

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2011

Thèse n° 1842

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie cellulaire et physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 Décembre 2011

Par Stéphane PUYO

Né(e) le 13 Décembre 1983 à Bordeaux

Recherche d'alternatives thérapeutiques aux taxanes dans les cancers de la prostate de hauts grades : Identification d'une signature prédictive de la réponse à l'oxaliplatine

Membres du Jury

M. Michel MOENNER, Professeur à l'université Bordeaux 1

M. François RADVANYI, Directeur de recherche CNRS, Paris

Mme. Gaëlle FROMONT-HANKARD, Professeur à l'université de Poitiers.

M. Gwendal LAZENNEC, Chargé de recherche INSERM, Montpellier

M. Jacques ROBERT, Professeur à l'université Bordeaux 2

M. Philippe POURQUIER, Chargé de recherche INSERM, Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

L'exercice de la rédaction reste un exercice solitaire, mais la thèse en elle-même est une grande épopée humaine. Par ces quelques lignes, je tiens donc à remercier l'ensemble des personnes qui, par leurs connaissances, leurs compétences, leurs qualités humaines ou tout à la fois, ont contribué à l'aboutissement de mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Alexis SERIKOFF**, représentant de la société Astellas, de nous avoir accordé sa confiance en sélectionnant notre projet parmi 57 autres projets européens. L'apport de 300 000 \$ de la part de la fondation Astellas Europe a été déterminant pour me permettre d'effectuer cette Thèse et de surcroît, dans d'excellentes conditions. Merci également de nous avoir invités à votre meeting annuel à Stockholm, ce voyage fut très enrichissant et notre sortie satellite à l'Ice Bar restera dans ma mémoire.

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe de recherche Validation et Identification de Nouvelles Cibles en Oncologie INSERM U916, dirigée par le Professeur **Josy REIFFERS**. Je le remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans ce laboratoire.

Je remercie mon directeur de Thèse **Philippe POURQUIER** de m'avoir offert la possibilité d'effectuer cette thèse sous sa direction. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée et l'autonomie qu'il m'a laissé acquérir.

Je remercie également les coordonateurs de ce projet, le Docteur **Nadine HOUEDÉ** pour ses précieux conseils et ses informations sur les essais cliniques. Enfin, je remercie le Professeur **Pierre RICHAUD** et le Professeur **Jacques ROBERT** pour avoir contribué à la réalisation de ce projet. Les compétences de chacun furent capitales pour la réalisation de ce projet.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur **Michel MOENNER** de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse ainsi qu'à Mme **Gaelle FROMONT-HANKARD**, Mr. **Francois RADVANYI** et Mr. **Gwendal LAZENNEC** d'avoir accepté d'examiner et de juger mon travail. Merci également à Mr. **Jacques ROBERT** d'avoir accepté de participer à ce jury.

Il est temps pour moi de remercier les personnes qui furent présentes dans le quotidien du laboratoire, parce qu'au bout de près de cinq années passées, certains arrivent, d'autres partent... Mais je n'oublierai jamais les personnes qui ont compté pour moi :

- Merci à **Francois**, à l'époque thésard alors que je n'étais qu'un petit étudiant naïf de Master2. Merci à toi de m'avoir accueilli dans le bureau et de m'avoir intégré à l'équipe. On aura passé des heures à parler bagnoles, sports en tous genres... C'était vraiment sympa. Je te remercie également de m'avoir appris à jouer au Poker.

- Je remercie **Pascal, Marion, Vincent** et **Alban** pour la bonne humeur que vous communiquez à tout le laboratoire.

REMERCIEMENTS

Puis vint mon époque de thésard, avec des souvenirs plein la tête, une maturité acquise et durant ces trois ans (et un peu plus) j'ai accueilli et vu passer beaucoup de personnes, certaines d'entre elles resteront toujours dans ma mémoire et vont beaucoup me manquer. Bien s'entendre avec ses collègues fut indispensable mais en faire de vrais amis fut plutôt inattendu.

- À ce titre, c'est sans surprise que je remercie **Émilie** pour avoir débarqué de nulle part et d'être rapidement devenue mon amie et mon meilleur compagnon de thèse. Ton arrivée, dans ton style caractéristique « salut je m'appelle Émilie... et toi ? », fut une vraie bouffée d'oxygène. Ta motivation, ton énergie et ton envie de faire bouger les choses m'auront toujours impressionné. Cette dépense d'énergie a un prix et j'aurai assisté à pas mal de tes siestes en salle de conf ! Je te remercie d'avoir instauré la pause cappuccino à 4h, c'est devenu notre « bonne pratique de laboratoire ». Je n'avais jamais rencontré quelqu'un qui faisait 5 repas par jour... je n'ai jamais compris où tu mettais tout ça. On a passé beaucoup de temps à discuter, à faire partager nos passions tellement différentes : tu peux regarder trois films d'affilé au ciné alors que j'ai du mal à tenir une heure sur une chaise ! Bref, côté manip, tu m'en auras fait voir de toutes les couleurs, avec tes mille et un problèmes en tous genres, mais on a formé un binôme efficace je pense. En deux ans, on aura essayé de faire bouger les choses, avec plus ou moins de réussite, ce fut une expérience très intéressante ! Il ne te reste qu'à améliorer tes facultés de politicienne et tu l'auras ce labo parfait dont tu rêves tant ! Pour finir, je te remercie d'avoir lu l'intégralité de mon manuscrit et d'avoir corrigé « quelques » fautes de syntaxe et d'orthographe ainsi que d'avoir grandement rectifié l'écriture de mon article, tu gères vraiment en anglais. À ce propos, je n'ai pas eu le courage de rédiger tes remerciements dans la langue de Shakespeare comme tu le souhaitais, j'espère que tu ne m'en tiendras pas rigueur... Je te remercie de ton soutien et de m'avoir supporté pendant la période très difficile de la rédaction... Pour tout ce que tu m'as apporté, infiniment merci !

- Je remercie **Sofiane**, d'avoir quitté son cher Paris pour la banlieue dans laquelle tu te demandais si tu recevrais l'électricité et Internet ! On aura formé un trio original Émilie, toi et moi. Tu fus un redoutable compagnon footeux pendant ces deux ans. Je te décerne à cette occasion le ballon d'or du chauvinisme, jamais tu n'auras lâché un centimètre de terrain, même quand tu avais tort mille fois haha ! On n'aura pas été souvent du même avis, mais c'est ça qui rendait nos discussions passionnantes, mais franchement, pour un supporter du Barça, t'as même pas une écharpe du club hein ! Et après ça vient critiquer le Real ? Ils devraient installer des radars automatiques au Camp-nou, parce que les mobylettes du Barça ne carburent pas à la Vittel c'est certain ! Et puis comment tu peux accepter que ton club parisien se prostitue devant les Qataris juste pour gagner quelques places au classement ? Tu n'auras jamais compris mon côté casanier, mais y'a rien à faire, pour moi le Nord commence au dessus de la Garonne, et il n'y a que ceux qui ont vécu dans le Sud-ouest, et plus particulièrement sur la côte Basque, qui peuvent comprendre. D'ailleurs, notre weekend « pays-basque » fut très sympa, alors t'as trouvé comment ? Ça te donne pas envie de rester ? C'est vrai que c'est vert et qu'il pleut pas mal mais pourquoi tout le monde vient en vacances chez nous alors ? Ton côté « je m'en fous de tout » m'aura déconcerté plus d'une fois, mais c'est ce qui t'a rendu agréable et rarement pénible. Je retiendrai particulièrement nos longues discussions sur le 11 Septembre. On en aura passé du temps à se prendre la tête avec ça et j'ai bien compris que c'était peine perdue ! Mais rappelle-toi « un jour on saura, suffit d'attendre ». À défaut de t'avoir convaincu du bonheur de vivre dans le Sud-ouest, je te souhaite de retrouver la civilisation de Paris à laquelle tu tiens tant, mais fais gaffe à tes poches...

