l'hétérogénéité est probablement la résultante des 2 modèles combinés. (Figure 28).

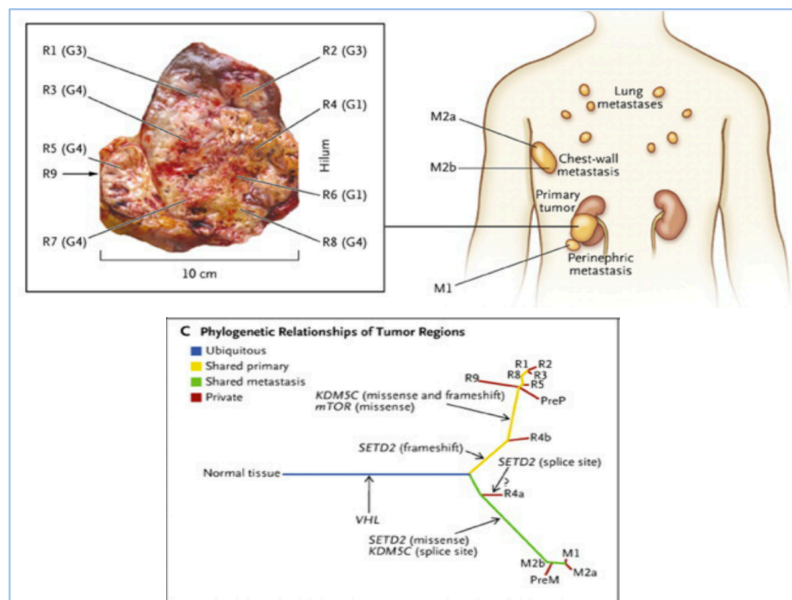
**Figure 28 :** Représentation schématique des concepts théoriques conduisant à l'hétérogénéité tumorale. A. Concept d'évolution ; B. Concept de cellules souches cancéreuses ; C. Hétérogénéité liée aux deux concepts. *D'après Meacham et al, Nature, 2013*<sup>175</sup>



#### 4.1.2 Hétérogénéité spatio-temporelle :

Au vu de l'ensemble de ces phénomènes dynamiques, on peut distinguer quatre types d'hétérogénéités génétiques : l'hétérogénéité intra-tumorale ; l'hétérogénéité inter-métastase ; l'hétérogénéité primitif-métastase et l'hétérogénéité inter-patient.

Ces différents types d'hétérogénéités ont été largement explorés par plusieurs études de séquençage à haut-débit. Des biopsies d'un même site tumoral peuvent ainsi montrer des caractéristiques moléculaires significativement distinctes. Gerlinger et al. ont montré dans leurs travaux l'existence d'une forte hétérogénéité entre la tumeur primitive et les différents sites métastatiques (figure 29)<sup>174,178</sup>. D'autres études ont également démontré des différences génomiques significatives entre les tumeurs primitives et les métastases<sup>179,180</sup>.



**Figure 29** : Représentation de l'hétérogénéité tumorale dans le cancer du rein par un arbre phylogénétique. D'après Gerlinger et al<sup>174</sup>

#### 4.1.3 Evolution phylogénétique

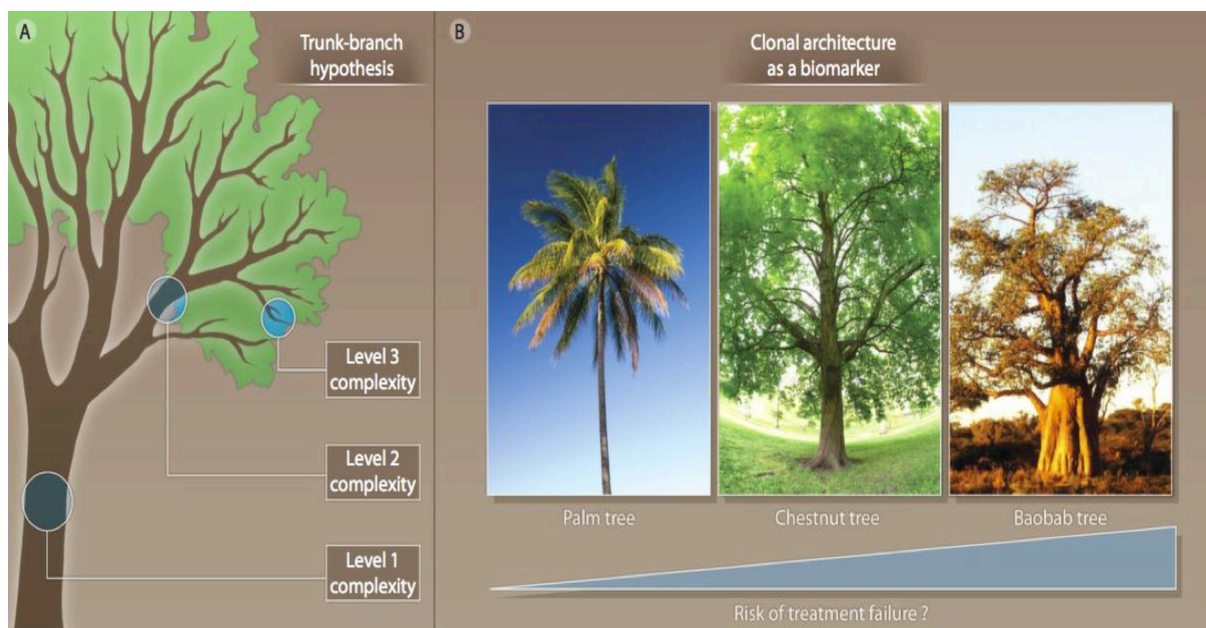
Toutes les sous-populations de cellules qui constituent la tumeur primitive mais également les métastases, présentent un lien phylogénétique entre elles puisque les cellules qui composent « la tumeur cancéreuse » ont en commun les mutations causales identiques. Parmi ces mutations on distingue les mutations qui contribuent au développement carcinologique, appelées « mutations drivers », par opposition aux mutations dites « passagers » ou neutres

qui surviennent au cours de la progression tumorale, mais qui ne confèrent aucun avantage sélectif<sup>169</sup>.

L'évolution phylogénétique est classiquement représentée par un arbre (figure 30) dans lequel les mutations ubiquitaires présentes au sein de toutes les cellules se situent au niveau du tronc. Au contraire, les autres altérations génomiques présentes uniquement dans certains clones représentent les branches de l'arbre<sup>181</sup>. On peut ainsi décrire trois niveaux de complexité:

- - Niveau 1 : le tronc porte des mutations « drivers » précoces présentes dans tous les sous-clones et toutes les régions tumorales ;
- - Niveau 2 : le tronc porte des mutations « drivers » précoces et les branches représentent des événements « drivers » de l'hétérogénéité issue de l'instabilité génomique ;
- - Niveau 3 : regroupe les deux premiers niveaux auxquels s'ajoutent des mutations « privées » au niveau des branches qui pourront devenir drivers sous la pression de sélection thérapeutique

**Figure 30** : Modèle arborescent d'hétérogénéité intra-tumorale. D'après Yap et al, 2012<sup>181</sup>. La longueur du tronc et celle des branches peuvent être corrélées au rapport entre le nombre d'altérations génomiques ubiquitaires d'une part et partagées et/ou privées d'autre part. Une tumeur type « palmier » présente ainsi de nombreuses mutations ubiquitaires contrairement à une tumeur type « marronnier » ou « baobab » qui présentent peu de mutations communes.



#### 4.1.4 Hétérogénéité tumorale et cancer de la prostate : un modèle dynamique

Par opposition aux autres cancers, le cancer de la prostate ne présente pas de nombreux sous-types histologiques à l'exception des rares cas de cancers de type neuroendocrine et de carcinome atypique intermédiaire récemment décrit par E.J Small et al à l'occasion du dernier congrès de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO 2015, *Abstract 5003*). Ces sous-type présentent des caractéristiques qui leur sont propres mais qui n'influencent que peu la prise en charge thérapeutique. Ainsi, le carcinome atypique intermédiaire est associé à une survie globale proche de celle des cancers neuroendocrines. De plus, il présente des caractéristiques cliniques intermédiaires entre les cancers neuroendocrines et les adénocarcinomes en exprimant le PSA, la NSE et la chromogranine, et présentant plus fréquemment des métastases viscérales.

Cependant malgré l'absence de diversité sur le plan des sous-types histologiques, le mode de présentation, l'évolution clinique ou encore l'aspect macroscopique des CaP est très variable. Ainsi, certains patients présenteront des CaP d'emblée métastatiques pendant que d'autres se présenteront avec des CaP localisés dont certains ne nécessiteront qu'une surveillance, d'autres seront guéris par un traitement local, alors qu'encore d'autres vont évoluer vers une forme métastatique voire un décès. De nombreux nomogrammes basés sur le stade clinique, le taux de PSA, le score de Gleason ont été développés pour tenter d'appréhender cette différence d'évolution clinique dans le but de mieux guider les stratégies thérapeutiques.

Sur le plan anatomopathologique, les CaP se caractérisent également par une hétérogénéité anatomique de par leur caractère multifocal. Cette caractéristique a ainsi conduit les anatomopathologiste à distinguer la tumeur principale dite « index » des tumeurs dites « satellites ». Cet aspect histologique ainsi que la nécessité d'établir un score de Gleason basé sur différents territoires reflètent bien l'existence d'une forte hétérogénéité tumorale.

Enfin, bien que les CaP vont tous, tôt ou tard, développer des résistances à la castration, les délais jusqu'à atteindre ce stade sont extrêmement variables et non prévisibles. Ce comportement clinique traduit également une hétérogénéité biologique extrême des CaP.

Il a fallu attendre ces dernières années pour que l'on s'intéresse réellement à l'hétérogénéité tumorale dans les CaP. C'est l'avènement des technologies de séquençage à haut-débit qui a permis ces 3 dernières années d'explorer les anomalies moléculaires des CaP dans le but d'identifier de nouveaux sous-types moléculaires et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques<sup>5,16</sup>. Dans le cadre de ces études, certaines ont étudié l'hétérogénéité tumorale

au stade localisé<sup>182</sup>, mais également dans les formes métastatiques principalement sur des séries autopsiques<sup>183</sup>

#### 4.1.5 Objectifs de l'étude :

La troisième partie de ce travail porte sur l'étude de l'hétérogénéité tumorale dans les CaP à partir d'un cas patient. A l'initiation du projet en 2013 peu de données étaient disponibles dans la littérature sur l'hétérogénéité tumorale dans les CaP. Une meilleure connaissance de l'hétérogénéité tumorale des CaP est indispensable à l'ère de la médecine personnalisée. En effet, de nombreuses études évaluent d'innombrables thérapies ciblées en se basant sur les anomalies génomiques détectées dans la plupart des cas à partir de tissus archivés de la tumeur primitive ou d'une métastase. Or l'hétérogénéité constitue un obstacle au développement de ces thérapeutiques dans les CaP.

Dans ce contexte nous avons voulu confronter les données d'hétérogénéité tumorale morphologique aux données de biologie moléculaire issues du séquençage à haut-débit. Dans cette dernière partie, nous avons étudié les différents aspects de l'hétérogénéité tumorale des CaP (tumeur primitive versus métastases osseuses/viscérales) par une approche de séquençage à haut-débit de l'exome (Whole Exome Sequencing, WES). La meilleure connaissance pour une tumeur donnée de son profil moléculaire et de son évolution dans le temps et l'espace permettra d'identifier des facteurs prédictifs de sensibilité/résistance aux agents thérapeutiques ou/et de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'objectif se veut être exploratoire dans le but d'émettre des hypothèses de travail pour l'élaboration d'un projet de recherche translationnelle de plus grande envergure.

## 4.2 *Matériel et méthodes*

### 4.2.1 **Collection des échantillons :**

L'ensemble des échantillons a été collecté à partir d'un même patient après signature d'un consentement éclairé. Les échantillons tumoraux ont été sélectionnés et prélevés à partir de la tumeur primitive, d'une adénopathie régionale, d'une métastase osseuse et d'une métastase hépatique. L'ensemble des échantillons ont été inclus en paraffine. De plus, un échantillon provenant de chacune des biopsies hépatique et osseuse a été immédiatement congelé et stocké dans de l'azote liquide à -80°C. A partir de chacun de ces échantillons, des zones d'intérêt de 5x5mm ont été sélectionnées en collaboration avec un anatomopathologiste qualifié et expérimenté. Une détermination du pourcentage de cellules tumorales a été réalisée afin de limiter la présence de cellules stromales. Cette évaluation du pourcentage de cellules cancéreuses au sein de chaque région tumorale sélectionnée a été réalisée par contrôle microscopique d'une coupe tissulaire colorée par l'hématoxyline-éosine.

### 4.2.2 **Protocole d'Immunohistochimie :**

Après déparaffinage, inhibition des peroxydases endogènes dans de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pendant 10 min, les lames sont incubées avec l'anticorps primaire. Après rinçage, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé, rincées 3 x 5 min avec du PBS, incubées avec le complexe Avidine-Biotine-Peroxydase (kit LSAB de MICROM). L'activité peroxydase est révélée en présence de diaminobenzidine (DAB) (0,3 mg/ml) pendant quelques minutes puis les lames sont déshydratées et montées avec l'Eukitt. L'observation des lames s'est faite au microscope optique à différents grossissements. Des contrôles ont été réalisés en absence d'anticorps primaire afin de s'assurer de la spécificité de la réaction. Les anticorps utilisés et leurs caractéristiques figurent dans le tableau 8.



**Tableau 8** : Caractéristiques des anticorps primaires

Anticorps primaires	Fournisseur	Clone	Traitement	Dilution
Pancytokérateine	DAKO	AE1/AE3	Automate Ventana	1 :100
PSA	DAKO	Polyclonal	Automate Ventana	1:200
Vimentine	DAKO	V9	Automate Ventana	1:100
Desmine	LEICA	NCL-DE-R-11	Automate Ventana	1:500
$\alpha$ -Actine	DAKO	1A4	Automate Ventana	1:100

### 4.2.3 Analyses de l'exome par séquençage à haut-débit

#### 4.2.3.1 Extraction d'ADN et séquençage de l'exome (WES)

L'ADN de chaque échantillon a été extrait séparément pour obtenir 3pg d'ADN génomique par échantillon (Qiagen, Valencia, CA, USA). Au cours de la préparation, la quantité d'ADN utilisée a été adaptée en fonction de sa qualité évaluée par PCR quantitative de façon à optimiser l'analyse des biopsies de moindre qualité. L'ADN extrait a été fragmenté, et des séquences adaptatrices ont ensuite été liguées aux extrémités de chaque fragment. Les fragments ont été hybridés sur des sondes spécifiques des régions d'intérêt. Le séquençage a été réalisé sur un HiSeq2500 Illumina.

#### 4.2.3.2 Mapping et alignement des séquences

Les « reads », ou séquences, correspondant à chaque fragment séquençé ont été alignés sur le génome humain de référence (humain, hg19, GRCh37) en utilisant BWA avec des paramètres par défaut. Les duplicatas de PCR ont été éliminés en utilisant PICARD MarkDuplicates de v1.67. Les séquences ont été réalignées localement par GATK (v2.6-4). Le score de qualité des bases a également été recalibré par GATK.

### 4.2.3.3 Calling et annotation des variants

Le « calling », ou identification des variants de types SNP et InDel (insertions et délétions) a été réalisée par GATK (module UnifiedGenotyper), qui utilise le modèle bayésien afin d'estimer simultanément les génotypes les plus fréquents et la fréquence allélique dans une population de N échantillons.

Les variants ont été annotés en utilisant snpEff. Afin d'identifier les variants faux positifs, plusieurs filtres ont été appliqués en utilisant GATK (module VariantFilteration). La liste exhaustive des filtres utilisés sont décrites dans les tableaux 9 et 10.

**Tableau 9** : Filtres appliqués pour les « single nucleotide variant » (SNV)

Name	Expression	Description
LowCovFilter	$\leq 20$	Depth of Coverage.
QDFilter	$< 2.0$	Quality by read depth.
MQFilter	$< 40.0$	Root Mean Square of the Mapping quality of the reads across all samples.
FSFilter	$> 60.0$	Phred-scaled p-value using Fisher's Exact Test to detect strand bias.
HaplotypeFilter	$> 13.0$	Consistency of the site with two (and only two) segregating haplotypes.
MQFilter	$< -12.5$	The phred-scaled p-value (u-based z-approximation) from the Mann-Whitney Rank Sum Test for mapping qualities.
ReadPosFilter	$< -8.0$	The phred-scaled p-value (u-based z-approximation) from the Mann-Whitney Rank Sum Test for the distance from the end of the read for reads with the alternate allele.

**Tableau 10** : Filtres appliqués aux insertion/délétions (InDels) de petite taille

Name	Expression	Description
QDFilter	$< 2.0$	Quality by read depth.
ReadPosFilter	$< -20.0$	The phred-scaled p-value (u-based z-approximation) from the Mann-Whitney Rank Sum Test for the distance from the end of the read for reads with the alternate allele.
FSFilter	$> 200.0$	Phred-scaled p-value using Fisher's Exact Test to detect strand bias.

#### 4.2.3.4 **Filtre des variants**

Afin de restreindre la liste des variants aux mutations probablement causatives, plusieurs filtres ont été appliqués. Seuls les variants identifiés avec bonne qualité ont été conservés, en excluant les variants annotés faux positifs et les variants avec un faible score de calling ( $GQ \leq 90$ ). Les variants fréquents dans la population (polymorphismes, i.e. présents dans dbSNP134) ont été filtrés, ainsi que les variants présents dans tous les échantillons (mutations germinales, erreurs techniques ou polymorphismes non connus). Les variants probablement non causatifs ont également été filtrés, comme les variants retrouvés dans les régions introniques et intergéniques, et les variants synonymes.

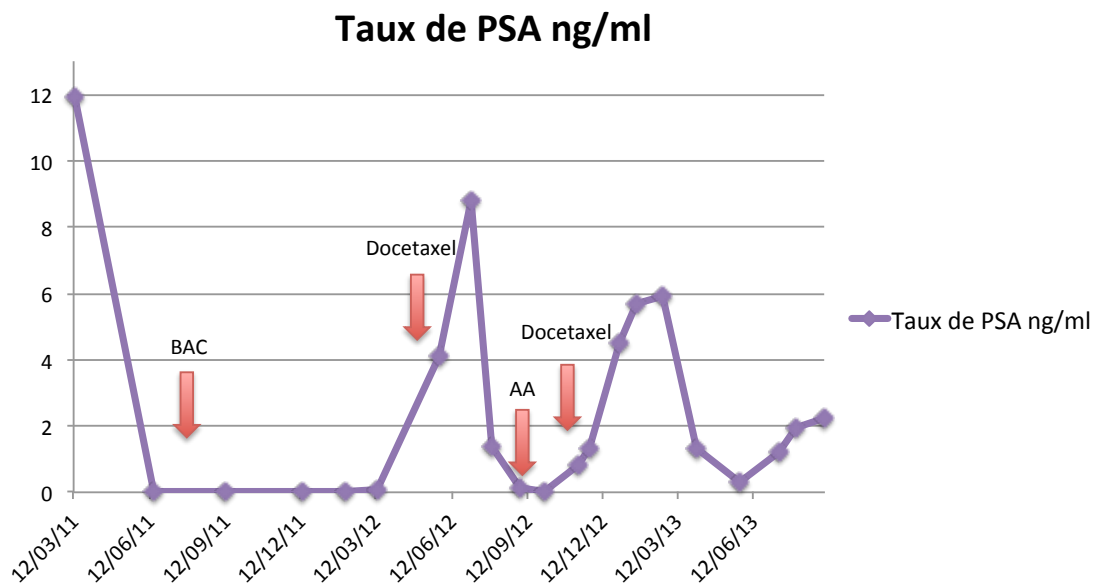
## 4.3 *Résultats*

### 4.3.1 **Données cliniques : caractéristiques du patient**

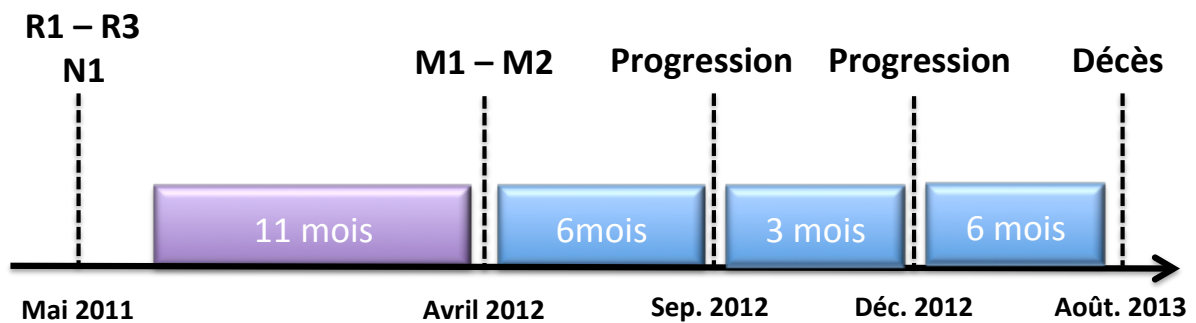
Les échantillons analysés sont tous issus d'un patient de 68 ans qui a été opéré le 16/05/2011 par une pelvectomie associant une prostatectomie radicale, une cystectomie, une exérèse du rectum ainsi qu'un curage ganglionnaire élargi pour un adénocarcinome de prostate classé T4 par atteinte du rectum et avec un envahissement ganglionnaire régional sur l'imagerie préopératoire. Le bilan d'extension à la recherche de métastases à distance a été réalisé en préopératoire et a été considéré comme négatif. Au total il s'agit d'un adénocarcinome de prostate classé T4N1M0 Gleason 4+3.

Le patient a présenté une récurrence biochimique précoce qui a conduit à la mise en route d'une hormonothérapie par blocage androgénique complet associant un antagoniste de la LHRH et du bicalutamide à 50 mg/jour à 3mois post-opératoire (PSA=0.017ng/ml). L'évolution du taux de PSA est présentée en figure 31. Le patient n'a pas présenté de réponse à l'hormonothérapie. En avril 2012, il présente une évolution métastatique osseuse et hépatique (PSA=4.10ng.ml). Une biopsie hépatique ainsi qu'une biopsie osseuse ont été réalisées avant tout début de chimiothérapie. Pour chaque site métastatique un échantillon a été conservé en paraffine et un échantillon a été congelé et stocké à -80°C. La chronologie des prélèvements réalisés et des traitements administrés est représentée en figure 32. La distribution anatomique des échantillons utilisés pour l'étude est représentée en figure 33.

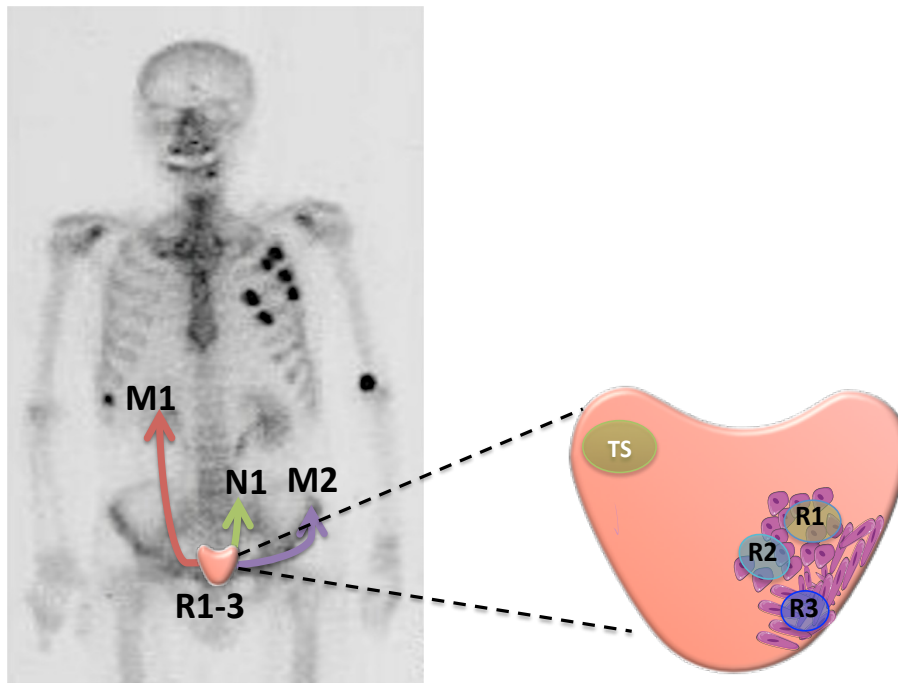
**Figure 31** : Evolution du taux de PSA. BAC : Blocage androgénique complet ; Docetaxel : chimiothérapie de 1<sup>e</sup> ligne métastatique ; AA : Acétate d'abiratéronne ;



**Figure 32**: Représentation de la chronologie des biopsies et traitements du cas patient. R1-R3 : régions de la tumeur primitive ; N1 : adénopathie métastatique; M1/M2 : Biopsie d'une métastase hépatique et d'une métastase osseuse de l'aile iliaque gauche



**Figure 33 :** Représentation spatiale des lésions métastatiques (M1, M2), de l'adénopathie (N1) et des trois régions de la tumeur primitive. TS : tissu sain (contrôle), R1-R3 : régions de la tumeur primitive ; N1 : adénopathie métastatique; M1/M2 : Biopsie d'une métastase hépatique et d'une métastase osseuse de aile iliaque gauche



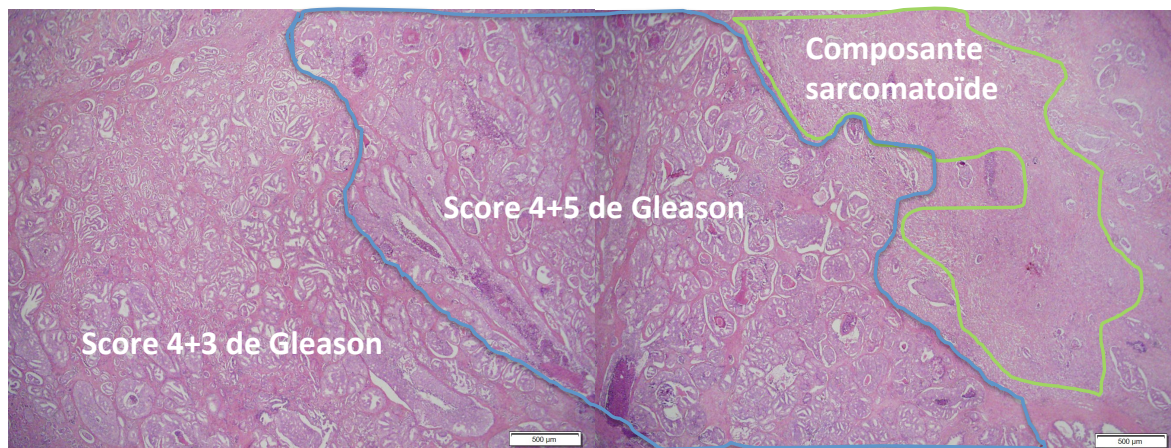
#### 4.3.2 Hétérogénéité intratumorale sur le plan anatomopathologique

L'examen anatomopathologique minutieux a été refait sur les différents échantillons et révèle sur le plan phénotypique une hétérogénéité majeure avec l'identification de plusieurs régions se caractérisant par des aspects cellulaires, nucléaires ainsi que des taux de prolifération distincts.

On observe au sein de la tumeur primitive une vaste région (R1), occupant 40% du territoire, constituée d'une prolifération adénocarcinomeuse peu différenciée, sans indifférenciation totale comportant de très nombreux aspects cribriformes dissociés dans un stroma fibreux dense. Cette composante déborde le parenchyme prostatique pour envahir la graisse périprostatique, les vésicules séminales et les canaux déférents. Le score de Gleason de ce territoire est évalué à 9 (5+4). Une région adjacente occupant 10% du territoire (R2) est quant à elle constituée de cellules adénocarcinomeuses avec une meilleure différenciation avec un score de Gleason estimé à 7 (4+3). Enfin au niveau de la région qui envahit le rectum (R3), on

observe un vaste territoire constitué d'une infiltration s'accompagnant d'une abondante nécrose et d'atypies pseudosarcomateuses avec des cellules fusiformes au niveau des fibres musculaires lisses de la paroi rectale. Cette composante va être dénommée sarcomatoïde et occupe 50% du territoire tumoral. Les trois régions distinctes sont représentées dans la figure 34.

**Figure 34:** Représentation anatomopathologique des trois zones morphologiquement distinctes constituant la tumeur primitive. Observation microscopique au grossissement 100X de lames colorées en hématoxyline et éosine. Visualisation d'un territoire de cellules adénocarcinomeuses classé Gleason 7 (R2), une zone de Gleason plus élevé estimé à 9 (R1) et un territoire de cellules fusiformes d'aspect sarcomatoïde (R3).



Le curage ganglionnaire élargi a permis l'analyse de 30 ganglions dont deux sont envahis au niveau iliaque externe droit et ilio-obturbateur gauche. L'analyse de ces ganglions révèle la présence de cellules adénocarcinomeuses moyennement différenciées. L'aspect morphologique est proche de celui observé dans les régions R1 et R2. Cette observation morphologique plaide en faveur d'une extension ganglionnaire de clones cellulaires issus des régions R1 et/ou R2 de la tumeur primitive.

L'analyse de l'échantillon hépatique révèle des cellules néoplasiques isolées, peu différenciées avec des noyaux hyperchromatiques et allongés, volumineux accompagné d'un très abondant stroma hyalin. Les cellules ont un aspect fusiforme. L'ensemble de ces caractéristiques phénotypiques est en faveur d'une métastase issue de la région sarcomatoïde (R3) de la tumeur primitive.

Le prélèvement osseux est constitué de lamelles d'os spongieux normalement habitées de leurs ostéocytes bordant des espaces médullaires occupés par une prolifération de

volumineuses cellules cuboïdes ou polyédriques, à noyau arrondi, ovalaire, nucléolé, entouré d'un abondant cytoplasme optiquement vide. Les cellules sont agencées en nappes ou en amas sans architecture particulière. L'ensemble des caractéristiques phénotypiques oriente vers une métastase d'adénocarcinome moyennement différencié issue de la région R1 ou R2 de la tumeur primitive.

Des analyses immunohistochimiques (IHC) ont été réalisées sur certains échantillons tumoraux (R2, R3, M1 et M2) afin de mieux les caractériser. Le résultat des principales analyses immunohistochimiques est représenté dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Résultats du marquage immunohistochimiques des différentes régions tumorales. R2-R3 : régions de la tumeur primitive ; M1 : Métastase hépatique ; M2 : métastase osseuse de aile iliaque gauche. L'intensité du marquage est représentée par + ou -.