REMERCIEMENTS

- Je tiens à remercier **Valérie**, ma « maman » du labo. Merci de m'avoir communiqué ta passion pour la recherche, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Tu as des capacités exceptionnelles pour encadrer les étudiants et nous t'en sommes tous reconnaissants. Je me souviendrai longtemps des galères qu'on a connues pour la mise au point du pyroséquençage... mais comment mettre au point un protocole qui marche quand on nous livre une machine défectueuse ? À ce sujet, je me rappellerai toujours cette anecdote où le réparateur du pyroséquençeur, après être venu plusieurs fois changer la quasi-totalité des pièces, me dit « bon en fait je savais depuis le début que c'était cette pièce là qui marchait pas... mais comme c'est celle qui nous coûte le plus cher je vous avais changé tout ce qu'il y avait autour en espérant que ça règle le problème » ! C'est vrai que quand on est en panne de moteur en voiture, on appelle un réparateur pour qu'il nous change la portière, en espérant que ça règle le problème... haha ! Merci infiniment pour ton soutien durant la rédaction de ce manuscrit et de m'avoir apporté beaucoup de conseils et de corrections.

- Comment pourrai-je continuer ces remerciements sans citer ma meilleure compagne du bureau, que j'aimais à appeler « **Chef Céline** » ! Mille mercis pour ton précieux soutien ! Ton actine ratée aura marqué ton arrivée au labo de la plus belle des façons et on aura bien rigolé pour ça ! Ta présence va beaucoup me manquer, j'aimais jouer le rôle de ton standardiste et te dire « Tiens Céline, c'est Barbara ! ». « Ma Lisa d'amour » va beaucoup me manquer aussi, je garderai toujours ses magnifiques dessins et tous ses cœurs qu'elle aimait me scotcher sur la poitrine. Les séances découpage/coloriage/collage auraient pu figurer dans le matériel et méthodes de ce manuscrit. Les fêtes de Bayonne en votre compagnie resteront dans ma mémoire, et je pense que Lisa se souviendra longtemps du réveil du Roi Léon ! Elle se souviendra peut-être un peu moins du Paquito géant... mais elle contribua quand-même au record du monde ! Quelle festayre !! Je te remercie aussi d'avoir été de si bon public lorsque je te racontais mes blagues un peu pourries et je me souviendrai de quelques fous rires mémorables en salle de confs, au Cancéropôle ou nos délires sur le label « éco » que l'on a attribué à notre laboratoire. Merci aussi pour notre voyage à Orlando et d'avoir grandement contribué à ce que ce voyage se passe si bien. Ce n'est qu'un au revoir, je sais qu'on sera amené à se voir régulièrement, en tous cas j'espère qu'on gardera un bon contact.

- Merci à toi **Anne-Lise** pour ces 4 années passées à tes côtés, à passer des heures à débattre de ta Twingo rose. J'ai appris que le rose s'appelait « lilas » parfois, que Longchamp était une marque de sac à main... Merci pour nos innombrables discussions sur les Girondins de Bordeaux, rencontrer une fille qui s'y connaissait autant que moi en foot m'a beaucoup étonné ! Tu fus, de surcroît, un renfort essentiel pour lutter contre l'invasion de notre laboratoire par les parisiens et les marseillais. Je me souviendrai longtemps de tes aventures dans l'hôtel un peu moisi de Limoges, ce fut marrant pour nous surtout, mais ça résume bien les situations abracadabrantesques dans lesquelles tu as une faculté unique pour te retrouver... Tu resteras également dans ma mémoire pour tes qualités de travail exceptionnelles et ta culture technique et scientifique impressionnante. Merci beaucoup du soutien, de ta disponibilité et du réconfort que tu m'as apporté lors de la rédaction de ce manuscrit.

- J'exprime toute ma gratitude à **Christophe**, qui resta un fidèle compagnon dans cette aventure. Merci mon pote pour ta présence, tes conseils pour la rédaction de ce manuscrit, ta bonne humeur quotidienne et pour nos longues discussions sur le sport en général, notre passion réciproque pour le sport fut une poutre de notre amitié. Je te remercie d'avoir été un si bon élève au Ping-pong, tu as montré une marge de progression impressionnante et tu seras devenu rapidement un adversaire redoutable. Il ne te reste plus qu'à perfectionner ton revers. Merci aussi pour nos parties de rami en revenant du self, nos matchs de tennis endiablés à la fac, les ploufs dans ta piscine et j'en

REMERCIEMENTS

passé... Au final tu représentas l'élément de distraction vital dans une vie de thésard et pour ça je t'en suis très reconnaissant.

- Je tiens à dédier un paragraphe de ces remerciements à tous les stagiaires que j'ai eu à encadrer durant ma thèse. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance et espère que votre stage sous ma direction vous aura été aussi agréable qu'il l'aura été de vous encadrer. Merci à **Marine**, tu ne seras restée qu'une semaine mais je me rappellerai longtemps de ta motivation et de ta bonne humeur. Je remercie grandement **Aurélien**, valeureux stagiaire de 1^e STL, ton rapport de stage rempli de franchise, de naïveté et d'insouciance restera dans les annales comme le rapport le plus sympathique qu'il nous aura été permis de lire. Je remercie également **Camille** d'avoir été patiente avec moi, lorsque je ne n'étais pas très disponible pour corriger ton manuscrit. Merci d'avoir été toujours agréable durant ton stage. J'aurai fini en apothéose avec la dernière, la stagiaire de tous les superlatifs... si petite et si pénible (d'après Simon !) mais si talentueuse et attachante ! Un grand merci **Laure** pour les 6 mois que tu as partagés avec moi. Encadrer une personne aussi sympathique que toi fut très facile et c'était un réel plaisir que de te transmettre mon savoir. Je me souviendrai de nos longues discussions sur le monde de la recherche et tu n'as jamais refusé le moindre de mes conseils. Pour cela, je t'exprime ma reconnaissance. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse !

- Je tiens à te remercier **Jean-Pierre**, notre loyal serviteur des commandes. Merci pour ta sympathie, tu resteras une de mes connaissances les plus anciennes dans ce laboratoire. Tu es une personne d'une extrême générosité et je te suis reconnaissant pour tout ce que tu apporté au laboratoire. L'explosion de ta pâte à crêpes restera un grand moment, et le plafond de la cafétéria s'en souvient encore ! Merci pour les kinders bueno, les Pipas et autres friandises que tu nous as ramenés d'Ibardin, lors de tes excursions « Orthèziennes ». Tu vis et tu respire la culture du Sud et pour ça je t'apprécie énormément. Bon courage à toi pour supporter nos chers Girondins dans ces moments difficiles.

- Merci **Carole**, pour avoir été une colocataire de bureau super agréable. Je te remercie pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.

- Un grand merci à **Brigitte**, qui me fut d'une aide plus que précieuse, je dirais même déterminante, dans mes démarches administratives. Merci de m'avoir sauvé de la paperasse plus d'une fois et de m'avoir toujours reçu avec sympathie.

- Merci à toi **Amélie**, pour ta sympathie, ton professionnalisme et ton dévouement envers les étudiants. Je suis très heureux d'avoir fait ta connaissance durant les douze mois que tu auras passés avec nous. Tu resteras à jamais la personne qui apporta les toutes premières corrections à ce manuscrit. Je t'en suis donc extrêmement reconnaissant.

- Je voudrai exprimer ma reconnaissance envers les courageux membres de l'équipe de Richard, en l'occurrence **Simon**, **Stéphanie**, les deux **Elodie** ainsi que **Laëtitia** pour la sympathie dont vous avez toujours fait preuve envers moi.

- En parlant de courage, comment ne pas être subjugué par la patience et le courage dont a fait preuve l'administration de la faculté de Bordeaux 2 face à mon incompétence à fournir toute la paperasse nécessaire à ma thèse ?? Vous aurez donc attendu 3 ans pour avoir ma carte d'identité, mes attestations en tous genres et mes diplômes... Pour ça je n'aurai jamais eu de carte étudiante mais l'essentiel est ailleurs. Merci pour votre patience.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous les participants de mon jeu « pronostics Ligue-1 » ! Merci donc à **Anne-Lise, Sofiane, Gaëlle, Christophe, Jean-Pierre, Émilie, Nicolas, Anne-Marie, Stéphanie et Ricardo** pour votre fidélité et avoir contribué à rendre ce jeu sympathique et cela, toujours dans un fair-play exemplaire. Merci à tous !

Merci également à tous les participants des soirées organisées par l'association des étudiants. Je me souviendrai des sorties à l'Ice bar de Bordeaux, à Pizza-Paï, au stade Chaban Delmas, ainsi que les quelques soirées Poker-Pizzas, qui resteront des moments très sympathiques.

Un grand merci à toute ma petite famille et spécialement à **mes parents**, pour m'avoir toujours soutenu pendant mes très longues études, je n'ai manqué de rien ! Merci Papa pour les nombreux trajets gratuits en train dont tu m'as fait profiter pendant mes épopées scolaires. Je vous serai éternellement reconnaissant pour tout ce que vous avez fait pour moi. Une mention spéciale à **Seb**, mon frère et coach de BMX, merci pour tous les tricks que tu m'as transmis pendant nos sessions des Week-end détente dans nos Parks du Sud !! Spéciale dédicace aux jeunes riders qui nous suivent partout et avec qui on partage plein de sessions mémorables, plein de trous dans les jambes aussi... hhaaaa les cranck-flips sans protec', ça passe souvent, mais des fois ça fait mal !! Merci donc à **Antoine, Tim, Flo et Garry** ! Un grand merci à notre sponsor **Monster Energy**, élément indispensable à la réussite de nos sessions.

Merci également à la « belle famille », **Michelle et Édouard**, d'être toujours aussi sympathique avec moi. Merci d'avoir rendu les victoires de Ferrari et les défaites de Renault encore plus réjouissantes, la F1 c'est souvent les rouges qui gagnent... un peu les autres de temps en temps quand même ! Merci à ma « belle-sœur » **Julie**, pour tout le respect et l'estime que tu as pour moi et pour les petits délires qu'on a souvent, « bonjour madame ! » Pour cela je garderai toujours des gâteaux apéritifs à l'oignon pour toi.

Un grand merci à la **famille CES**, ma famille de cœur avec qui j'ai grandi ! Merci à vous de m'avoir soutenu pendant mes études, tout particulièrement quand j'ai débarqué en BTS à Blanquefort ! Merci à **Popinou** d'avoir gentiment fait le taxi pour me ramener tard le soir, et même l'hiver quand je te réveillais après l'Équipe du dimanche et qu'il fallait gratter ta voiture gelée haha ! Merci à **Chipie** de squatter toujours la cheminée et de capter toute la chaleur parce qu'il faisait déjà assez chaud comme ça ! Merci à mes amies d'enfance **Jodie et Johanna** (et **Mylan** bien sûr), mes cousines de cœur, pour tous les moments extraordinaires qu'on passe ensemble et sans jamais se prendre la tête ! Merci également à **Jonathan**, même si on s'est un peu perdus de vue au fil des années, pour tout ce qu'on a vécu ensemble pendant notre enfance, avec certaines anecdotes secrètes qui valent le détour ! Merci **Annie** pour ta générosité et ton accueil toujours chaleureux ainsi que les innombrables services que tu rends tout autour de toi ! Chaque venue à la Rue de Marpuch, un retour aux sources, me fait toujours beaucoup de bien au moral ! Merci pour tout, vous comptez tous énormément pour moi.

Enfin, pour clore ces remerciements, mes pensées vont à **CÉLINE**, celle qui partage ma vie depuis plus de 8 ans déjà, avec qui je partage tant de moments magiques et qui a eu l'extrême courage de me supporter pendant l'épreuve ô combien difficile de la rédaction, cette thèse est un peu la tienne. Merci de m'avoir toujours soutenu et d'y avoir cru... souvent plus que moi ! Je te remercie du fond du cœur pour m'avoir expressément formé au traitement de texte (sauts de pages, sauts de sections etc.), au tableur, et de m'avoir sauvé plusieurs fois la mise lorsque je me prenais la tête pour insérer des figures, des tableaux, de la mise en forme en tout genre... bref tout

REMERCIEMENTS

ce que je détestais faire ! Pour tout ce que tu m'as apporté, pour tout ce que nous avons vécu mais aussi et tout simplement pour ce que tu es, Merci « ma puce » !

Je déteste les adieux, rédiger ces remerciements aura été un exercice difficile et très émouvant !

Je tenais à apporter une touche d'innovation à ce manuscrit en intégrant une petite partie de « non remerciements » dans un esprit évidemment humoristique :

- Je ne remercie pas Pascal BERSON de m'avoir fait croire que le code de la salle de patch-clamp était 118218 !

- Je ne remercie pas le Volcan Islandais au nom imprononçable, de nous avoir privés du congrès de l'AACR à Washington en Avril 2009 ! C'est ce qui s'appelle tomber à pic !

- Je ne remercie pas American Airlines d'avoir égaré nos posters, de nous avoir fait perdre 2 heures à New York et 10 heures au Terminal de Madrid et de n'avoir passé que des films pourris !

- Je ne remercie pas le club des Girondins de Bordeaux pour les derniers 18 mois pendant lesquels vous supporter aura été un calvaire, un cauchemar, un chemin de croix...

« Un repas sans saucisson, c'est comme une PCR sans Taq... ça marche pas !! »

Stéphane PUYO

2008-2011

Sommaire	11
Liste des figures	15
Liste des tableaux	19
Liste des abréviations	21
Liste des publications et communications	25
Résumés	27
INTRODUCTION - PARTIE I	29
I. CANCÉROGENÈSE	31
I.1. Cancer et mécanismes de l'oncogenèse	31
I.2. Les chiffres du cancer	35
II. CANCER DE LA PROSTATE	37
II.1. La glande prostatique - généralités	37
II.2. Epidémiologie	38
II.3. Etiologie.....	39
II.4. Dépistage / Diagnostic.....	44
II.5. Prise en charge thérapeutique	49
III. LA PROBLÉMATIQUE DES CANCERS DE HAUT GRADE	53
III.1. Mécanismes impliqués dans la transition du bas grade vers le haut grade.....	53
III.2. Essais cliniques pour le traitement des hauts grades	53
IV. LES SIGNATURES D'EXPRESSION PREDICTIVES DE REPONSE	60
IV.1. Obtention des signatures d'expression par les puces à ADN.....	60
IV.2. Signatures d'expression dans les cancers de la prostate	63
IV.3. Les signatures d'expression spécifiques des cancers de haut grade	64
IV.4. Signatures prédictives de réponse aux chimiothérapies	68
VI. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	72

INTRODUCTION - PARTIE II	75
I. LES SELS DE PLATINE	77
I.1. Historique	77
I.2. Les analogues du platine et leur utilisation thérapeutique	77
I.3. Modes d'action.....	79
I.4. Signature de réponse spécifique des DACH platines	80
II. ALTÉRATION DES VOIES MÉTABOLIQUES DANS LES HAUTS GRADES	82
III. LE MÉTABOLISME MONOCARBONÉ	83
III.1. Régulation du pool glycine – sérine	84
III.2. Cycle du THF	86
III.3. Cycle de la méthionine et de la méthylation de l'ADN	87
III.4. Dérégulation des voies métaboliques dans les cancers de la prostate.....	89
IV. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	94
MATÉRIEL ET MÉTHODES	97
I. CULTURE CELLULAIRE	99
I.1. Lignées cellulaires – cartes d'identités.....	99
I.2. Conditions de culture	101
I.3. Comptage des cellules.....	102
II. APPROCHE <i>IN SILICO</i>	103
II.1. Liste des lignées cellulaires du panel du NCI.....	103
II.2. Liste des gènes de l'étude	104
II.3. Corrélations expression / sensibilité	105
III. PRINCIPE DE LA VALIDATION FONCTIONNELLE IN VITRO	106
IV. TRANSFECTION TRANSITOIRE D'ARN INTERFÉRANT	107
V. TEST DE CYTOTOXICITÉ	109
V.1. Test de clonogénicité	110

V.2. Test au MTT.....	110
V.3. Coloration au cristal violet	111
VI. MESURE DE L'EXPRESSION DES GÈNES	111
VI.1. Mesure de l'expression au niveau protéique.....	111
VI.2. Mesure de l'expression des ARN messagers.....	113
VII. ANALYSE DE LA MÉTHYLATION DE LINE-1	120
VII.1. Extraction d'ADN génomique à partir des lignées	121
VII.2. Conversion au bisulfite de sodium.....	122
VII.3. Amplification de LINE-1 par PCR.....	123
VII.4. Pyroséquençage	124
VII.5. Analyse des résultats.....	126
 RÉSULTATS – PARTIE 1	 129
 I. APPROCHE IN SILICO	 131
I.1. Extraction des données de sensibilité des lignées cellulaires du panel	131
I.2. Voies cellulaires représentées dans la signature de True	133
I.3. Extraction des données d'expression de chaque gène dans les 59 lignées du panel	134
I.4. Regroupement des données d'expression et de sensibilité pour chaque gène	134
I.5. Elimination des puces de « mauvaise » qualité	135
I.3. Evaluation de la reproductibilité des données d'expression	138
I.4. Recherche de corrélations entre expression d'un gène et sensibilité à une drogue	140
I.6. Récapitulatif des résultats de corrélations obtenus.....	142
I.7. La signature spécifique des platines.....	149
 II. VALIDATION FONCTIONNELLE IN VITRO	 151
II.1. Caractérisation des lignées.....	151
II.2. Résultats préliminaires des tests de clonogénicité sur le gène SHMT2	152
II.4. Résultats des tests de cytotoxicité	154
II.5. Validation de la diminution d'expression des gènes par qRT-PCR.....	165