Anticorps	R2	R3	M1	M2
<b>Pancytokératine (clone AE1/AE3)</b>	+++	-	-	+++
<b>PSA (polyclonal)</b>	-	-	-	-
<b>Vimentine (Clone V9)</b>	-	+++	+++	/
<b><math>\alpha</math>-actine muscle lisse (clone 1A4)</b>	/	+++	+++	/
<b>Desmine (clone NCL-DE-R-11)</b>	/	+	+	/

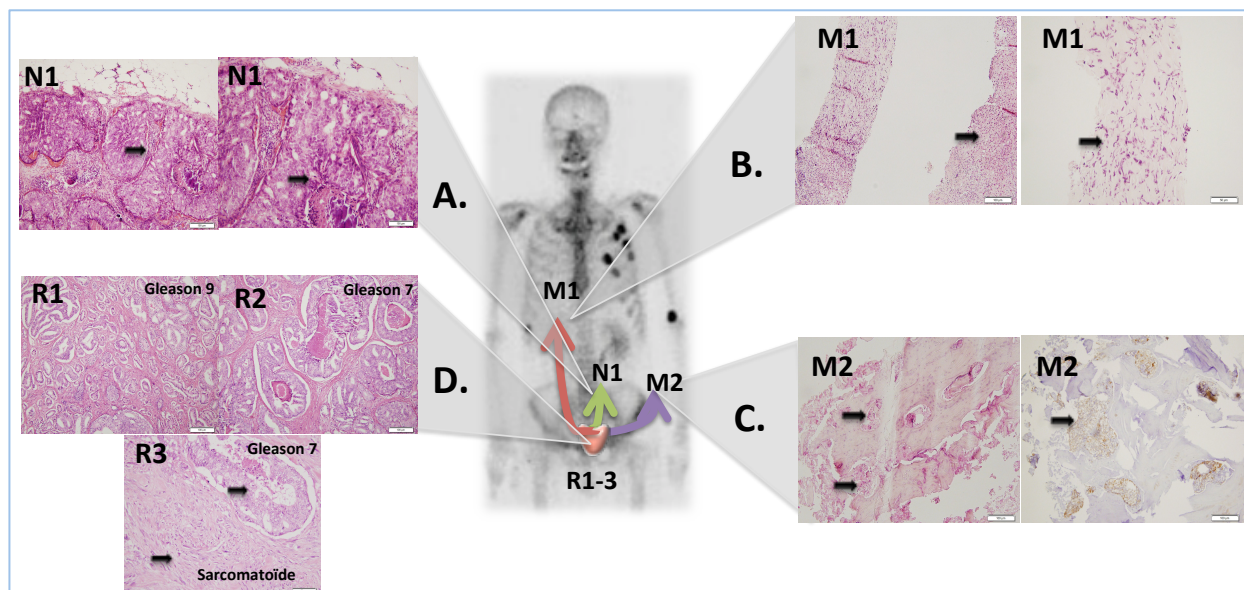
Les cellules fusiformes observées au niveau de l'échantillon hépatique et au niveau de la région R3 expriment un marquage cytoplasmique par l'anticorps anti-desmine, un marquage complet par l'anticorps anti-vimentine et un marquage focal par l'anticorps anti-actine. Cet immunomarquage est en faveur d'un carcinome de type sarcomatoïde.

L'analyse immunohistochimique montre une positivité du marquage avec l'anticorps dirigé contre la pancytokératine AE1/AE3 au niveau de l'échantillon osseux et de la région R2 confirmant la composante carcinomateuse par opposition à la partie sarcomatoïde qui est négative pour cet immunomarquage. La négativité du marquage PSA plaide en faveur d'un caractère peu différencié des cellules ce qui est en accord avec les taux de PSA circulant bas du patient.



Les observations anatomopathologiques portant sur la morphologie cellulaire et les analyses immunohistochimiques montrent une forte hétérogénéité de la tumeur primitive constituée de trois composantes avec une évolution spatiale distincte pour chacune des composantes. La partie sarcomatoïde semble s'être étendue vers le foie par voie hématogène. Les explorations suggèrent que les cellules issues de la partie adénocarcinomeuse se sont étendues vers les adénopathies ainsi qu'au niveau de l'os. (Figure 35)

**Figure 35 :** Observations microscopiques des différents échantillons tumoraux. Les cellules cancéreuses sont montrées par des flèches. A : N1 : adénopathie métastatique. Observations microscopiques de lames colorées à l'hématoxyline et éosine à deux grossissements (100x, 200x) ; B : M1: métastase hépatique (biopsie). Observations microscopiques de lames colorées à l'hématoxyline et éosine à deux grossissements (100x, 200x). C : M2 : métastase osseuse de l'aile iliaque gauche. Observations microscopiques de lames colorées à l'hématoxyline et éosine et lames marquées à la pankératine AE1/AE3 au grossissement 200x; D : R1-R3 : régions de la tumeur primitive ; Observations microscopiques de lames colorées à l'hématoxyline et éosine au grossissement (100x)



Afin d'étudier cette hétérogénéité sur le plan moléculaire nous avons décidé de réaliser une analyse en séquençant l'intégralité de l'exome et de confronter les résultats moléculaires aux résultats anatomopathologiques.

Avec l'aide des anatomopathologistes, nous avons subdivisé la tumeur primitive de prostate en 3 secteurs distincts en nous basant sur l'aspect morphologique des cellules de chacune des régions (R1, R2, R3). De plus nous avons analysé un des deux ganglions envahis (N1) ainsi que des échantillons congelés des métastases hépatiques (M1) et osseuses (M2) obtenus par biopsie.

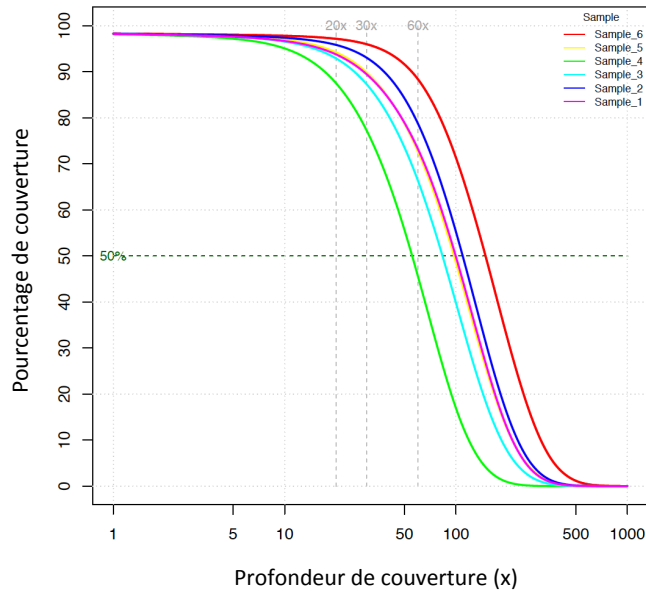
### 4.3.3 Données de séquençage

Le WES a été réalisé à partir d'ADN extrait des trois échantillons issus des trois régions de la tumeur primitive (R1, R2, R3), d'un échantillon de l'adénopathie régionale (N1) et de l'échantillon métastatique hépatique (M1). La cellularité tumorale a été évaluée pour chacune des régions et atteint 80% pour la région 1 et 2 et 90% pour la région 3. Au niveau de l'adénopathie on observe une cellularité de 70% tout comme au niveau hépatique. L'échantillon tumoral osseux n'a pas pu être analysé car la concentration d'ADN extraite était insuffisante et de mauvaise qualité. Cet échec d'analyse confirme les données issues d'autres études montrant que l'os n'est pas un site métastatique idéal pour des analyses de WES<sup>184</sup>. L'échantillon contrôle est constitué d'un prélèvement issu d'une région prostatique saine. Les couvertures moyennes pour chacun des échantillons sont listées dans le tableau 12 et la distribution de couverture est représentée en figure 36.

**Tableau 12** : Résumé de la profondeur de couverture pour chaque échantillon. Echantillon 1 : Tissu sain (contrôle) Echantillon 2 : Région 3 (sarcomatoïde) Echantillon 3 : Région 2 (Gleason 7) Echantillon 4 : Région 1 (Gleason 9) Echantillon 5 : Adénopathie (N1) Echantillon 6 : Métastase hépatique (M1)

Echantillons	target coverage		% of target covered with at least							
	total bases	average (x)	2x	5x	10x	20x	30x	60x	90x	120x
<b>Echantillon 1 : tissu sain</b>	5.69 GB	112.39	98.0	97.6	96.7	93.7	89.5	73.2	55.4	39.3
<b>Echantillon 2 : R3</b>	6.25 GB	123.45	98.1	97.9	97.4	95.8	93.1	78.7	61.0	44.4
<b>Echantillon 3 : R2</b>	4.86 GB	96.02	98.1	97.6	96.5	92.9	87.3	66.3	45.7	29.4
<b>Echantillon 4 : R1</b>	3.17 GB	62.61	97.9	97.2	95.1	87.5	77.4	45.5	22.1	9.6
<b>Echantillon 5 : N1</b>	5.64 GB	111.51	98.1	97.7	97.0	94.2	89.9	72.6	54.3	38.0
<b>Echantillon 6 : M1</b>	8.56 GB	169.15	98.2	98.0	97.8	97.1	96.0	88.4	75.9	62.2

**Figure 36** : . Distribution de couverture. Echantillon 1 : Tissu sain (contrôle) Echantillon 2 : Région 3 (sarcomatoïde) Echantillon 3 : Région 2 (Gleason 9) Echantillon 4 : Région 1 (Gleason 7) Echantillon 5 : Adénopathie (N1) Echantillon 6 : Métastase hépatique (M1)



L'échantillon métastatique a été séquençé de manière plus profonde atteignant une profondeur moyenne de 170x. Les étapes ayant conduit à l'identification des mutations somatiques non-synonymes ainsi qu'aux insertions et délétions (InDels) sont représentés dans le tableau 13. Les mutations non-synonymes ou causatives correspondent à des mutations ponctuelles entraînant une modification d'acide aminé au niveau de la protéine avec un impact fonctionnel par opposition aux mutations synonymes qui n'ont, du moins en théorie, pas ou peu d'impact fonctionnel.

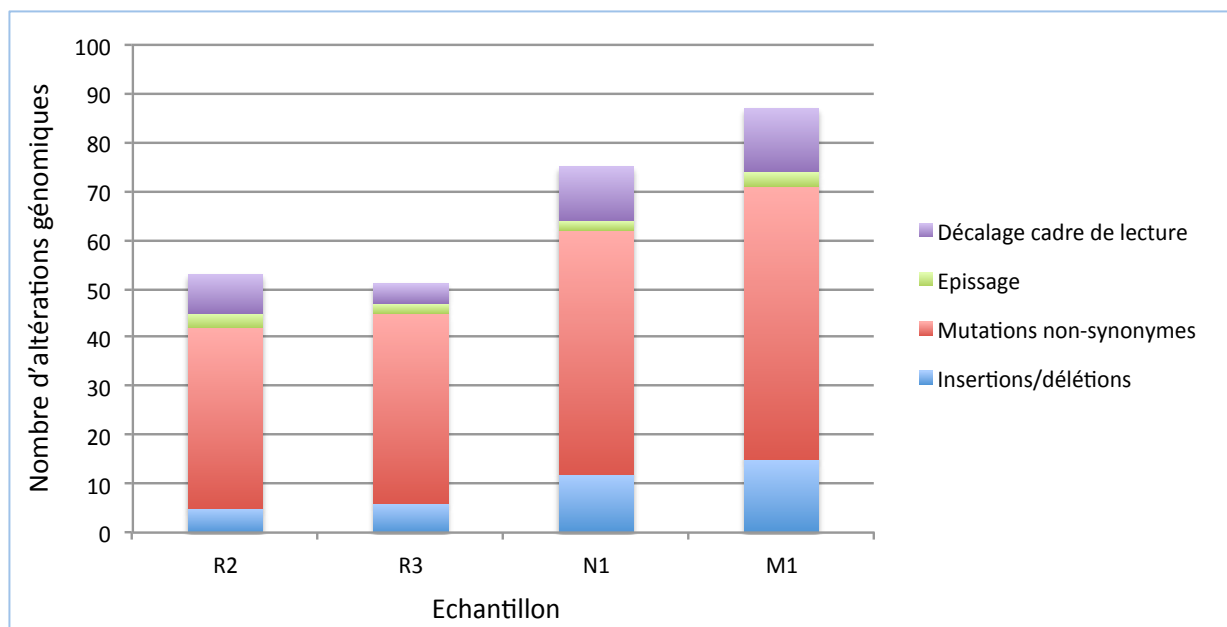
**Tableau 13** : Représentation du processus d'obtention des données à partir du séquençage à haut débit de l'exome sur chacun des échantillons

	Sample 2 (R3)	Sample 3 (R1)	Sample 4 (R2)	Sample 5 (N1)	Sample 6 (M1)
<b>SNV totaux / Indel</b>	<b>87111 / 10630</b>	<b>85720 / 9716</b>	<b>83380 / 9523</b>	<b>86621 / 10019</b>	<b>88544 / 11633</b>
<b>SNV + Indels, après filtres*</b>	<b>67361 / 9902</b>	<b>55012 / 8862</b>	<b>49482 / 8856</b>	<b>61382 / 9331</b>	<b>77257 / 10752</b>
<b>SNV + Indels; somatiques; couverture &gt; 30x</b>	<b>562</b>	<b>//</b>	<b>362</b>	<b>611</b>	<b>1486</b>
<b>SNV non-synonymes, Indels,</b>	<b>51</b>	<b>//</b>	<b>46</b>	<b>67</b>	<b>81</b>

Une validation des mutations somatiques détectées par séquençage classique n'a pas pu être réalisée en raison de l'absence de tissu résiduel pour le site métastatique ainsi que l'adénopathie. Néanmoins, le taux de couverture assez profond obtenu ainsi que les filtres mis en place limitent le risque de faux positifs. En effet, nous avons exclu toute aberration génomique avec une couverture < 30x. Les différentes études portant sur des analyses de WES similaires rapportent des taux de faux positifs et faux négatifs extrêmement faibles n'excédant pas les 1 à 2%<sup>5,182,185</sup>.

En tenant compte des mutations communes aux différents échantillons, un nombre total de 120 mutations somatiques non-synonymes ou affectant un site d'épissage a été identifié. De plus 60 insertions ou délétions ont été identifiées sur l'ensemble des échantillons analysés. La distribution des anomalies détectées dans chacun des échantillons est représentée dans le figure 37. Certaines anomalies sont communes à certains échantillons.

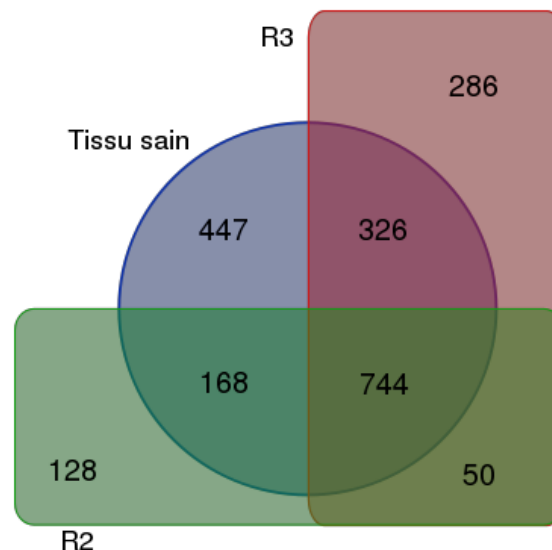
**Figure 37** : Représentation du nombre et le type d'anomalies génomiques identifiées dans chaque échantillon tumoral.



#### 4.3.4 Hétérogénéité intratumorale et tumeur primitive : R1, R2, R3

L'étude de l'hétérogénéité intratumorale a porté sur l'analyse de l'exome par séquençage à haut-débit des trois régions de la tumeur primitive décrites plus haut. L'analyse de R1, correspondant à la région de Gleason 9, a été écartée pour les analyses ultérieures en raison de résultats de qualité insuffisante. En effet le nombre de variants (SNV) après application des filtres est inhabituellement bas (facteur 10x) ce qui laisse supposer une moindre qualité des données de séquençage. L'analyse finale porte donc sur les deux échantillons tumoraux restants R2 et R3. La comparaison de l'ensemble des variants de ces deux régions a été réalisée et représentée par un diagramme de Venn (figure 38).

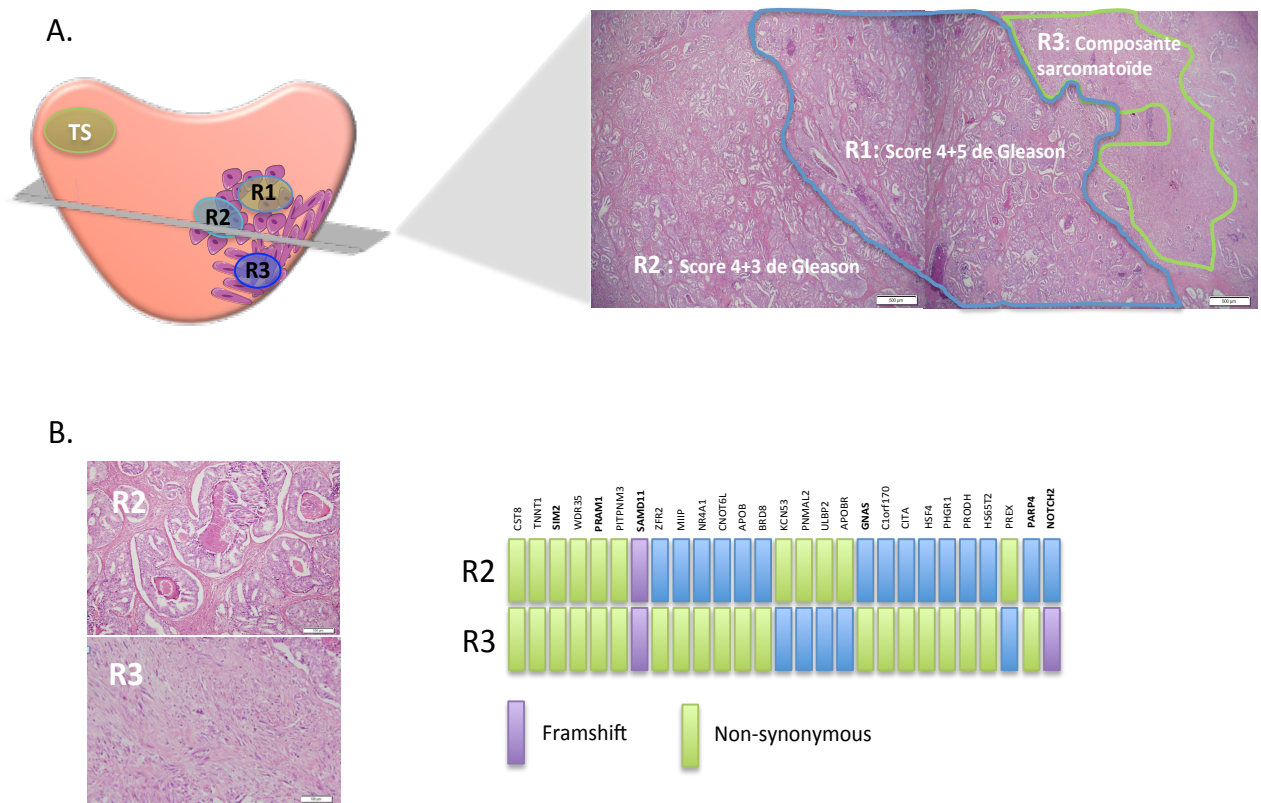
**Figure 38** : Diagramme de Venn. Représentation schématique de la distributions des SNV dans les différents échantillons tumoraux (R2 et R3) et le tissu sain (tissu de référence)



Ce diagramme de Venn montre que le profil génomique des deux régions est très discordant. Les deux régions ne présentent que très peu de SNV somatiques communs (N=50). Lorsqu'on s'intéresse qu'aux mutations non-synonymes (mutations somatiques induisant une altération protéique) la différence sur le plan génomique entre R2 et R3 est encore plus marquée. En effet, après exclusion des variants sans impact fonctionnel, seules 6 mutations somatiques non synonymes et une délétion avec décalage du cadre de lecture communes aux deux régions ont été identifiées. Les anomalies génomiques principales dans chacune des 2 régions sont représentées dans la figure 39.

**Figure 39** : Hétérogénéité intratumorale.

A. Représentation des zones d'intérêt choisies à partir de la tumeur primitive pour l'analyse en WES. B. Représentation en microscopie optique des deux zones distinctes sur le plan anatomopathologiques de la tumeur primitive et représentation des anomalies génomiques identifiées à partir des deux échantillons. Les mutations non-synonymes sont représentées en vert, les délétions avec décalage du cadre de lecture sont représentées en violet. Les anomalies génomiques potentiellement « drivers » sont indiquées en gras.



Nos résultats moléculaires sont en accord avec les données morphologiques issues des analyses anatomopathologiques qui suggéraient l'existence d'une forte différence entre la région comportant l'adénocarcinome Gleason 7 et le territoire renfermant la composante sarcomatoïde.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mutations identifiées en les comparant à celles décrites comme étant récurrentes dans les CaP. Des études récentes ont ainsi décrit la survenue de mutations récurrentes dans les CaP localisés parmi lesquelles les mutations de *SPOP*, *FOXA1* ou *MED12*. L'analyse des mutations et délétions somatiques communes

détectées au sein de R3 et R2 ne révèle aucune mutation pouvant être considérée comme « drivers » dans les CaP localisés. De plus nous n'avons observé aucune altération du RA. Les altérations du nombre de copies de gènes n'ont quant à elles pas été recherchées dans notre étude. Nous avons ensuite vérifié la fonction des gènes mutés ou porteurs de délétion et si les mutations et délétions avaient été décrites dans les cancers. Nous avons ainsi pu identifier cinq anomalies génomiques potentiellement intéressantes.

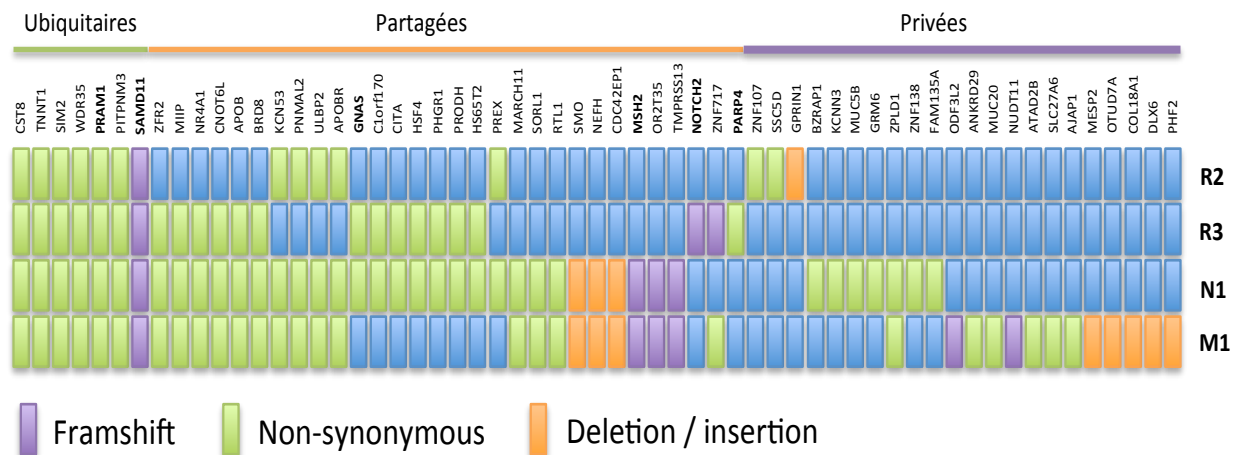
Nous avons détecté une mutation qui touche le gène *SIM2* codant pour le facteur transcriptionnel. Le gène *SIM2* est connu comme étant fréquemment surexprimé dans les CaP et est associé à un score de Gleason élevé, à une extension extraprostatique et constitue un facteur de mauvais pronostic. Par ailleurs nous avons détecté une délétion de *SAMD11*, gène codant une protéine hautement exprimée dans les CaP et qui semble jouer un rôle dans la prolifération cellulaire.

Lorsqu'on s'intéresse aux mutations privées au sein de chaque échantillon, on observe une mutation de *GNAS* potentiellement « driver » dans les CaP, tout comme une atteinte du gène moins connue *PARP4* impliqué comme les autres gènes de la famille PARP, dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Nous avons également identifié une délétion affectant *NOTCH2* et induisant un décalage du cadre de lecture (dél p.P6fs\*27). Cette délétion est connue et a été décrite comme pouvant altérer la voie de signalisation Notch. La voie Notch est l'une des principales voies de signalisation liée à la biologie des cellules souches et du cancer<sup>186</sup>. La dérégulation de Notch2 et / ou de l'activité Notch3 a été associée à plusieurs types de cancers comme les cancers du poumon<sup>187</sup>, des ovaires<sup>188</sup>, du sein<sup>189</sup> ainsi que le cancer du pancréas<sup>190</sup>. En plus de son rôle dans la carcinogenèse, la voie de signalisation Notch joue également un rôle clé dans les mécanismes d'angiogenèse (8). La délétion retrouvée dans notre prélèvement a d'ores et déjà été décrite dans différents cancers parmi lesquels les cancers urothéliaux, les cancers des voies aérodigestives supérieures, du colon et de l'œsophage<sup>191</sup>. De nombreuses stratégies thérapeutiques visant à inhiber la voie Notch 2/3 sont actuellement en cours de développement avec des résultats prometteurs<sup>192</sup>.

#### 4.3.5 Hétérogénéité inter- et intramétastatique et évolution clonale

Nous avons voulu étudier l'évolution clonale sur un plan temporo-spatial afin de confronter nos résultats et hypothèses issues du WES à celles issues des examens d'anatomopathologie. Pour ce faire nous avons comparé tous les échantillons entre eux et avons classé l'ensemble des mutations somatiques non-synonymes et insertions/délétions (InDels) en plusieurs groupes selon leur appartenance à chacune des régions. Nous avons ainsi défini un groupe de « mutations ubiquitaires », communes à l'ensemble des échantillons, un groupe de « mutations partagées » présentes dans plusieurs régions mais pas toutes et enfin des « mutations privées », confinées au sein d'un seul échantillon. La détection de mutations privées témoigne de l'évolution clonale au sein de chacune des régions et de l'hétérogénéité intratumorale ou intramétastatique. Les mutations ubiquitaires, partagées et les principales mutations privées sont représentées en figure 40.

**Figure 40** : Distribution régionale des mutations. Représentation de la distribution des mutations non-synonymes (vert), des InDels sans (orange) et avec décalage du cadre de lecture (violet), identifiées par séquençage de l'exome des échantillons de la tumeur primitive (R2 : région Gleason 7, R3 : composante sarcomatoïde), de l'adénopathie métastatique (N1) et de la métastase hépatique (M1). La région R1 a été exclue de l'analyse en raison d'un défaut de qualité d'ADN ou de séquençage. L'absence d'anomalie génomique est indiquée en bleu. Les barres colorées au-dessus de la représentation des mutations montrent le caractère ubiquitaire, partagé ou privé de chacune des mutations ou InDels détectées. L'ensemble des anomalies génomiques dites privées n'a pas été représenté. Les mutations ou InDels d'intérêt sont représentés en gras.





Les mutations partagées ont été divisées entre celles présentes au sein de la tumeur primitive et l'adénopathie et celles présentes entre la tumeur primitive ou l'adénopathie et le site métastatique. En effet, cette subdivision tient ainsi compte du facteur temporel, l'échantillon hépatique ayant été prélevé après un an d'exposition à une hormonothérapie qui a du exercer une pression de sélection sur les clones cellulaires.

#### *Région N1 originaire de la région 1*

Les aberrations génomiques identifiées au sein de l'adénopathie (N1) présentent de très nombreuses similitudes avec la région R3. Ainsi 14 mutations somatiques non-synonymes sont communes entre les 2 régions. Cette similitude moléculaire est en opposition aux résultats anatomopathologiques qui avaient trouvé une similitude entre N1 et les régions R1-R2. Seules 4 mutations non-synonymes sont communes entre R2 et N1.

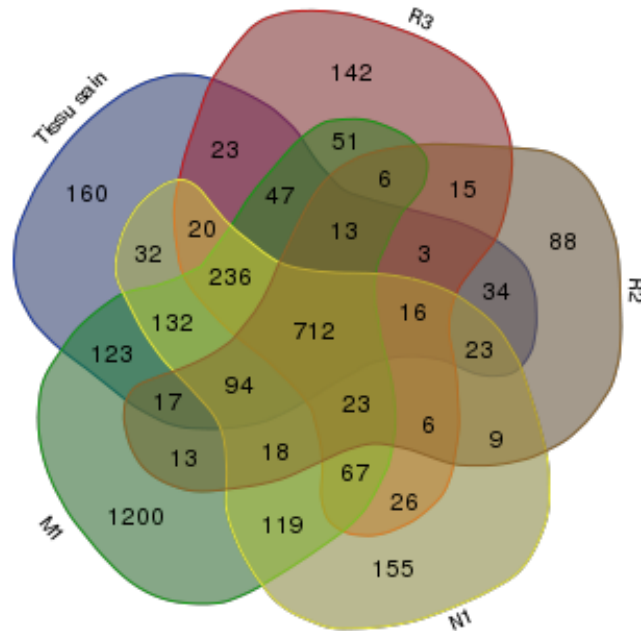
#### *M1 : évolution temporelle et spatiale*

Les anomalies moléculaires au sein de la métastase (M1) sont très nombreuses témoignant d'une accumulation au cours de la progression tumorale. L'échantillon M1 est en effet celui présentant le plus de mutations « privées ». Cette expansion des variants est représentée par le diagramme de Venn (Figure 41).

La comparaison entre les différentes régions montre une forte similitude entre les caractéristiques moléculaires de la métastase M1 et de l'adénopathie N1. En effet, de nombreuses mutations somatiques non-synonymes sont communes aux deux échantillons. Parmi les anomalies génomiques communes citons la délétion avec décalage du cadre de lecture qui affecte le gène *MSH2* impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN de type « mismatch repair ». Cette anomalie de type perte de fonction fait partie des anomalies récurrentes décrites dans les CaP et peut être considérée comme potentiellement « driver ».