RÉSULTATS - PARTIE 2	167
I. ÉTUDE DU MODÈLE CHO 51-11 MUTÉ POUR SHMT2	169
II. ÉTUDE DE L'ISOFORME SHMT1	173
III. ALTÉRATION DU POOL GLYCINE-SÉRINE ET SENSIBILITÉ À L'OXALIPLATINE	174
IV. DEGRÉ DE MÉTHYLATION ET SENSIBILITÉ À L'OXALIPLATINE	176
DISCUSSION	181
I. APPROCHE IN SILICO ET VALIDATION FONCTIONNELLE	183
II. DÉRÉGULATION DU POOL GLYCINE-SÉRINE ET MÉTHYLATION	188
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	195

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Les grandes étapes du processus de cancérogenèse : l’initiation, la promotion et la progression.....	32
Figure 2 – Les différentes capacités sélectionnées par les cellules cancéreuses, adapté de (Hanahan et al. 2011).....	34
Figure 3 – Représentation de l’appareil reproducteur mâle.....	37
Figure 4 – Mécanismes de formation du gène de fusion TMPRSS2-ERG.....	43
Figure 5 - Grades de Gleason et degrés de différenciation de la tumeur (Gleason 1992).....	47
Figure 6 - Courbes de survie sans progression, de type Kaplan-Meier, en fonction du score de Gleason (GS) (Hull <i>et al.</i> 2002; Olivier Cussenot 2004).	48
Figure 7 - Principe général de l'hybridation comparative utilisant la technologie des puces à ADN (<i>microarray</i>).....	62
Figure 8 - Profil du niveau d'expression des gènes recherchés.	65
Figure 9 – Signature des 86 gènes dont le niveau d’expression permet de différencier les tumeurs de haut grade des tumeurs de bas grade (True et al. 2006).	66
Figure 10 – Structure des principaux dérivés des sels de platine.	78
Figure 11 - Schéma général du métabolisme monocarboné.	84
Figure 12 - Schéma de la régulation du pool de glycine et de sérine.	85
Figure 13 - Schéma du cycle du tétrahydrofolate.	87
Figure 14 - Schéma du cycle de la méthionine et de la méthylation de l'ADN.	88
Figure 15 – Représentation graphique de type <i>Heat-map</i> montrant les 87 métabolites dérégulés dans les cancers de la prostate. Selon ref.....	90
Figure 16 – Lien entre la dérégulation des métabolites dans les cancers de la prostate et le caractère invasif des cellules de cancers de prostate. Selon ref.....	91
Figure 17 - Schéma de l’approche <i>in silico</i>	105
Figure 18 - Principe général de la validation fonctionnelle <i>in vitro</i> (<i>voir texte</i>).	106
Figure 19 - Protocole de transfection des siRNA.....	109
Figure 20 – exemples de profils de qRT-PCR pour la détermination du <i>Cycle threshold</i> (Ct).	117
Figure 21 – Exemple de résultats de la qRT-PCR pour la comparaison du niveau d’expression de l’ARNm d’EIF4A1.....	119
Figure 22 – Principe de la conversion au bisulfite de sodium.....	122
Figure 23 - Purification du brin biotinylé avant séquençage.	124

LISTE DES FIGURES

Figure 24 - Principe du pyroséquençage et exemple de pyrogramme.	125
Figure 25 - Exemple de méthylation d'un CpG LINE-1 dans les lignées DU145 et LNCaP.....	127
Figure 26 – Mesure du taux de méthylation de LINE-1 pour les ADN contrôles (méthylation de 100 %, 66 %, 33 % et 0 %).....	128
Figure 27 - Exemple d'un fichier Excel regroupant les 4 jeux de données d'expression disponibles pour le gène PSMB1 dans les 59 lignées cellulaires du panel et les données de sensibilité aux 152 agents testés.	135
Figure 28 –Résultats des tests qualité utilisant le <i>package arraQualityMetrics</i> pour l'identification des <i>outliers</i>	137
Figure 29 – Exemple de résultats de tests de corrélation entre les différentes séries de données d'expression disponibles pour le gène DAD1.....	138
Figure 30 – Analyse de corrélation inter-séries, exemples de deux gènes.	139
Figure 31 - Exemple de calculs de coefficient de corrélation de Pearson pour le gène DAD1.	141
Figure 32 - Représentation graphique des différents types de résultats des tests de corrélations de Pearson obtenus.....	142
Figure 33 – (A) Mesure des profils d'expression des 9 gènes corrélés à l'oxaliplatine dans les lignées DU145 et LNCaP par rapport à la lignée BPH et (B) comparaison de ces profils avec le profil d'expression des mêmes gènes de l'étude de True <i>et al.</i> par le code couleur utilisé dans les expériences de <i>microarray</i> (C).	151
Figure 34 - Impact de la sous-expression du gène SHMT2 sur la sensibilité aux platines dans les 3 lignées.	153
Figure 35 - Effet de la sous-expression des gènes SHMT2, EIF4A1, RPL13, CD59, JUN, PCCB, RHOT2, DPM1 et CDKN2C (A à I) sur la sensibilité de la lignée DU145 à l'oxaliplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.	155
Figure 36 - Effet de la sous-expression des gènes SHMT2, EIF4A1, RPL13, CD59, JUN, PCCB, RHOT2, DPM1 et CDKN2C (A à I) sur la sensibilité de la lignée DU145 au cisplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.....	156
Figure 37 - Effet de la sous-expression des gènes SHMT2, EIF4A1, RPL13, CD59, JUN, PCCB, RHOT2, DPM1 et CDKN2C (A à I) sur la sensibilité de la lignée LNCaP à l'oxaliplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.....	157
Figure 38 - Effet de la sous-expression des gènes SHMT2, EIF4A1, RPL13, CD59, JUN, PCCB, RHOT2, DPM1 et CDKN2C (A à I) sur la sensibilité de la lignée LNCaP au cisplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.....	158
Figure 39 - Effet de la sous-expression des gènes SHMT2, EIF4A1, RPL13, CD59, JUN, PCCB, RHOT2, DPM1 et CDKN2C (A à I) sur la sensibilité de la lignée BPH à l'oxaliplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.....	159