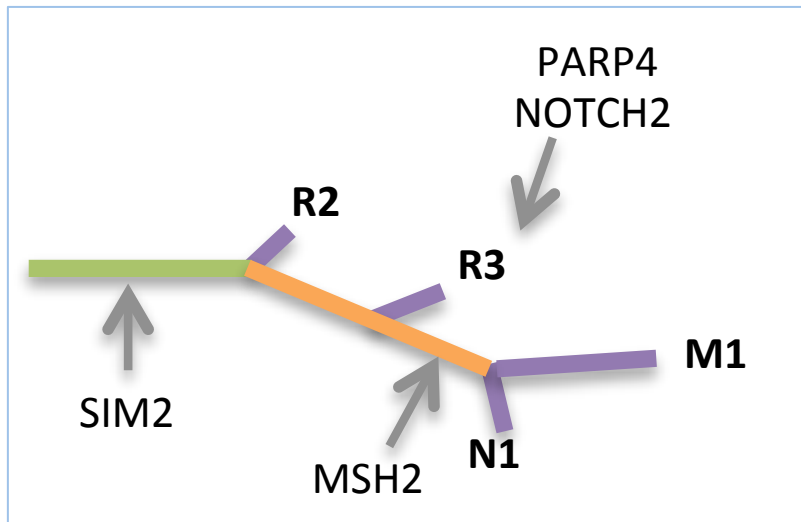
Cependant certaines anomalies ne sont pas présentes ce qui peut refléter le fait que ces anomalies ne sont que passagères et disparaissent au fil du temps. Par ailleurs cette « perte » d'anomalies moléculaires peut également traduire l'élimination de clones cellulaires sous l'effet d'une pression de sélection exercée par l'hormonothérapie administrée au patient. Enfin, l'augmentation du nombre de mutations traduit également l'hétérogénéité intramétastatique.

**Figure 41** : Diagramme de Venn : Représentation de la comparaison des SNV entre les différents échantillons. R2-R3 : Tumeur primitive, N1 : adénopathie métastatique, M1 : métastase hépatique. Observation d'un nombre élevé d'anomalies génomiques dans l'échantillon M1 (N=1200). De nombreuses anomalies génomiques sont communs aux échantillons N1 et M1



Nous avons tenté de construire un arbre phylogénétique à partir des différentes régions explorées comme décrit par Merlo *et al.* <sup>193</sup>. La proposition d'arbre phylogénétique est représentée en figure 42. Cet arbre évoque une évolution plutôt linéaire avec une rupture précoce avec l'échantillon 2 au sein de la tumeur primitive. L'échantillon N1 (adénopathie) partage de fortes similitudes avec la région R3 de la tumeur primitive ainsi qu'avec l'échantillon M1. De manière attendue le nombre d'anomalies génomiques somatiques est considérablement plus important dans l'échantillon M1, ce qui traduit l'existence d'une instabilité génomique.

**Figure 42** : Représentation schématique et hypothétique de la relation phylogénétique entre les différentes régions tumorales analysées. La longueur de chaque branche représente le nombre d'anomalies moléculaires. Certaines anomalies moléculaires potentiellement drivers sont représentées sur le schéma avec des flèches indiquant leur présence au cours de l'évolution.



#### 4.3.6 Fréquence allélique et clonalité

Afin d'explorer davantage les différentes hypothèses d'évolution clonale nous avons analysé l'évolution de la fréquence allélique des différentes mutations non-synonymes entre les différents échantillons. En effet, partant du principe qu'une mutation confère un avantage sélectif à un clone cellulaire, ce dernier devrait s'accumuler dans le temps et devenir majoritaire au sein de la tumeur. De ce fait, on s'attend par conséquent à une augmentation de la fréquence allélique au cours du temps. Cette analyse permet ainsi d'établir une relation temporelle entre les différents échantillons. Le prélèvement métastatique qui a quant à lui subi l'exposition à l'hormonothérapie a été considéré à part et comparé secondairement à chacun des échantillons prélevés au début de la maladie. L'ensemble des données d'évolution de la fréquence allélique entre les échantillons R3, N1 et M1 est regroupé dans le tableau 14.

De manière surprenante, on n'observe qu'une seule augmentation de la fréquence allélique pour la mutation affectant BRD8. La comparaison des régions R3 et N1 montre que la fréquence allélique diminue pour 4 mutations (CST8, TNNT1, ZFR2, APOB) et reste stable pour les autres mutations. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats: La fréquence allélique d'une mutation au sein d'une cellule tumorale est directement corrélée au pourcentage de cellules tumorales au sein de l'échantillon (cellularité tumorale). La diminution de la fréquence allélique peut ainsi résulter d'une cellularité tumorale plus faible dans l'adénopathie (70%) par rapport à la région R3 (90%). Par ailleurs, la fréquence allélique est directement liée au nombre de copies de gènes et à la ploïdie cellulaire. En l'absence de résultats concernant la variation du nombre de copies de gènes et de la ploïdie cellulaire dans notre étude, on ne peut exclure la possibilité qu'une telle variation puisse expliquer la diminution de la fréquence allélique observée. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour approfondir ces hypothèses.

**Tableau 14** : Evolution de la fréquence allélique des mutations non-synonymes

	<b>Primitif R3</b>	<b>Adénopathie N1</b>	<b>Métastase M1</b>
<b>CST8</b>	<b>50.8</b>	<b>32.2</b>	<b>26.6</b>
<b>TNNT1</b>	<b>52.0</b>	<b>33.0</b>	<b>29.0</b>
<b>ZFR2</b>	<b>51.0</b>	<b>29.3</b>	<b>29.2</b>
<b>APOB</b>	<b>40.0</b>	<b>25.5</b>	<b>19.4</b>
<b>SIM2</b>	<b>29.1</b>	<b>29.9</b>	<b>18.8</b>
<b>WDR35</b>	<b>31.6</b>	<b>32.4</b>	<b>26.6</b>
<b>NR4A1</b>	<b>20.1</b>	<b>19.0</b>	<b>24.0</b>
<b>MIIP</b>	<b>28.8</b>	<b>25.4</b>	<b>20.2</b>
<b>PRAM</b>	<b>41.2</b>	<b>39.2</b>	<b>23.1</b>
<b>KCNS3</b>	<b>/</b>	<b>33.4</b>	<b>28.0</b>
<b>PNMAL2</b>	<b>/</b>	<b>38.8</b>	<b>28.2</b>
<b>ULBP2</b>	<b>/</b>	<b>38.0</b>	<b>32.4</b>
<b>APOBR</b>	<b>/</b>	<b>18.4</b>	<b>20.0</b>
<b>BRD8</b>	<b>60.4</b>	<b>74.0</b>	<b>75.2</b>

La comparaison entre l'adénopathie N1 et la métastase M1 montre une stabilité ou légère diminution de la fréquence allélique de la majorité des mutations. Outre les variations du nombre de copies de gènes ou de la ploïdie cellulaire, une troisième hypothèse peut cette fois être avancée. En effet, la diminution de certaines fréquences alléliques peut être la résultante de l'effet de l'hormonothérapie auquel le patient a été exposé.

En conclusion, les résultats de la fréquence allélique doivent être interprétés avec précaution compte tenu du nombre important d'incertitudes entourant ce type d'analyse.

#### 4.4 *Discussion*

L'immense complexité du génome des cancers constitue un important obstacle à la médecine personnalisée<sup>194</sup>. Depuis le développement des thérapies ciblées, la caractérisation moléculaire du tissu tumoral est devenue primordiale dans la prise en charge thérapeutique. Les technologies d'analyse moléculaire sont au centre des projets de « médecine personnalisée ou médecine de précision », et ont déjà permis une nouvelle classification moléculaire des cancers. Ainsi, il a été montré qu'une maladie fréquente comme le cancer du poumon non à petites cellules est en réalité un ensemble de pathologies plus rares définies par des altérations moléculaires différentes comme les mutations EGFR, la translocation ALK, les mutations ou amplification du gène *HER2*, si bien que la prise en charge de ces maladies est désormais adaptée à leur profil moléculaire. Cependant, l'hétérogénéité tumorale et son évolution tant spatiale que temporelle est sans doute le challenge le plus difficile à relever pour poursuivre cette stratégie de médecine personnalisée.

Nous avons à partir d'un cas tenté d'explorer cette complexité tumorale qui découle de l'évolution clonale. A l'initiation du projet, quasi aucune donnée n'était disponible dans la littérature sur l'hétérogénéité tumorale et l'évolution clonale dans les CaP.

##### 4.4.1 **Accessibilité des échantillons**

L'accessibilité tumorale est sans aucun doute une limite non négligeable pour l'étude de l'hétérogénéité. Nous avons été confrontés aux difficultés d'extraction d'ADN de qualité et en quantité suffisantes pour pouvoir réaliser les analyses en séquençage à haut-débit. L'os est tout particulièrement un site métastatique peu propice pour avoir accès à du tissu tumoral<sup>195</sup>. Cette observation a été faite par de nombreuses équipes et poussent actuellement les programmes de screening moléculaire à exclure l'os comme site de biopsie (SAFIR 02 - NCT02299999 ; NCT02117167)<sup>196,197</sup>. Or avec une atteinte dans près de 90% des formes avancées, l'os constitue le premier site métastatique des CaP<sup>198</sup>. De plus, compte tenu de l'évolution de l'hétérogénéité tumorale dans le temps, il sera difficile de proposer des biopsies tumorales successives et répétées dans la grande majorité des patients atteints d'une tumeur solide<sup>199</sup>. Une solution serait de s'inspirer des hémopathies malignes où il est commun de suivre l'évolution tumorale en cours de traitement par le suivi des cellules tumorales dans le sang ou dans la moelle osseuse en utilisant des techniques de biologie moléculaire, Ainsi, l'isolement des cellules tumorales circulantes (CTC) ou de l'ADNcirculant issu de cellules

tumorales peut représenter une source de matériel tumoral pour mettre en évidence des anomalies moléculaires connues (telles que les mutations EGFR, les translocations *ALK* dans le cancer du poumon ; les amplifications de HER2 dans les cancers du sein ; les amplification du RA ou les translocations *TMPRSS2* dans les CaP), identifier de nouvelles altérations moléculaires ou des mécanismes de résistance aux traitements. Plusieurs équipes ont montré qu'il est possible de caractériser sur le plan moléculaire les CTC isolées par différentes plateformes technologiques <sup>200,201</sup>. De plus il est également faisable par des techniques de PCR digitale d'identifier et de suivre dans le temps des anomalies moléculaires. Il a été montré qu'il est possible de mettre en évidence des amplifications de gènes (comme HER-2 dans les cancers du sein) <sup>202</sup>, ou des translocations comme la translocation *TMPRSS2-ERG* dans les CaP <sup>203</sup>.

A terme, il est possible d'imaginer que l'analyse moléculaire de l'ADN circulant ou des CTC pourrait devenir une vraie « biopsie tumorale liquide » permettant de contourner le problème de l'accessibilité tumorale dans le CaP et d'assurer le suivi des cancers. Il est cependant à noter qu'il existe à ce jour peu d'études ayant comparé le phénotype moléculaire des CTC ou de l'ADNc et les altérations moléculaires de la tumeur primitive et des métastases chez un même patient. Ces études sont indispensables pour savoir si la biopsie liquide permet d'appréhender l'hétérogénéité tumorale.

#### 4.4.2 Hétérogénéité entre tumeur primitive et métastase

L'analyse génétique de multiples régions nous a permis d'observer une importante hétérogénéité à la fois intratumorale avec une distribution spatiale des mutations somatiques conduisant à des différences phénotypiques évidentes. Comme attendu, la charge mutationnelle est significativement plus élevée dans les échantillons métastatiques, ce qui est cohérent avec les résultats rapportés dans la littérature. Cependant de manière inattendue nous avons pu observer une discordance entre l'aspect phénotypique et les caractéristiques génomiques en particulier au niveau de l'adénopathie métastatique.

Dans le même temps nous avons également pu constater la présence de liens entre les différentes régions et ce malgré un phénotype hétérogène. Parmi les mutations identifiées, toutes ne sont pas retrouvées dans l'ensemble des prélèvements. Des données similaires ont été décrites par Gerlinger et al et soulignent le fait qu'une biopsie isolée d'une tumeur ne contient qu'une minorité des anomalies génomiques <sup>174</sup>. Une biopsie unique, notamment de la

tumeur primitive, ne reflète donc pas ou peu la présence des anomalies génomiques au niveau des sites métastatiques.

Ce type de biopsie fréquemment utilisé à l'heure de la médecine de précision pour guider les thérapies ciblées risque de sous-estimer la charge mutationnelle. La prise en charge thérapeutique des patients repose fréquemment sur les caractéristiques moléculaires de la tumeur primitive, alors que la gravité de la maladie est représentée au stade avancé par les métastases. L'existence de l'hétérogénéité intratumorale peut expliquer les difficultés rencontrées pour l'identification et la validation de biomarqueurs du fait d'un biais d'échantillonnage tumoral.

#### **4.4.3 Mutations « driver » ou « passenger » ? Altérations des principales voies de signalisation**

Parmi l'ensemble des mutations somatiques qui peuvent être identifiées au cours d'analyses moléculaires, il n'est pas évident d'identifier celles qui sont « drivers » de celles qui ne sont que « passagères » et qui ne confèrent aucun avantage sélectif. La distinction entre ces deux types de mutation repose sur l'avantage sélectif attribué par chacune des mutations drivers. Par ailleurs il est important de distinguer au sein des mutations affectant des gènes drivers, les mutations ayant un impact fonctionnel majeur de celles qui n'auront pas d'impact connu. De nombreuses méthodes statistiques et bioinformatiques ont été décrites pour identifier ces gènes susceptibles d'être affectés par des mutations drivers<sup>204-206</sup>. Certaines sont basées sur la fréquence des mutations au sein de chaque gène et d'autres sur l'impact sur la protéine codée par le gène en question. Des catalogues tels que COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) permettent de déterminer le rôle de chacune des mutations retrouvées. Dans notre étude nous n'avons identifié que trois mutations touchant des gènes (*GNAS*, *MSH2*, *PARP4*) connus comme étant « driver » potentiel dans les CaP. Cependant la forte hétérogénéité de ces anomalies, qui ne sont présentes que dans certains échantillons, témoigne bien qu'une identification d'une anomalie génomique n'est pas toujours suffisante pour guider la prise en charge thérapeutique. En effet, seules les anomalies ubiquitaires constituent des cibles thérapeutiques potentielles.

Nous avons comparé les mutations retrouvées dans notre étude à celles publiées dans la littérature sans toutefois observer de franche concordance. Ceci peut en partie être lié aux



techniques utilisées mais également au caractère atypique du cas clinique avec cette forte composante sarcomatoïde qui est très peu fréquente dans les CaP.

#### **4.4.4 Hétérogénéité tumorale : un challenge à relever pour la médecine personnalisée**

Au vu de nos résultats et de ceux d'autres auteurs, il devient clair que définir un profil mutationnel et transcriptionnel d'un cancer en se basant sur l'analyse d'une biopsie unique revient à s'exposer au risque de proposer une thérapie ciblée qui ne serait efficace que sur une sous-population de cellules constituant la tumeur. De même, établir un pronostic en s'appuyant sur des données génomiques partielles pourrait conduire à des conclusions erronées.

Même si la réalité de l'hétérogénéité spatiale de la tumeur représente un défi pour la médecine de précision dont il faut prendre la mesure, elle ne constitue pas un obstacle insurmontable. L'utilisation de biopsies récentes, multiples ou encore l'accès à l'ADN circulant ou aux CTC constituent autant de pistes pour se défaire de l'hétérogénéité tumorale.

Plusieurs études apportent la preuve que seule la perturbation d'un petit nombre de voies de signalisation est commune aux différentes sous-populations tumorales<sup>5</sup>. Ainsi les mécanismes de réparation de l'ADN sont fréquemment altérés dans de nombreux cancers en particulier les CaP ce qui a conduit à développer des thérapeutiques agissant sur cette cible potentielle. En effet, ces voies dérégulées sont probablement le talon d'Achille de la tumeur qu'il s'agit de cibler de manière prioritaire. Néanmoins, nombre d'anomalies génomiques touchent des gènes suppresseurs de tumeurs ce qui rend un ciblage thérapeutique potentiel difficile.

L'hétérogénéité génomique tumorale à proprement parler ne représente qu'un pan d'une hétérogénéité bien plus vaste qui englobe le microenvironnement tumoral ou le système immunitaire. L'avancée des technologies ces dernières années a permis de faire des pas de géant dans notre compréhension de la biologie des cancers et de l'évolution tumorale. On peut imaginer qu'à terme, notre connaissance des mécanismes moléculaires responsables de la dynamique évolutive des différents types de tumeur et des phénomènes de résistance thérapeutique sera tellement fine qu'elle permettra de proposer des traitements spécifiques pour un cancer donné sans se préoccuper des singularités de chaque cas.

La médecine personnalisée n'est peut-être qu'une étape transitoire vers une nouvelle cancérologie fondée sur les acquis de la génomique. Néanmoins certaines questions restent sans réponse en particulier celle portant sur la faisabilité de toutes ces analyses dans des délais et des coûts raisonnables afin de permettre une décision thérapeutique appropriée.

#### 4.4.5 Perspectives et conclusions :

Notre travail est avant tout exploratoire et comporte de nombreuses limites qu'il est nécessaire de souligner. Malgré l'ensemble des précautions mises en oeuvre pour limiter le nombre de faux positifs et négatifs, l'étape ultime qui consiste à valider les mutations par réalisation d'un séquençage ciblé n'a pas pu être réalisée. De plus, le CaP se caractérise par de nombreuses altérations du nombre de copies de gènes ainsi que de réarrangements chromosomiques comportant des insertions, délétions et translocations. Cette analyse est fondamentale dans la mesure où elle nous aurait donné des informations supplémentaires sur l'évolution clonale.

Les résultats obtenus grâce à cette étude exploratoire nous ont permis d'élaborer un projet de séquençage moléculaire similaire au projet AURORA développé dans les cancers du sein métastatiques dont j'ai participé à la mise en place. L'objectif sera d'assurer le suivi de l'hétérogénéité tumorale dans le temps et dans l'espace en obtenant des prélèvements dans la mesure du possible du site tumoral primitif, métastatique ainsi que des biopsies liquides afin d'étudier l'hétérogénéité tumorale à partir de l'ADN circulant et CTC. Ces prélèvements seront réalisés de manière itérative à chaque changement de ligne thérapeutique. Ce type de projet permettra à terme une meilleure compréhension de l'hétérogénéité tumorale des CaP.

En conclusion, à la suite de ce travail et d'autres publiés récemment, on peut considérer le CaP comme un écosystème constitué de plusieurs sous-populations de cellules malignes avec leur architecture génétique spécifique et évoluant dans des zones distinctes tout en entretenant des relations complexes de compétition et de mutualisme dans le temps et l'espace.

## Conclusions générales

La prise en charge du cancer de la prostate reste un challenge pour les cliniciens et ce malgré le renforcement de l'arsenal thérapeutique ces dernières décennies. D'innombrables efforts ont été réalisés ces dernières années pour mieux comprendre la biologie des cancers de la prostate. Ces avancées ont permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de nouvelles armes thérapeutiques.

Cependant nous restons confrontés à l'émergence de multiples mécanismes de résistance aux thérapeutiques actuellement disponibles et en particulier à l'encontre des hormonothérapies de dernière génération ciblant la voie du récepteur des androgènes. Ce travail de thèse s'inscrit dans cette problématique. Nous avons pu identifier d'innombrables altérations du récepteur des androgènes (RA) susceptibles d'être impliquées dans la survenue de mécanismes de résistance aux anti-androgènes. Ce travail n'est qu'une première étape et devra se poursuivre afin d'améliorer les connaissances concernant les altérations du RA. La mise en évidence de récepteurs tronqués va très certainement modifier à moyen terme la prise en charge des cancers de la prostate avec la nécessité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous avons tenté de vérifier un lien potentiel entre ces formes tronquées et les mécanismes d'angiogenèse mais n'avons pas réussi à confirmer notre hypothèse initiale. D'autres études précliniques et translationnelles seront nécessaires pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour cette sous-population de patients. Or la recherche translationnelle se heurte à de nombreuses problématiques parmi lesquelles l'hétérogénéité tumorale. Nous avons pu montrer à travers une étude de cas la complexité du cancer de la prostate avec une évolution à la fois spatiale et temporelle.

L'ensemble de ce travail de thèse va permettre d'initier de nouveaux projets de recherche dans le but ultime d'améliorer la prise en charge des cancers de la prostate aux différents stades de son évolution.

## 5 Bibliographie

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 7–30 (2016).
2. Grosclaude, P. *et al.* [Prostate cancer incidence and mortality trends in France from 1980 to 2011]. *Prog. En Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol.* **25**, 536–542 (2015).
3. Guérin, S. & Hill, C. [Cancer epidemiology in France in 2010, comparison with the USA]. *Bull. Cancer (Paris)* **97**, 47–54 (2010).
4. 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).
5. Robinson, D. *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* **161**, 1215–1228 (2015).
6. Berger, M. F. *et al.* The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* **470**, 214–220 (2011).
7. Tomlins, S. A. *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310**, 644–648 (2005).
8. Gopalan, A. *et al.* TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res.* **69**, 1400–1406 (2009).
9. Pettersson, A. *et al.* The TMPRSS2:ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **21**, 1497–1509 (2012).
10. Taylor, B. S. *et al.* Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* **18**, 11–22 (2010).
11. Hieronymus, H. *et al.* Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 11139–11144 (2014).
12. Lalonde, E. *et al.* Tumour genomic and microenvironmental heterogeneity for integrated prediction of 5-year biochemical recurrence of prostate cancer: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* **15**, 1521–1532 (2014).
13. Kan, Z. *et al.* Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* **466**, 869–873 (2010).
14. Greenman, C. *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**, 153–158 (2007).
15. Pleasance, E. D. *et al.* A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* **463**, 191–196 (2010).
16. Barbieri, C. E. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat. Genet.* **44**, 685–689 (2012).
17. McMenamin, M. E. *et al.* Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* **59**, 4291–4296 (1999).
18. Sircar, K. *et al.* PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J. Pathol.* **218**, 505–513 (2009).
19. Baca, S. C. & Garraway, L. A. The genomic landscape of prostate cancer. *Front.*

*Endocrinol.* **3**, 69 (2012).

20. Guo, Z. *et al.* A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res.* **69**, 2305–2313 (2009).
21. 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**, e19059 (2011).
22. Lindberg, J. *et al.* Exome sequencing of prostate cancer supports the hypothesis of independent tumour origins. *Eur. Urol.* **63**, 347–353 (2013).
23. Finn, R. S. *et al.* The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* **16**, 25–35 (2015).
24. Mateo, J. *et al.* DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1697–1708 (2015).
25. Pritchard, C. C. *et al.* Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. *Nat. Commun.* **5**, 4988 (2014).
26. Liu, J. *et al.* Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20224–20229 (2013).
27. Yarbro, J. W., Page, D. L., Fielding, L. P., Partridge, E. E. & Murphy, G. P. American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference. *Cancer* **86**, 2436–2446 (1999).
28. Chan, T. Y., Partin, A. W., Walsh, P. C. & Epstein, J. I. Prognostic significance of Gleason score 3+4 versus Gleason score 4+3 tumor at radical prostatectomy. *Urology* **56**, 823–827 (2000).
29. Epstein, J. I. *et al.* A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur. Urol.* **69**, 428–435 (2016).
30. Epstein, J. I. *et al.* The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 244–252 (2016).
31. Loeb, S. & Catalona, W. J. Prostate-specific antigen screening: pro. *Curr. Opin. Urol.* **20**, 185–188 (2010).
32. Salomon, L. *et al.* [CCAFU Recommendations 2013: Prostate cancer]. *Prog. En Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol.* **23 Suppl 2**, S69–101 (2013).
33. Grossfeld, G. D. *et al.* Predicting disease recurrence in intermediate and high-risk patients undergoing radical prostatectomy using percent positive biopsies: results from CaPSURE. *Urology* **59**, 560–565 (2002).
34. Karakiewicz, P. I. *et al.* Prognostic impact of positive surgical margins in surgically treated prostate cancer: multi-institutional assessment of 5831 patients. *Urology* **66**, 1245–1250 (2005).
35. Johnson, C. W. *et al.* Prognostic indicators for long term outcome following radical retropubic prostatectomy for prostate cancer involving the seminal vesicles. *Urol. Oncol.* **22**, 107–111 (2004).
36. Surcel, C. I. *et al.* Prognostic effect of neuroendocrine differentiation in prostate

- cancer: A critical review. *Urol. Oncol.* **33**, 265.e1–7 (2015).
37. Kattan, M. W. Nomograms are superior to staging and risk grouping systems for identifying high-risk patients: preoperative application in prostate cancer. *Curr. Opin. Urol.* **13**, 111–116 (2003).
  38. Shariat, S. F., Kattan, M. W., Vickers, A. J., Karakiewicz, P. I. & Scardino, P. T. Critical review of prostate cancer predictive tools. *Future Oncol. Lond. Engl.* **5**, 1555–1584 (2009).
  39. Boström, P. J. *et al.* Genomic Predictors of Outcome in Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **68**, 1033–1044 (2015).
  40. Holmberg, L. *et al.* A randomized trial comparing radical prostatectomy with watchful waiting in early prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **347**, 781–789 (2002).
  41. Tosoian, J. J. *et al.* Intermediate and Longer-Term Outcomes From a Prospective Active-Surveillance Program for Favorable-Risk Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 3379–3385 (2015).
  42. Abdollah, F. *et al.* Long-term cancer control outcomes in patients with clinically high-risk prostate cancer treated with robot-assisted radical prostatectomy: results from a multi-institutional study of 1100 patients. *Eur. Urol.* **68**, 497–505 (2015).
  43. Rizk, J. *et al.* [Long term biochemical recurrence free survival after radical prostatectomy for cancer: comparative analysis according to surgical approach and clinicopathological stage]. *Prog. En Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol.* **25**, 157–168 (2015).
  44. Pierorazio, P. M. *et al.* Pathological and oncologic outcomes for men with positive lymph nodes at radical prostatectomy: The Johns Hopkins Hospital 30-year experience. *The Prostate* **73**, 1673–1680 (2013).
  45. Roehl, K. A., Han, M., Ramos, C. G., Antenor, J. A. V. & Catalona, W. J. Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results. *J. Urol.* **172**, 910–914 (2004).
  46. Wiegel, T. *et al.* Phase III postoperative adjuvant radiotherapy after radical prostatectomy compared with radical prostatectomy alone in pT3 prostate cancer with postoperative undetectable prostate-specific antigen: ARO 96-02/AUO AP 09/95. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 2924–2930 (2009).
  47. Thompson, I. M. *et al.* Adjuvant radiotherapy for pathologically advanced prostate cancer: a randomized clinical trial. *JAMA* **296**, 2329–2335 (2006).
  48. Bolla, M. *et al.* Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy: a randomised controlled trial (EORTC trial 22911). *Lancet Lond. Engl.* **366**, 572–578 (2005).
  49. Zietman, A. L. *et al.* Comparison of conventional-dose vs high-dose conformal radiation therapy in clinically localized adenocarcinoma of the prostate: a randomized controlled trial. *JAMA* **294**, 1233–1239 (2005).
  50. Pollack, A. *et al.* Prostate cancer radiation dose response: results of the M. D. Anderson phase III randomized trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **53**, 1097–1105 (2002).
  51. Bolla, M. *et al.* Short Androgen Suppression and Radiation Dose Escalation for Intermediate- and High-Risk Localized Prostate Cancer: Results of EORTC Trial 22991. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* (2016). doi:10.1200/JCO.2015.64.8055
  52. D’Amico, A. V. *et al.* 6-month androgen suppression plus radiation therapy vs

radiation therapy alone for patients with clinically localized prostate cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* **292**, 821–827 (2004).

53. Bolla, M. *et al.* Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* **360**, 103–106 (2002).

54. 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).

55. Masiello, D., Cheng, S., Bubley, G. J., Lu, M. L. & Balk, S. P. Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 26321–26326 (2002).

56. Scher, H. I. & Kelly, W. K. Flutamide withdrawal syndrome: its impact on clinical trials in hormone-refractory prostate cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **11**, 1566–1572 (1993).

57. Kucuk, O. *et al.* Phase II trial of bicalutamide in patients with advanced prostate cancer in whom conventional hormonal therapy failed: a Southwest Oncology Group study (SWOG 9235). *Urology* **58**, 53–58 (2001).

58. Smith, D. C. *et al.* A phase II trial of oral diethylstilbestrol as a second-line hormonal agent in advanced prostate cancer. *Urology* **52**, 257–260 (1998).

59. Goldenberg, L. *et al.* The role of 5-alpha reductase inhibitors in prostate pathophysiology: Is there an additional advantage to inhibition of type 1 isoenzyme? *Can. Urol. Assoc. J. J. Assoc. Urol. Can.* **3**, S109–114 (2009).

60. Attard, G. *et al.* Selective inhibition of CYP17 with abiraterone acetate is highly active in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 3742–3748 (2009).

61. 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).

62. 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).

63. Tran, C. *et al.* Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* **324**, 787–790 (2009).

64. Scher, H. I. *et al.* Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1187–1197 (2012).

65. Beer, T. M. *et al.* Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **371**, 424–433 (2014).

66. Bubley, G. J. *et al.* Eligibility and response guidelines for phase II clinical trials in androgen-independent prostate cancer: recommendations from the Prostate-Specific Antigen Working Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **17**, 3461–3467 (1999).

67. Kantoff, P. W. *et al.* Hydrocortisone with or without mitoxantrone in men with hormone-refractory prostate cancer: results of the cancer and leukemia group B 9182 study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **17**, 2506–2513 (1999).