LISTE DES FIGURES

Figure 40 - Effet de la sous-expression des gènes SHMT2, EIF4A1, RPL13, CD59, JUN, PCCB, RHOT2, DPM1 et CDKN2C (A à I) sur la sensibilité de la lignée BPH au cisplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.	160
Figure 41 – Représentation graphique correspondant aux résultats présentés dans le tableau 26 pour l’oxaliplatine.	163
Figure 42 - Représentation graphique correspondant aux résultats présentés dans le tableau 26 pour le cisplatine.....	164
Figure 43 - Vérification de la diminution de l'expression des gènes par qRT-PCR.....	165
Figure 44 – Comparaison de la sensibilité des cellules CHO K1 et CHO 51-11, inactivées pour SHMT2, aux dérivés du platine.	170
Figure 45 – Effet de l’oxalate sur la sensibilité des cellules CHO K1 et CHO 51-11 aux dérivés du platine.....	171
Figure 46 - Comparaison de la sensibilité des cellules CHO K1 et CHO 51-11 au dichloro(1,2-diaminocyclohexane)-platine(II).	172
Figure 47 - Comparaison de la sensibilité de la lignée DU145 à l'oxaliplatine par la diminution du niveau d'expression de SHMT1, SHMT2 et des deux SHMT simultanément.	173
Figure 48 – Effet de l’altération de l’équilibre glycine-sérine sur la sensibilité des lignées CHO à l'oxaliplatine.	175
Figure 49 – Lien entre le niveau de méthylation globale des lignées et la sensibilité aux dérivés du platine.....	177
Figure 50 - Effet de la modulation du niveau d’expression des SHMT sur le niveau de méthylation globale des lignées prostatiques.	178
Figure 51 - Effets de la 5-azacytidine sur le niveau de méthylation global de l’ADN des lignées cellulaires prostatiques.	179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Relation antécédents familiaux / risque de cancer de la prostate.....	40
Tableau 2 - Liste des gènes et des loci associés au risque de développer un cancer de la prostate (Gronberg 2003; Olivier Cussenot 2004).....	41
Tableau 3 – La classification TNM pour les cancers de la prostate.....	46
Tableau 4 - Tableau de correspondance entre le taux de PSA et le risque de cancer.	47
Tableau 5 – Les différentes stratégies de l'hormonothérapie du cancer de la prostate.	51
Tableau 6 – Les différentes signatures d'expression extraites de la base Oncomine permettant de discriminer entre différents stades d'évolution des cancers de la prostate.....	64
Tableau 7 - Liste des 59 lignées du panel du NCI.	103
Tableau 8 - Liste des 86 gènes de l'étude de True dont le niveau d'expression permet de prédire le grade d'une tumeur de prostate avec une fiabilité de 76 % (True et al. 2006).	104
Tableau 9 - Liste des siRNA utilisés.	108
Tableau 10 - Composition des gels de Western-Blot.	112
Tableau 11 - Liste des anticorps utilisés pour les Western-Blot.	113
Tableau 12 - Liste des amorces utilisées pour la qRT-PCR.	115
Tableau 13 - Composition du milieu réactionnel pour la qPCR.....	116
Tableau 14 – Les différentes étapes de la réaction de qPCR.	116
Tableau 15 - Etapes de la conversion au bisulfite.	123
Tableau 16 - Composition du mélange réactionnel de PCR pour l'amplification de LINE-1.	123
Tableau 17 - Liste des 152 agents antiprolifératifs qui ont été retenus pour l'étude in silico.....	132
Tableau 18 – Répartition des gènes de la signature parmi les voies cellulaires dans lesquelles ils interviennent, d'après le système de classification utilisé dans l'étude de True.	133
Tableau 19 - Liste des lignées cellulaires qui n'ont pas été pris en compte, en fonction du type de puce Affymetrix utilisées.....	137
Tableau 20 - Récapitulatif des couples gène / agent identifiés par l'analyse in silico (p < 0,05).	143
Tableau 21 - Résultats détaillés des corrélations gène/agent antiprolifératif identifiés par l'approche in silico – partie 1.	145
Tableau 22 – Suite du tableau 21.....	146
Tableau 23 - Liste des gènes dont le niveau d'expression est retrouvé corrélé à la sensibilité de l'agent considéré par l'approche in silico – partie 1.	147
Tableau 24 - Suite du tableau 23.....	148
Tableau 25 - Liste des gènes corrélés avec les dérivés des sels de platine.....	150

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 26 - Rapport des sensibilités aux platines dans les 3 lignées. 154

Tableau 27 - Résultats des tests de cytotoxicité montrant la modulation de la sensibilité aux platines dans les 3 lignées cellulaires, par la diminution du niveau d'expression de chacun des 9 gènes. 161

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AA	Acétate d'Abiratérone
ABC	ATP Binding Cassette
ABL	Abelson
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AKT	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
AMACR	Alpha-MethylAcyl-CoA Racemase
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APS	Ammonium PerSulfate
AR	Androgen Receptor
ARN 18S	ARN ribosomal 18S
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATIC	Aminoimidazole-4-carboxamide formyltransferase
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ATP5B	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
ATP5G3	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C3 (subunit 9)
ATP6V1F	ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F
AZGP1	Alpha-2-GlycoProtein 1, Zinc-binding
B	
BER	Base Excision Repair
BCL2	B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia/lymphoma 2
BGN	BiGlycaN
BPH	Benign Prostatic Hyperplasia
BRCA1	Breast CAncer 1
BRCA2	Breast CAncer 2
C	
CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein
CDKN2C	Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
CHO 51-11	Chinese Hamster Ovary 51-11
CHO K1	Chinese Hamster Ovary K1
CNS	Central Nervous System
COL1A2	COLlagen, type I, alpha 2
COXEN	COeXpression ExtrapolatioN
CRPC	Castration-Resistant Prostate Cancer
cSHMT	cytosolic SHMT
Ct	Cycle threshold
CYP17	Cytochrome P450, family 17
CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
D	
DAB2IP	DAB2 Interacting Protein
DACH	DiAmino-CycloHexane
DAD1	Defender Against cell Death 1
DHF	DiHydroFolate
DHFR	DiHydroFolate Reductase
DHT	Di-Hydro Testostérone

LISTE DES ABBREVIATIONS

DMSO	DiMéthyl-SulfOxide
DNMT	DNa-Methyl Transferase
<i>DPM1</i>	Dolichyl-Phosphate Mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit
<i>DPP4</i>	DiPeptidyl-Peptidase 4
DTP	Developmental Therapeutic Program
E	
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylen Diamine Tetracetic Acid
<i>EGF</i>	Epidermal Growth Factor
<i>EIF4A1</i>	Eukaryotic translation Initiation Factor 4A1
<i>ELAC2</i>	ELAC 2homolog (E.coli)
EMEA	European MEdecine Agency
<i>ERBB2</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
<i>ERCC-1</i>	Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
<i>ERG</i>	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)
<i>ET-1</i>	Récepteur aux endothélines
<i>ETS</i>	E Twenty-Six
<i>ETV1</i>	ETs Variant 1
<i>ETV4</i>	ETs Variant 4
<i>ETV5</i>	ETs Variant 5
F	
FDA	Food and Drug Administration
<i>FEN1</i>	Flap structure-specific EndoNuclease 1
<i>FGF</i>	Fibroblast Growth Factor
<i>FLJ35093</i>	Family with sequence similarity 73, member A
G	
GAPDH	GlycerAldehyde 3 Phosphate DeHydrogenase
GEO	Gene Expression Omnibus
Gly	Glycine
<i>GNMT</i>	Glycine N-Methyl Transferase
GS	Gleason Score
<i>GSK3</i>	Glycogen Synthase Kinase 3
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
H	
Hcy	Homo-Cystéine
<i>HER-1</i>	Epidermal growth factor receptor
<i>HER-2</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
<i>HMG</i>	High-Mobility Group
<i>HMGB1</i>	High-Mobility Group Box 1
<i>hMLH1</i>	Human MutL Homolog 1
<i>hMSH2</i>	Human MutS Homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1
<i>HOXC6</i>	Homeobox C6
<i>HPC1</i>	Hereditary Prostate Cancer 1
<i>HPC2</i>	Hereditary Prostate Cancer 2
<i>HPC20</i>	Hereditary Prostate Cancer 20
<i>HPCX</i>	Hereditary Prostate Cancer X

LISTE DES ABBREVIATIONS

HR	Homologous Recombination
HRPC	Hormone-Refractory Prostate Cancer
hUBF	Human Upstream Binding Factor
IC₅₀	Concentration inhibant 50 % de la croissance
IGF	Insulin-like Growth Factor
INCa	Institut National du Cancer
ITPR3	Inositol 1,4,5-TriPhosphate Receptor, type 3
JUN	JUN proto-oncogene
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LH-RH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
LINE-1	Long INterspersed Element 1
LNCaP	Lymph Node Cancer Prostate
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAQC	MicroArray Quality Control
MAT	Methionine Adenosyl-Transferase
MDR	Multi Drug Resistance
MDR1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
MEM	Minimum Essential Medium
MET	Méthionine
MIAME	Minimum Information About a Microarray Experiment
MLH	MutL Homolog
MMR	MisMatch Repair
MS	Méthionine Synthase
MSH	MutS Homolog
mSHMT	mitochondrial SHMT
MSR1	Macrophage Scavenger Receptor 1
MTHFR	Methylene Tetra-HydroFolate Reductase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MYBPC1	MYosin Binding Protein C, slow type
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCI	National Cancer Institute
NER	Nucleotide Excision Repair
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
P53	Tumor protein p53
P73	Tumor protein p73
PBST	PBS 1X + 0,1 % de Tween 20
PCA3	Prostate CAncer gene 3

LISTE DES ABBREVIATIONS

<i>PcaP</i>	Predisposing for Prostate cancer
<i>PCCB</i>	Propionyl CoA Carboxylase, beta polypeptide
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>PDGFRβ</i>	Platelet-Derived Growth Factor Receptor, beta polypeptide
P-gp	Glycoprotéine-P
PSA	Prostatic Specific Antigen
<i>PSMB1</i>	Proteasome (prosome, macropain) Subunit, Beta type, 1

qPCR quantitative PCR

RA	Récepteur aux Androgènes
<i>RAS</i>	Ras oncogene
<i>RB1</i>	Retinoblastoma 1
<i>RHOT2</i>	Ras HOMolog gene family, member T2
RNaseL	RiboNuclease L
ROS	Reactive Oxygen Species
<i>RPL13</i>	Ribosomal Protein L13