68. Tannock, I. F. *et al.* Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **14**, 1756–1764 (1996).
69. Tannock, I. F. *et al.* Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1502–1512 (2004).
70. Petrylak, D. P. *et al.* Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1513–1520 (2004).
71. de Bono, J. S. *et al.* Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet Lond. Engl.* **376**, 1147–1154 (2010).
72. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 411–422 (2010).
73. Lü, C., Williams, A. K., Chalasani, V., Martínez, C. H. & Chin, J. Immunotherapy for metastatic prostate cancer: where are we at with sipuleucel-T? *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 99–108 (2011).
74. Parker, C. *et al.* Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 213–223 (2013).
75. Dellis, A. & Papatsoris, A. G. Phase I and II therapies targeting the androgen receptor for the treatment of castration resistant prostate cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 1–11 (2016). doi:10.1517/13543784.2016.1162784
76. Gelmann, E. P. Molecular biology of the androgen receptor. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20**, 3001–3015 (2002).
77. Black, B. E., Holaska, J. M., Rastinejad, F. & Paschal, B. M. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr. Biol. CB* **11**, 1749–1758 (2001).
78. Gao, W., Bohl, C. E. & Dalton, J. T. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chem. Rev.* **105**, 3352–3370 (2005).
79. Sack, J. S. *et al.* Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4904–4909 (2001).
80. Logothetis, C. J. *et al.* Molecular Classification of Prostate Cancer Progression: Foundation for Marker-Driven Treatment of Prostate Cancer. *Cancer Discov.* **3**, 849–861 (2013).
81. Chang, K.-H. *et al.* Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 13728–13733 (2011).
82. 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).
83. Mostaghel, E. A. *et al.* Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 5913–5925 (2011).
84. Linja, M. J. *et al.* Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* **61**, 3550–3555 (2001).
85. Geng, C. *et al.* Prostate cancer-associated mutations in speckle-type POZ protein



- (SPOP) regulate steroid receptor coactivator 3 protein turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6997–7002 (2013).
86. Mani, R.-S. The emerging role of speckle-type POZ protein (SPOP) in cancer development. *Drug Discov. Today* **19**, 1498–1502 (2014).
87. Jenster, G. Ligand-independent activation of the androgen receptor in prostate cancer by growth factors and cytokines. *J. Pathol.* **191**, 227–228 (2000).
88. Gregory, C. W. *et al.* A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res.* **61**, 4315–4319 (2001).
89. Bergerat, J.-P. & Céraline, J. Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum. Mutat.* **30**, 145–157 (2009).
90. Sanchez, D. *et al.* Androgen receptor mutations are associated with Gleason score in localized prostate cancer. *BJU Int.* **98**, 1320–1325 (2006).
91. Tilley, W. D., Buchanan, G., Hickey, T. E. & Bentel, J. M. Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2**, 277–285 (1996).
92. Taplin, M.-E. *et al.* Androgen Receptor Mutations in Androgen-Independent Prostate Cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2673–2678 (2003).
93. Culig, Z. *et al.* Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **7**, 1541–1550 (1993).
94. Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* **163**, 1011–1025 (2015).
95. Berrevoets, C. A., Umar, A., Trapman, J. & Brinkmann, A. O. Differential modulation of androgen receptor transcriptional activity by the nuclear receptor co-repressor (N-CoR). *Biochem. J.* **379**, 731–738 (2004).
96. Beltran, H. *et al.* Targeted Next-generation Sequencing of Advanced Prostate Cancer Identifies Potential Therapeutic Targets and Disease Heterogeneity. *Eur. Urol.* **63**, 920–926 (2013).
97. 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).
98. Balbas, M. D. *et al.* Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with rational drug design. *eLife* **2**,
99. Lallous, N. *et al.* Functional analysis of androgen receptor mutations that confer anti-androgen resistance identified in circulating cell-free DNA from prostate cancer patients. *Genome Biol.* **17**, (2016).
100. Dehm, S. M., Schmidt, L. J., Heemers, H. V., Vessella, R. L. & Tindall, D. J. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res.* **68**, 5469–5477 (2008).
101. 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).
102. Lapouge, G. *et al.* Specific properties of a C-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **617**, 529–534 (2008).
103. 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).
104. Marcias, G. *et al.* Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCa) cell line. *Hum. Mutat.* **31**, 74–80 (2010).
  105. Antonarakis, E. S. *et al.* AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1028–1038 (2014).
  106. Arora, V. K. *et al.* Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell* **155**, 1309–1322 (2013).
  107. Signoretti, S. *et al.* Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1918–1925 (2000).
  108. Guérin, O., Fischel, J. L., Ferrero, J.-M., Bozec, A. & Milano, G. EGFR Targeting in Hormone-Refractory Prostate Cancer: Current Appraisal and Prospects for Treatment. *Pharmaceuticals* **3**, 2238–2247 (2010).
  109. Scher, H. I. *et al.* Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1**, 545–550 (1995).
  110. Furuya, Y., Krajewski, S., Epstein, J. I., Reed, J. C. & Isaacs, J. T. Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2**, 389–398 (1996).
  111. Chen, Y., Martinez, L. A., LaCava, M., Coghlan, L. & Conti, C. J. Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1. *Oncogene* **16**, 1913–1920 (1998).
  112. Merson, S. *et al.* Focal amplification of the androgen receptor gene in hormone-naive human prostate cancer. *Br. J. Cancer* **110**, 1655–1662 (2014).
  113. Qu, Y. *et al.* Constitutively active AR-V7 plays an essential role in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Sci. Rep.* **5**, 7654 (2015).
  114. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182–1186 (1971).
  115. Holash, J., Wiegand, S. J. & Yancopoulos, G. D. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* **18**, 5356–5362 (1999).
  116. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
  117. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257 (2000).
  118. Trédan, O. *et al.* Angiogenesis and tumor microenvironment: bevacizumab in the breast cancer model. *Target. Oncol.* **10**, 189–198 (2015).
  119. Bigler, S. A., Deering, R. E. & Brawer, M. K. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum. Pathol.* **24**, 220–226 (1993).
  120. Macchiarini, P., Fontanini, G., Hardin, M. J., Squartini, F. & Angeletti, C. A. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet Lond. Engl.* **340**, 145–146 (1992).
  121. Erbersdobler, A. *et al.* Prognostic value of microvessel density in prostate cancer: a tissue microarray study. *World J. Urol.* **28**, 687–692 (2010).

122. Stoletov, K. *et al.* Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J. Cell Sci.* **123**, 2332–2341 (2010).
123. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 401–410 (2003).
124. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* **25**, 581–611 (2004).
125. Houck, K. A. *et al.* The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **5**, 1806–1814 (1991).
126. Ferrara, N. & Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4–25 (1997).
127. Zhang, H. T. *et al.* The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br. J. Cancer* **83**, 63–68 (2000).
128. Uthoff, S. M. S. *et al.* VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **101**, 32–36 (2002).
129. Catena, R. *et al.* Increased expression of VEGF121/VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* **120**, 2096–2109 (2007).
130. Shibuya, M. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* **312**, 549–560 (2006).
131. Kerbel, R. S. Tumor Angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2039–2049 (2008).
132. Dor, Y., Porat, R. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C1367–1374 (2001).
133. Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**, 677–684 (2003).
134. Cockman, M. E. *et al.* Hypoxia inducible factor- $\alpha$  binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 25733–25741 (2000).
135. Levy, A. P., Levy, N. S. & Goldberg, M. A. Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 25492–25497 (1996).
136. Milanini-Mongiat, J., Pouyssegur, J. & Pagès, G. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 20631–20639 (2002).
137. Arany, Z. *et al.* HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$ . *Nature* **451**, 1008–1012 (2008).
138. Richard, D. E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D. & Pouyssegur, J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 32631–32637 (1999).
139. Vartanian, R. K. & Weidner, N. Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* **73**, 844–850 (1995).

140. Weidner, N., Carroll, P. R., Flax, J., Blumenfeld, W. & Folkman, J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am. J. Pathol.* **143**, 401–409 (1993).
141. Gettman, M. T. *et al.* Role of microvessel density in predicting recurrence in pathologic Stage T3 prostatic adenocarcinoma. *Urology* **54**, 479–485 (1999).
142. Shabsigh, A. *et al.* Biomarker analysis demonstrates a hypoxic environment in the castrated rat ventral prostate gland. *J. Cell. Biochem.* **81**, 437–444 (2001).
143. Hsieh, A. C., Small, E. J. & Ryan, C. J. Androgen-response elements in hormone-refractory prostate cancer: implications for treatment development. *Lancet Oncol.* **8**, 933–939 (2007).
144. Mao, K. *et al.* The association of vascular endothelial growth factor receptor-1 with the risk of cancer progression following radical prostatectomy. *Oncol. Rep.* **19**, 171–175 (2008).
145. Tsourlakis, M. C. *et al.* VEGFR-1 overexpression identifies a small subgroup of aggressive prostate cancers in patients treated by prostatectomy. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 8591–8606 (2015).
146. Strohmeyer, D. *et al.* Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. *The Prostate* **45**, 216–224 (2000).
147. Doll, J. A. *et al.* Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *The Prostate* **49**, 293–305 (2001).
148. Morrissey, C. *et al.* Inhibition of angiopoietin-2 in LuCaP 23.1 prostate cancer tumors decreases tumor growth and viability. *The Prostate* **70**, 1799–1808 (2010).
149. Varkaris, A. *et al.* The role of HGF/c-Met signaling in prostate cancer progression and c-Met inhibitors in clinical trials. *Expert Opin. Investig. Drugs* **20**, 1677–1684 (2011).
150. Neufeld, G., Tessler, S., Gitay-Goren, H., Cohen, T. & Levi, B. Z. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog. Growth Factor Res.* **5**, 89–97 (1994).
151. Harper, M. E., Glynne-Jones, E., Goddard, L., Thurston, V. J. & Griffiths, K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostatic tumours and its relationship to neuroendocrine cells. *Br. J. Cancer* **74**, 910–916 (1996).
152. Ferrara, N. & Adamis, A. P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2016). doi:10.1038/nrd.2015.17
153. Kelly, W. K. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial comparing docetaxel and prednisone with or without bevacizumab in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: CALGB 90401. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 1534–1540 (2012).
154. Tannock, I. F. *et al.* Aflibercept versus placebo in combination with docetaxel and prednisone for treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer (VENICE): a phase 3, double-blind randomised trial. *Lancet Oncol.* **14**, 760–768 (2013).
155. Michaelson, M. D. *et al.* Randomized, placebo-controlled, phase III trial of sunitinib plus prednisone versus prednisone alone in progressive, metastatic, castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 76–82 (2014).
156. Petrylak, D. P. *et al.* Docetaxel and prednisone with or without lenalidomide in chemotherapy-naïve patients with metastatic castration-resistant prostate cancer

- (MAINSAIL): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **16**, 417–425 (2015).
157. Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R. & Folkman, J. Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1–8 (1991).
158. Murukesh, N., Dive, C. & Jayson, G. C. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors. *Br. J. Cancer* **102**, 8–18 (2010).
159. Georgiou, H. D., Namdarian, B., Corcoran, N. M., Costello, A. J. & Hovens, C. M. Circulating endothelial cells as biomarkers of prostate cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **5**, 445–454 (2008).
160. Bidard, F.-C. *et al.* Clinical value of circulating endothelial cells and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients treated first line with bevacizumab and chemotherapy. *Ann. Oncol.* **21**, 1765–1771 (2010).
161. Jain, R. K. *et al.* Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 327–338 (2009).
162. Yuanyuan Qu, B. D. Constitutively Active AR-V7 Plays an Essential Role in the Development and Progression of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Sci. Rep.* **5**, 7654 (2015).
163. Joseph, I. B., Nelson, J. B., Denmeade, S. R. & Isaacs, J. T. Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **3**, 2507–2511 (1997).
164. Hanson, J., Gorman, J., Reese, J. & Fraizer, G. Regulation of vascular endothelial growth factor, VEGF, gene promoter by the tumor suppressor, WT1. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **12**, 2279–2290 (2007).
165. Mabeesh, N. J., Willard, M. T., Frederickson, C. E., Zhong, H. & Simons, J. W. Androgens stimulate hypoxia-inducible factor 1 activation via autocrine loop of tyrosine kinase receptor/phosphatidylinositol 3<sup>′</sup>-kinase/protein kinase B in prostate cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 2416–2425 (2003).
166. Li, J., Wang, E., Rinaldo, F. & Datta, K. Upregulation of VEGF-C by androgen depletion: the involvement of IGF-IR-FOXO pathway. *Oncogene* **24**, 5510–5520 (2005).
167. Eisermann, K., Broderick, C. J., Bazarov, A., Moazam, M. M. & Fraizer, G. C. Androgen up-regulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site. *Mol. Cancer* **12**, 7 (2013).
168. Weidner, N. in (ed. Enzymology, B.-M. in) **444**, 305–323 (Academic Press, 2008).
169. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
170. Marusyk, A., Almendro, V. & Polyak, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* **12**, 323–334 (2012).
171. Schnitt, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **23 Suppl 2**, S60–64 (2010).
172. Vignot, S. & Soria, J.-C. [Discrepancies between primary tumor and metastasis: impact on personalized medicine]. *Bull. Cancer (Paris)* **100**, 561–568 (2013).
173. Gerlinger, M. & Swanton, C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br. J. Cancer* **103**, 1139–1143 (2010).

174. Gerlinger, M. *et al.* Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–892 (2012).
175. Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328–337 (2013).
176. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23–28 (1976).
177. Greaves, M. & Maley, C. C. CLONAL EVOLUTION IN CANCER. *Nature* **481**, 306–313 (2012).
178. Gerlinger, M. *et al.* Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat. Genet.* **46**, 225–233 (2014).
179. Vignot, S. *et al.* Next-generation sequencing reveals high concordance of recurrent somatic alterations between primary tumor and metastases from patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 2167–2172 (2013).
180. Goranova, T. E., Ohue, M., Shimoharu, Y. & Kato, K. Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors. *Clin. Exp. Metastasis* **28**, 427–435 (2011).
181. Yap, T. A., Gerlinger, M., Futreal, P. A., Pusztai, L. & Swanton, C. Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci. Transl. Med.* **4**, 127ps10 (2012).
182. Boutros, P. C. *et al.* Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat. Genet.* **47**, 736–745 (2015).
183. Gudem, G. *et al.* The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* **520**, 353–357 (2015).
184. Arnedos, M. *et al.* Precision medicine for metastatic breast cancer—limitations and solutions. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 693–704 (2015).
185. Grasso, C. S. *et al.* The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* **487**, 239–243 (2012).
186. Penton, A. L., Leonard, L. D. & Spinner, N. B. Notch signaling in human development and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 450–457 (2012).
187. Lin, L. *et al.* Targeting Specific Regions of the Notch3 Ligand-Binding Domain Induces Apoptosis and Inhibits Tumor Growth in Lung Cancer. *Cancer Res.* **70**, 632–638 (2010).
188. Park, J. T. *et al.* Notch3 Gene Amplification in Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **66**, 6312–6318 (2006).
189. Yamaguchi, N. *et al.* NOTCH3 Signaling Pathway Plays Crucial Roles in the Proliferation of ErbB2-Negative Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **68**, 1881–1888 (2008).
190. Doucas, H. *et al.* Expression of nuclear Notch3 in pancreatic adenocarcinomas is associated with adverse clinical features, and correlates with the expression of STAT3 and phosphorylated Akt. *J. Surg. Oncol.* **97**, 63–68 (2008).
191. Guo, G. *et al.* Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat. Genet.* **45**, 1459–1463 (2013).
192. Yen, W.-C. *et al.* Targeting Notch Signaling with a Notch2/Notch3 Antagonist (Tarextumab) Inhibits Tumor Growth and Decreases Tumor-Initiating Cell Frequency. *Clin.*

*Cancer Res.* **21**, 2084–2095 (2015).

193. Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J. & Maley, C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 924–935 (2006).
194. Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. & Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* **501**, 338–345 (2013).
195. Singh, V. M. *et al.* Analysis of the effect of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies. *Ann. Diagn. Pathol.* **17**, 322–326 (2013).
196. André, F. *et al.* Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol.* **15**, 267–274 (2014).
197. Le Tourneau, C. *et al.* Randomised proof-of-concept phase II trial comparing targeted therapy based on tumour molecular profiling vs conventional therapy in patients with refractory cancer: results of the feasibility part of the SHIVA trial. *Br. J. Cancer* **111**, 17–24 (2014).
198. Bubendorf, L. *et al.* Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum. Pathol.* **31**, 578–583 (2000).
199. Krebs, M. G., Hou, J.-M., Ward, T. H., Blackhall, F. H. & Dive, C. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2**, 351–365 (2010).
200. Stott, S. L. *et al.* Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18392–18397 (2010).
201. Heitzer, E. *et al.* Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med.* **5**, 30 (2013).
202. Riethdorf, S. *et al.* Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 2634–2645 (2010).
203. Attard, G. *et al.* Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* **69**, 2912–2918 (2009).
204. Hudson, A. M. *et al.* Using large-scale genomics data to identify driver mutations in lung cancer: methods and challenges. *Pharmacogenomics* **16**, 1149–1160 (2015).
205. Foo, J. *et al.* An Evolutionary Approach for Identifying Driver Mutations in Colorectal Cancer. *PLoS Comput. Biol.* **11**, e1004350 (2015).
206. Zhang, J. *et al.* Identifying driver mutations from sequencing data of heterogeneous tumors in the era of personalized genome sequencing. *Brief. Bioinform.* **15**, 244–255 (2014).

## Liste des publications et communications

### *Publications Nationales avec comité de relecture*

1. Pertuzumab et tumeurs solides : perspectives. **P Barthélémy**, J Leblanc, F Wendling, MP Wissler, JP Bergerat. Bull Cancer. 2014 Dec ;101(12) :1114-21.
2. Schémas de prescription alternatif du sunitinib dans les cancers du rein métastatique : de l'underground au grand public. Thiery-Vuillemin A, Mouillet G, Pouessel D, **Barthélémy P**, Caty A, Sebbagh S, Vanno YA, Laplaige P, Chevreaux C, Ravaut A Bull Cancer, 2014 Sep ;101(9) :832-40
3. Actualités et aspects pratiques de la chimiothérapie orale par capecitabine en cancérologie digestive. A. Sportes, **P. Barthélémy**, JE Kurtz Médecine thérapeutique. Volume 19, Numéro 2, 139-45, Avril 2013
4. Place de la chimiothérapie orale dans le cancer du sein métastatique chez la femme âgée. **Ph. Barthélémy**, I. Asmane - De la Porte, D. Heitz, E. Carola, JE Kurtz. JOG J Oncogériatr 2013 ; 4 (1) : 31-5
5. La place des biphosphonates en oncologie médicale. **P. Barthélémy**, I. Asmane, V. Litique, V Goldberg, JP Bergerat, JE Kurtz. Médecine thérapeutique. Volume 14, Numéro 5, 287-97, Septembre-Décembre 2008
6. Les effets secondaires des nouveaux traitements du cancer du rein. Médecine thérapeutique. I. Asmane, **P. Barthélémy**, S. Kim, B. Duclos, JP Bergerat, JE Kurtz. Volume 14, Numéro 5, 287-97, Septembre-Décembre 2008

### *Publications Internationales*

1. New mutations of the androgen receptor: New insights in the mechanisms of resistance to second generation of hormonotherapies in prostate cancer. **P Barthélémy**, F Cottard, E Erdmann, JE Kurtz, J Céraline. Human mutations in preparations
2. Effect of glandular metastases on overall survival of patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma in the antiangiogenic therapy era. Gravis G, Chanez B, Derosa L, Beuselinck B, **Barthélémy P**, Laguerre B, Brachet PE, Joly F, Escudier B, Harrison DJ, Laird A, Vasudev N, Ralph C, Larkin J, Lote H, Salem N, Walz J, Thomassin J, Sfumato P, Stawart GD, Boher JM, Renal Cross Channel Group. Urol Oncol. 2015 Dec 3. Pii: S1078-1439(15)00526-8.
3. Prognostic factors in second-line targeted therapy for metastatic clear-cell renal cell carcinoma after progression on an anti-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Sacré A, **Barthélémy P**, Korenbaum C, Burgy M, Wolter P, Dumez H, Lerut E, Loyson T, Joniau S, Oyen R, Debruyne PR, Schöffski P, Beuselinck B. Acta Oncol. 2015 Oct 23 :1-12
4. New generations of targeted therapies fighting the resistance in solid tumors. **P Barthélémy**, P Aftimos, A. Awada. Curr Opin Oncol. 2015 May;27(3):243-9



5. Evaluating the pharmacokinetics and pharmacodynamics of everolimus for treating breast cancer.  
A. Gombos, **P Barthélémy**, A Awada, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. Epub 2015 Feb 7
6. Adherence and patients' attitudes to oral anticancer drugs: a prospective series of 201 patients focusing on targeted therapies.  
**P Barthélémy**, I Asmane-De la Porte, N Meyer, B Duclos, S Serra, LM Dourthe, S Ame, V Litique, C Giron, V Goldbarg, L Fornecker, E Quoix, *JE Kurtz Oncology*. 2015;88(1):1-8
7. Angiogenesis and tumor microenvironment: bevacizumab in the breast cancer model O Trédan, M Lacroix-Triki, S Guiu, MA Mouret-Reynier, J Barrière, FC Bidard, AL Braccini, O Mir, C Villanueva, **P Barthélémy** *Target Oncol*. 2015 Jun;10(2):189-98
8. First report of Trastuzumab treatment after postoperative Takotsubo cardiomyopathy.  
M Burgy, H Brossat, **P Barthélémy**, A Imperiale, A Trinh, CA Hazam, JP Bergerat, Mathelin *C Anticancer Res*. 2014 Jul; 34(7):3579-82
9. Molecular Biology in Medical Oncology : diagnosis, Prognosis and Precision Medecine  
P Aftimos, **P Barthélémy**, A Awada. *Discovery Medicine*; ISSN: 1539-6509; *Discov Med*. 2014 Feb ;17(92) :81-91.Review
10. Pertuzumab: Beyond Breast cancer.  
**P Barthélémy**, J Leblanc, V Goldbarg, F Wendling, J-E Kurtz *Anticancer Res*. 2014 Apr;34(4):1483-91. Review.
11. Baseline cognitive functions among elderly patients with localized breast cancer  
M Lange, B Giffard, S Noal, O Rigal, J-E Kurtz, N Heutte, CLévy, D Allouache, C Rieux, J Lefèl, A Daireaux, B Clarisse, C Veyret, **P Barthélémy**, N Longato, F Eustache, F Joly *Eur J Cancer*. 2014 Sep ;50(13) :2181-9. Doi : 10. 1016/j.ejca. 2014.05.026. Epub 2014 Jun20.
12. mTOR inhibitors in advanced renal cell carcinomas : from evidence-based data to routine practices.  
**P Barthélémy**, B Hoch, C Chevreau, F Joly , B Laguerre, F Lokiec , B Duclos *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Mar 19. doi:p11: S1040-8428(13)00049-8. 10.1016/j.critrevonc.2013.02.006
13. Duration of Trastuzumab Treatment in routine practice.  
M Montserrat, D Leveque, **P Barthélémy**, J-P Bergerat *Anticancer Research* 2012 Oct; 32(10): 4585-8
14. New strategies for medical management of castration-resistant prostate cancer.  
Asmane I, Céraline J, Duclos B, Rob L, Litique V, **Barthélémy P**, Bergerat JP, Dufour P, Kurtz JE. *Oncology*. 2011;80(1-2):1-11. Epub 2011 May 16. Review
15. Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCa) cell line.  
Marcias G, Erdmann E, Lapouge G, Siebert C, **Barthélémy P**, Duclos B, Bergerat JP, Céraline J, Kurtz JE. *Human Mutation*, 2010 Jan; 31(1):74-80
16. Adjuvant chemotherapy in elderly patients with early breast cancer. Impact of age and comprehensive geriatric assessment on tumor board proposals.  
**Barthélémy P**, Heitz D, Mathelin C, Polesi H, Asmane I, Litique V, Rob L, Bergerat JP, Kurtz JE. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 Aug; 79(2):196-204. Epub 2010 Jul 23

## Communications Internationales

Pegylated liposomal Doxorubicin and Cyclophosphamide combination as first line chemotherapy in elderly metastatic breast cancer patients. A multicenter non randomised phase II study

**P. Barthélémy**, JE. Kurtz, A. Gonçalves, N. Meyer, D. Delozier, D. Serin, M. Nabet, P. Dufour. 22nd Annual Meeting A.O.R. Mondorf-les-Bains (13-14 January 2006), Oral Presentation

Adjuvant chemotherapy in elderly patients with early breast cancer. Impact of age and comprehensive geriatric assessment on tumor board proposals.

P. Barthélémy, D. Heitz, C. Mathelin, H. Polesi, I. Asmane, V. Litique, L. Rob, JP Bergerat, JE Kurtz - 10th SIOG Meeting 2009, Berlin, Oral Presentation

Constitutively Active Androgen Receptor in Prostate Cancer: Interconnection with Kinases Pathways.

**P. Barthélémy**, G. Marcias, C. Siebert, E. Erdmann, I. Asmane, JE. Kurtz, C. Saussine, JP. Bergerat, J. Céraline. - 10th EUCC, 7 Mai 2010 Strasbourg, Poster Session

Association Between False Beliefs And Use Of Complementary And Alternative Medicine In 844 Cancer Patients: A French AERIO Survey.

Rodrigues M, **Barthélémy P**, Rajpar S, Khoa T, Boudou-Rouquette P, Borchiellini D, Brugirard M, Barrière J, Guillaume F, Spano J-P on behalf of the AERIO study group. Esmo 2010- Poster Session - Eurocancer Juin 2010 - Session des Jeunes Oncologues ;

A retrospective Comparison of treatment Approaches in Two Groups of Age for the Elderly With Rectal Cancer,

Guillaume F., Nehme-Schuster H., Schumacher C., Ben Abdelghani M., Clavier J-B., **Barthélémy P**, Brigand C., Kurtz J-E., Noël G., ESMO 26-09-2011 – Oral presentation

Hypercalcitoninémie et tumeurs endocrines pancréatiques,

M-C. Taquet, F. Luca, L. Glasser, F. Gasser, P. Pessaux, J-E. Kurtz, **P. Barthélémy**, B. Goichot,, Poster 321, 28e Congrès Société Française d'Endocrinologie, 10-13 octobre 2011

Adjuvant Treatment of Early Stage HER2+ Elderly Breast Cancer Patients. A retrospective Multicentre French Study.

**P Barthélémy**, K Bassot, F Joly, I Ray-Coquard, G Freyer, P Dufour, F Campos, J-E Kurtz. ASCO 2012 - General Poster Session

Adherence and patients' attitude towards oral anticancer drugs. A prospective series of 226 patients focusing onto targeted therapies.

**Barthélémy P**, Dourthe LM , Serra S , Asmane-De la Porte I , Prim N , Amé S , Litique V , Giron C , Goldbarg V , Lioure B , Duclos B , Quoix E , Kurtz JE ESMO 2013, ASCO 2013 – Poster Session

Metastatic chromophobe renal cell carcinoma : outcome with targeted agents

E Colomba, L Albiges, C Saldana, G Verhoest, E Vauleon, P Bigot, S Lheureux, J Berger, **P Barthelemy**, B Escudier ESMO 2013 –Poster Session

Adjuvant Chemotherapy in elderly patients with triple-negative early breast cancer : A French Experience From a single institution

J.LebLANC, **P.Barthelemy**, M-P Wissler, D.Heitz, C.Mathelin, W.Waissi, J-E Kurtz. SIOG 2013 – Poster Session

Spirolactone: A selective androgen receptor modulator in castration-resistant prostate cancer.

**Philippe Barthelemy**, Eva Erdmann, Brigitte Duclos, Jean Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Ceraline – ASCO GU 2014 – Poster Session

Long-term responders to everolimus: A subgroup analysis of the sector study.  
**Philippe Barthelemy**, Bernard Escudier, Florence Joly, Lionnel Geoffrois, Brigitte Laguerre, Nadine Houede, Marine Gross-Goupil, Vano Yann-Alexandre, Olivier Lucidarme, François Bidault, Nadia Kelkouli, Stephane Oudard; ASCO-GU 2014 – Poster Session

Retrospective evaluation of tyrosine kinase inhibitor (TKI)-everolimus (eve) and/or TKI-eve- TKI sequences in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): A French survey—The sector study.  
Stephane Oudard, Florence Joly, Lionnel Geoffrois, Brigitte Laguerre, Nadine Houede, **Philippe Barthelemy**, Marine Gross-Goupil, Vano Yann-Alexandre, Olivier Lucidarme, François Bidault, Nadia Kelkouli, Bernard Escudier; ASCO-GU 2014- Poster Session

Adherence to anticancer therapy in the elderly experience from a prospective survey in a single institution  
C. Korenbaum, A. Paix, Y. Pin, **P Barthélémy**, L De Cock, S Zervos, V. Goldberg, S. Serra, B. Lioure, S. Ame, D. Heitz, JE. Kurtz SIOG-2015, Copenhagen – Poster Session

Communication booklet for geriatric patients: Final results of a faisability study in two Belgian centers  
L. Dal Lago, M. Paesmans, A. Duinslaeger, **P. Barthélémy**, C. Deliens, C. Martinez, M. Marvoet, A. Collard, G. Callens, S. Delaunois, JP. Praet, M. Roos SIOG-2015, Copenhagen – Poster Session

Cetuximab plus platinum-based chemotherapy in elderly patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma : A French experience from a single institution  
M. Burgy, **P. Barthélémy**, A. Dupret-Bories, P Truntzer, C Korenbaum, N Meyer, G Bronner, D Heitz, H Nehme, S Guihard, P Hemar, C Borel SIOG-2014, Lisbon – Poster Session

A phase I, first-in-human study of argx-111, a monoclonal antibody targeting c-met in patients with solid tumors.  
Philippe G. Aftimos, **Philippe Barthelemy**, Christian D. Rolfo, Valerie Hanssens, Natalie De Jonge, Karen Silence, Torsten Dreier, Hans de Haard, Marc Peeters, Alain Thibault, Ahmad Awada ASCO 2015 Poster Session

**VOIE DE SIGNALISATION DES ANDROGENES,  
ALTERATIONS GENOMIQUES ET PROGRESSION DU  
CANCER DE LA PROSTATE****Résumé**

La voie de signalisation du récepteur des androgènes (RA) reste une cible thérapeutique privilégiée dans les cancers de la prostate (CaP). Ce travail de thèse a abordé trois thématiques : 1) l'identification et l'étude fonctionnelle des mutations du RA, 2) l'étude du lien existant entre les RA tronqués, résultant de mutations non-sens, et l'angiogenèse tumorale et 3) l'étude exploratoire de l'hétérogénéité tumorale dans les CaP. Au cours de la 1<sup>e</sup> partie, nous avons identifié 90 mutations du RA à l'aide d'un test fonctionnel chez la levure et émis des hypothèses concernant leur implication dans de potentiels mécanismes de résistance à l'hormonothérapie (HT). La 2<sup>e</sup> partie nous a permis de montrer un lien entre les variants tronqués et l'expression du VEGF-A, médiateur principal de l'angiogenèse. Enfin dans la dernière partie nous avons étudié, par approche de séquençage à haut-débit, l'hétérogénéité tumorale en fonction du temps et du stade de la maladie. L'ensemble du travail a permis une meilleure connaissance des altérations de la voie de signalisation du RA, leur rôle dans les étapes clés de la progression tumorale et l'évolution des anomalies génomiques.

Mots clés : cancer de la prostate, hormonothérapie, récepteur des androgènes, mutations, angiogenèse, hétérogénéité tumorale

**Résumé en anglais**

The androgen receptor signaling pathway (AR) remains a prime therapeutic target in prostate cancer (PCa). This work focused on three topics: 1) the identification of AR mutations and their functional impact, 2) the assessment of a link between the truncated AR, resulting from nonsense mutations and tumor angiogenesis and 3) an exploratory study of tumor heterogeneity in PCa. In the first part, we identified 90 AR mutations using a yeast-based functional assay and speculated about their involvement in potential mechanisms to hormone therapy (HT) resistance. In the second part we assessed a link between the truncated AR and the overexpression of VEGF-A, the main proangiogenic factor. In the last part we investigated the tumor heterogeneity within the primary tumor and metastasis using a whole exome sequencing approach. This work leads to a better knowledge of the AR signaling pathway alterations, their role in the key steps of tumor progression and the evolution of genomic abnormalities.

Mots clés : Prostate cancer, Androgen receptor, hormone therapy, mutations, angiogenesis, tumor heterogeneity