SAH	S-Adénosyl-Homocystéine
SAHH	S-Adénosyl-Homocystéine Hydrolase
SAM	S-Adénosyl-Méthionine
Sar	Sarcosine
<i>SARDH</i>	SARcosine DésHydrogénase
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
<i>SHMT</i>	Serine HydroxyMethyl Transferase
<i>SHMT1</i>	Serine HydroxyMethyl Transferase 1
<i>SHMT2</i>	Serine HydroxyMethyl Transferase 2
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
<i>SPARC</i>	Secreted Protein, Acidic, Cysteine-Rich (osteonectin)
SVF	Sérum de Veau Fœtal

TBP	TATA box Binding Protein
<i>TGFβ</i>	Transforming Growth Factor beta
THF	TétraHydroFolate
<i>TMPRSS2</i>	TransMembrane PRoteaSe, Serine 2
TNM	Tumeur Adénopathies Métastases
TOP2	ADN TOPoisomérase 2
<i>TOP2A</i>	ADN TOPoisomérase 2, isoform A
<i>TS</i>	Thymidilate Synthase

VEGF Vascular Endothelial Growth factor

XPD Xeroderma Pigmentosum, complementation group D

Publications scientifiques

Issues de cette thèse

Puyo S, Robert J, Richaud P, Pourquoiier P, & Houede N. *A gene expression signature predicting high grade prostate cancer response to oxaliplatin*. Molecular Cancer Therapeutics - soumis

Autres publications

Céline A, Montaudon D, **Puyo S**, Jacquet R, Elkaoukabi-Chaibi A, Quideau S, De Giorgi F, Ichas F & Pourquoiier P. *Vescalagin, a polyphenolic ellagitannin specifically inhibiting the alpha isoform of human DNA topoisomerase II*. Molecular Pharmacology – En cours de soumission

Puyo S, Le Morvan V, & Robert J. *Impact of EGFR gene polymorphisms on anticancer drug cytotoxicity in vitro*. Mol Diagn Ther **12**, 225-234 (2008).

Communications orales

Puyo S, Le Morvan V, & Robert J. *Recherche et identification des polymorphismes du gène de l'EGFR dans le panel des 60 lignées tumorales humaines du NCI*. Cancéropôle du Grand Sud-ouest (GSO) 2007, Bordeaux, France.

Puyo S, Robert J, Richaud P, Pourquoiier P, & Houede N. *Identification de gènes cibles et nouvelles thérapeutiques dans le cancer de la prostate de haut grade*. Comité Ligue Contre le Cancer Poitou-Charentes 2011.

Présentations poster

Puyo S, Robert J, & Le Morvan V. *Recherche et identification des mutations et des polymorphismes du gène de l'EGFR dans le panel des 60 lignées du National Cancer Institute*. Cancéropôle du Grand Sud-ouest (GSO) 2007, Bordeaux, France.

Puyo S, Robert J, Richaud P, Pourquoiier P, & Houede N. *Overexpression of serine Hydroxy Methyl Transferase 2 (SHMT2) in high grade prostate cancer as a marker of tumor response to oxaliplatin*. American Association for Cancer Research (AACR) congress. 2010 Washington, District of Columbia, USA.

Puyo S, Robert J, Richaud P, Pourquoiier P, & Houede N. *A gene expression signature which could predict high grade prostate cancer response to oxaliplatin*. American Association for Cancer Research (AACR) congress. 2011 Orlando, Florida, USA.

Puyo S, Robert J, Richaud P, Pourquoiier P, & Houede N. *A gene expression signature which could predict high grade prostate cancer response to oxaliplatin*. 2011 Journée Jeunes Chercheurs de la SFR TransBioMed, IECB, Bordeaux, France.

Identification de nouvelles alternatives thérapeutiques aux taxanes pour le traitement des cancers de la prostate de haut grade : exemple d'une signature prédictive de la réponse à l'oxaliplatine.

Les cancers de la prostate sont classés en deux catégories. Les cancers de haut grade se distinguent des cancers de bas grade par une plus forte agressivité et un pronostic plus mauvais. Lorsqu'ils deviennent résistants à l'hormonothérapie, les cancers de haut grade sont traités par une chimiothérapie basée sur les taxanes. Néanmoins, les taux de réponse restent faibles. Il existe donc un réel besoin quant à l'identification d'alternatives thérapeutiques qui soient spécifiques de ce type de tumeur. Dans cette optique, notre travail a été de proposer une telle alternative par une approche qui prenne en compte la génétique spécifique des cancers de haut grade. Nous avons exploité une signature de 86 gènes dont le niveau d'expression permet de discriminer entre les tumeurs de haut et de bas grade. Par une approche *in silico* originale utilisant la banque de données du NCI, nous avons identifié 382 corrélations entre le niveau d'expression de 50 gènes et la sensibilité à 139 agents antiprolifératifs. Parmi ces corrélations, nous avons identifié une signature de 9 gènes qui est spécifique de la réponse à l'oxaliplatine. Cette signature a été confirmée sur le plan fonctionnel dans les lignées cancéreuses prostatiques DU145 et LNCaP. Nous avons donc fourni la preuve de concept que notre approche permet d'identifier de nouvelles molécules pouvant être utilisées en alternative aux taxanes pour traiter spécifiquement les cancers de haut grade. Cette stratégie permet aussi d'identifier de nouveaux marqueurs (gènes) régulant la sensibilité à certains médicaments. Nos résultats démontrent par exemple le rôle des gènes SHMT, impliqués dans la régulation du métabolisme monocarboné, dans la sensibilité spécifique à l'oxaliplatine par un mécanisme qui fait intervenir, du moins en partie, une dérégulation du niveau de méthylation global de l'ADN.

Mots clés : cancer de la prostate, grade de Gleason, oxaliplatine, prédiction de réponse aux drogues.

Identification of new therapeutic alternatives to taxanes for the treatment of high grade prostate cancers: the example of a gene expression signature predicting response to oxaliplatin.

Prostate cancers are classified in two categories. High grade cancers are distinguished from low grade cancers by their higher aggressivity and worse prognostic. When they become refractory to hormone therapy, high grade cancers are treated with a taxane-based chemotherapy. However, response rates remain low. Therefore, there is a real need for the discovery of new therapeutic alternatives which are specific for this type of tumors. For that purpose, our work aimed at proposing such an alternative with a strategy that took into account the high grade genetic background. We exploited a signature of 86 genes for which expression level could distinguish between low grade and high grade tumours. With an original *in silico* approach, we searched the NCI databases and identified 382 correlations between 50 genes and the sensitivity to 139 antiproliferative agents. Among these, a signature of 9 genes was able to specifically predict cell response to oxaliplatin. This signature was validated at the functional level in two prostate cancer cell lines, DU145 and LNCaP. We have thus provided the proof-of-concept that our approach allows the identification of new drugs that can be used alternatively to taxanes in order to specifically treat high grade prostate cancers. This strategy also allows the identification of new markers (genes) regulating the sensitivity to various drugs. Our results demonstrate for example the implication of SHMT genes, which are involved in the regulation of the one-carbon metabolism, in the specific sensitivity to oxaliplatin, by a mechanism which involves, at least in part, the deregulation of the global level of DNA methylation.

Key words: Prostate cancer, Gleason grade, oxaliplatin, drug response prediction

INTRODUCTION - PARTIE I

Sommaire

I. CANCÉROGENÈSE	31
I.1. Cancer et mécanismes de l'oncogénèse	31
I.2. Les chiffres du cancer	35
II. CANCER DE LA PROSTATE	37
II.1. La glande prostatique - généralités	37
II.2. Epidémiologie	38
II.3. Etiologie	39
II.4. Dépistage / Diagnostic	44
II.5. Prise en charge thérapeutique	49
III. LA PROBLÉMATIQUE DES CANCERS DE HAUT GRADE	53
III.1. Mécanismes impliqués dans la transition du bas grade vers le haut grade	53
III.2. Essais cliniques pour le traitement des hauts grades	53
IV. LES SIGNATURES D'EXPRESSION PREDICTIVES DE REPONSE	60
IV.1. Obtention des signatures d'expression par les puces à ADN	60
IV.2. Signatures d'expression dans les cancers de la prostate	63
IV.3. Les signatures d'expression spécifiques des cancers de haut grade	64
IV.4. Signatures prédictives de réponse aux chimiothérapies	68
VI. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	72

I. CANCÉROGÈNE

I.1. Cancer et mécanismes de l'oncogène

Le cancer est une maladie décrite depuis l'Antiquité. Longtemps, il fut une maladie incurable et le mot garde encore de nos jours une charge symbolique puissante, évoquant des conséquences particulièrement sombres. Il n'existe pas un cancer mais une multitude de cancers pouvant se développer à partir de presque tous les tissus. Chacun possède ses propres caractéristiques. Il s'agit d'une prolifération incontrôlée de cellules normales se développant au sein de l'organisme. Cette transformation est la résultante d'une succession d'altérations génétiques qui vont progressivement déréguler les systèmes complexes assurant l'homéostasie cellulaire. De ce fait, un cancer est défini comme une pathologie multigénique.

La classification des cancers s'est établie selon le type de cellule, de tissu ou de l'organe affecté initialement. On distingue ainsi quatre grandes familles de cancer :

- Les carcinomes sont les plus fréquents (plus de 85 %). Ils représentent les tissus épithéliaux recouvrant les surfaces internes ou externes des glandes et des organes.

- Les sarcomes concernent les tissus conjonctifs de soutien, comme les os, la graisse ou les muscles. Ils sont cependant très rares (moins de 1 %).

- Les lymphomes sont les cancers du tissu hématopoïétique permettant la formation de toutes les cellules du sang. Les foyers impliqués sont le plus souvent les ganglions lymphatiques.

- Les leucémies concernent les tissus de la moelle osseuse responsable de la production des globules blancs.

La cancérogénèse est un processus long, pouvant s'étendre sur de nombreuses années, voire des décennies. Elle comprend trois grandes étapes successives : l'initiation, la promotion et la progression dont les conséquences sont résumées sur la figure 1.

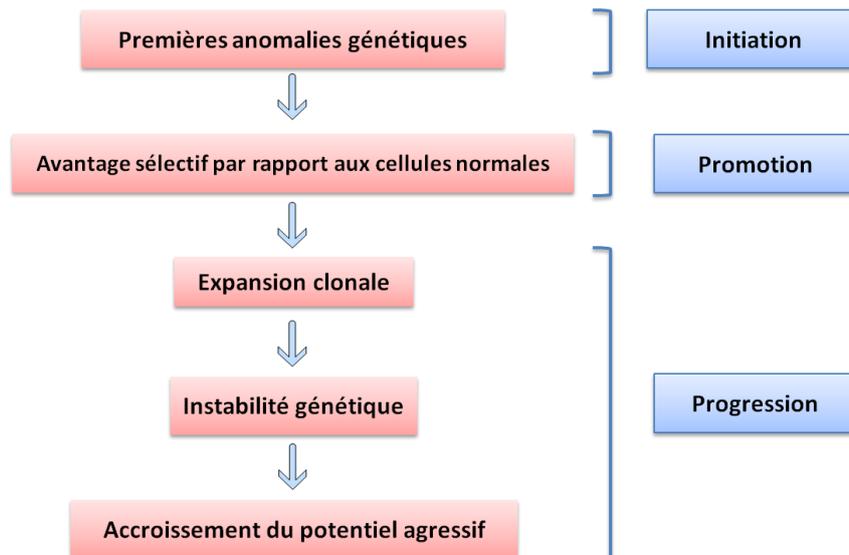


Figure 1 – Les grandes étapes du processus de cancérogenèse : l’initiation, la promotion et la progression.

Les cellules saines, qui sont l’élément de base des tissus, naissent, se divisent et se renouvellent de façon ordonnée en suivant un programme précis défini par leur patrimoine génétique. Lors de la réplication rapide des quelques 3,5 milliards de bases constituant le génome, l’ADN néo-synthétisé peut contenir des « erreurs de recopiage », modifiant la séquence des gènes et donc la fonction même de la cellule. Pour y faire face, des voies de détection et de réparation des anomalies répliquatives assurent à la cellule fille un patrimoine génétique strictement identique à l’original.

Notre ADN est constamment soumis à des agressions pouvant être endogènes ou exogènes. Les facteurs endogènes peuvent être héréditaires, certaines mutations de gènes prédisposant au développement d’un cancer. Les agressions exogènes, quant à elles, proviennent essentiellement des risques environnementaux. Elles sont en partie liées aux comportements à risque comme par exemple la consommation de tabac et d’alcool, à une mauvaise alimentation, ou à l’environnement comme l’exposition excessive aux radiations (UV du soleil, etc.). Ils sont également dus à des facteurs à risque comme des virus et bactéries, l’obésité et la pollution chimique (amiante, benzène, arsenic, etc.). Ils peuvent agir directement au niveau de l’ADN et provoquer des altérations pouvant modifier la séquence et donc aboutir à l’apparition de mutations.

Dans la majeure partie des cas, ces modifications de l'ADN passent inaperçues car elles sont corrigées par les mécanismes efficaces de réparation. Seulement, une mutation peut atteindre et déréguler un facteur appartenant à ces systèmes de contrôle et de réparation de l'ADN. C'est un événement rare comparé au nombre d'agressions subies par le génome. Ainsi, une mutation peut avoir un fort impact si elle survient sur une des trois classes de gènes importants comme les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes du système de réparation de l'ADN.

Les oncogènes (appelés proto-oncogènes à l'état normal et oncogènes lorsqu'ils sont mutés) font partie de la première classe. Ce sont les régulateurs positifs de la prolifération cellulaire. Sous leur forme oncogénique, ils deviennent hyperactifs et leur modification est dominante car il suffit qu'une des 2 copies du gène soit modifiée. Actuellement, plus de cent oncogènes ont été identifiés dont les plus connus sont les gènes de la famille Ras, le gène *MYC* ou encore Abelson (*ABL*).

La seconde classe comprend les gènes suppresseurs de tumeurs qui sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire, comme par exemple *TP53* (Tumor Protein 53), *BRCA1* (Breast Cancer 1) et *RB1* (retinoblastoma 1). Ces gènes, une fois mutés, acquièrent un pouvoir oncogénique.

La troisième classe correspond aux gènes des multiples systèmes de réparation qui sont capables de détecter et de réparer les lésions à l'ADN. Les gènes appartenant aux deux dernières classes sont souvent inactivés dans les cancers.

Dans ces trois cas, la cellule peut acquérir un avantage sélectif lié à la persistance d'une mutation non réparée, qui lui permettra de donner naissance à un premier clone de cellules anormales. À partir de là, la cellule cancéreuse sera capable à tout moment d'évoluer vers la sélection d'une deuxième population, plus remaniée que la première, sur le plan génétique.

C'est le processus dynamique de l'accumulation de mutations successives qui conduit à la formation de cellules cancéreuses à forte capacité de prolifération. Pour chaque type de cancer il a pu être mis en évidence une certaine spécificité des gènes altérés et une chronologie dans le développement des événements. Cette très grande diversité génétique est à la base de l'hétérogénéité de la pathologie cancéreuse.

Les capacités sélectionnées par les cellules cancéreuses, leur conférant un avantage, sont représentées sur la figure 2.

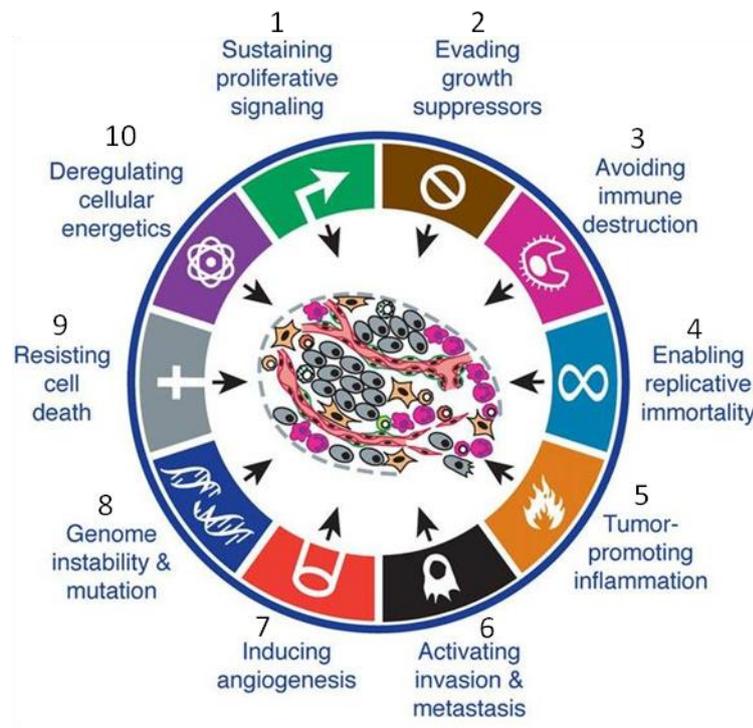


Figure 2 – Les différentes capacités sélectionnées par les cellules cancéreuses, adapté de (Hanahan et al. 2011).

1- Indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération. Les cellules cancéreuses peuvent proliférer même en absence d'une stimulation par des facteurs de croissance.

2- Échappement aux signaux inhibiteurs. Les gènes suppresseurs de tumeurs peuvent être inactivés dans les cellules cancéreuses, ce qui les rend insensibles aux signaux et aux mécanismes antiprolifératifs.

3- Résistance à la destruction immuno-dépendante. Les cellules cancéreuses peuvent échapper à leur reconnaissance par le système immunitaire ou bien en limitent l'efficacité.

4- Capacité proliférative illimitée. Les cellules tumorales peuvent se diviser sans limite, en utilisant des mécanismes comme une reprise de l'expression de la télomérase dans la majorité des cas, ou bien par d'autres mécanismes, comme par exemple, le mécanisme ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*).

5- Inflammation stimulant la progression tumorale. Il a été démontré que les cellules du système immunitaire inné ou adaptatif peuvent envahir le tissu tumoral et attirer des

cellules inflammatoires. Ces cellules, responsables de l'inflammation, peuvent excréter des molécules et notamment des espèces réactives de l'oxygène (ROS), hautement mutagènes, stimulant l'instabilité génétique des cellules tumorales.

6- Acquisition d'un pouvoir invasif. Les cellules tumorales ont la capacité de traverser les matrices extracellulaires et d'infiltrer les vaisseaux sanguins proches afin d'être transportées jusqu'à d'autres organes pour y former un foyer secondaire appelé métastase.

7- Capacité d'induction de l'angiogenèse. La tumeur a un besoin important en oxygène pour se développer. Les cellules tumorales peuvent acquérir la capacité d'induire la formation de vaisseaux sanguins en grande quantité au sein même de la tumeur pour répondre à cette demande.

8- Mutations et instabilité du génome. Au cours de la prolifération des cellules cancéreuses, l'apparition de nouvelles mutations leur permet d'acquérir un avantage sélectif par rapport aux cellules normales. Ces avantages peuvent aussi être acquis par des mécanismes épigénétiques tels que les modifications d'histones ou la méthylation de l'ADN.

9- Résistance à la mort cellulaire. Les cellules cancéreuses peuvent développer une capacité de prolifération par inactivation des voies impliquées dans la mort cellulaire.

10- Reprogrammation du métabolisme énergétique. Même en présence d'oxygène, les cellules cancéreuses peuvent détourner l'intégralité de leur métabolisme énergétique vers la glycolyse, au détriment du métabolisme oxydatif mitochondrial. Cela conduit à un état dit de « glycolyse aérobie » favorisant leur croissance.

I.2. Les chiffres du cancer

I.2.1. Incidence des cancers en hausse

Le nombre de nouveaux cas de cancer en France est estimé en 2010 à environ 357 500 (203 000 hommes et 154 500 femmes). L'incidence des cancers est en hausse, avec une progression de + 1,2 % chez l'homme et de + 1,4 % chez la femme en moyenne par an (INCa 2010). Le vieillissement global de la population ainsi que l'amélioration des diagnostics couplés au développement des dépistages pour certains cancers en sont probablement responsables. Chez l'homme, le cancer de la prostate reste de loin le plus fréquent, suivi par les cancers du poumon et les cancers colorectaux. Chez la femme, les trois cancers les plus

fréquents sont le cancer du sein, les cancers colorectaux et le cancer du poumon. Plus de la moitié des cas estimés en 2010 sont diagnostiqués chez des personnes de plus de 65 ans.

1.2.2. Mortalité par cancer en baisse

La mortalité par cancer, tout âge et toutes localisations confondus, a diminué au cours des vingt dernières années. Cette maladie représente néanmoins la première cause de décès chez l'homme (33 %) et la deuxième chez la femme (23 %) et elle reste la première cause de décès prématuré avant 65 ans. Chez l'homme, le cancer du poumon est la principale cause de décès, suivi par les cancers colorectaux et de la prostate. Chez la femme, il s'agit du cancer du sein suivi par les cancers colorectaux et du poumon. Le tabac constitue la première cause de décès liés au cancer en France, comme dans le monde.

Bien qu'étant la plus fréquente chez l'homme, la tumeur prostatique est une pathologie qui se soigne bien, la classant seulement au troisième rang des décès par cancer.

II. CANCER DE LA PROSTATE

II.1. La glande prostatique - généralités

II.1.1. Anatomie

La prostate est une petite glande de l'appareil génital masculin, d'environ 3 centimètres de hauteur et 4 centimètres de largeur. Elle possède deux lobes facilement palpables lors du toucher rectal. Elle est située sous la vessie en avant du rectum et entoure le début de l'urètre. Elle est séparée des autres organes par une capsule.

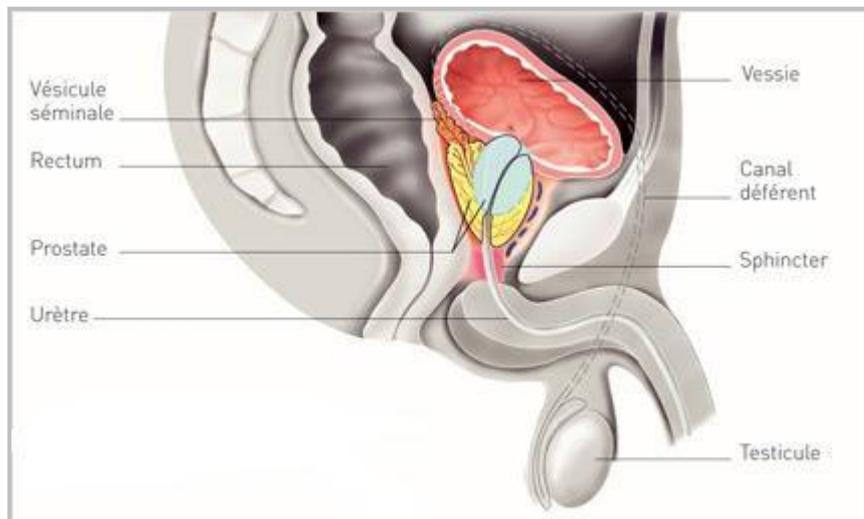


Figure 3 – Représentation de l'appareil reproducteur mâle.

La prostate se divise en trois zones :

- Une zone périphérique : elle est palpable au toucher rectal et elle constitue la plus grande région. Elle est le siège de la majorité des cancers (68 %) et des prostatites.
- Une zone de transition : elle est formée de deux petits lobes discoïdes situés de part et d'autre de l'urètre, canal qui traverse la prostate et représente environ 5 % de la glande jusqu'à l'âge de 40 ans. Avec le vieillissement, cette zone augmente en taille pour devenir la partie la plus importante. C'est ce qu'on appelle l'hypertrophie bénigne de la prostate qui survient chez presque tous les hommes de plus de 70 ans. Elle est le siège de 22 % des cancers de la prostate.

- Une zone centrale : c'est la base de la glande et elle entoure les canaux éjaculateurs. Elle représente 20 % de la prostate. Elle est rarement le terrain de développement de cancer (10 %).

Le rôle de cette glande est de produire le liquide séminal qui entre dans la composition du sperme. Il n'est absolument pas indispensable à la fécondité, mais la favorise.

II.1.2. Pathologies

Il existe trois pathologies principales de la prostate :

- L'hypertrophie bénigne de la prostate est liée à l'hypertrophie des structures glandulaires de la zone de transition. C'est une affection non cancéreuse à évolution lente. Elle débute progressivement chez l'adulte à partir de 30 ans mais ne s'exprime généralement qu'à partir de 40 ans pour ensuite augmenter en fréquence avec l'âge. Il n'existe pas de relation linéaire entre le volume de la prostate et l'intensité des troubles ressentis par le patient. Une prostate peut être très volumineuse et ne pas entraîner de troubles urinaires importants.

- La prostatite est une inflammation ou une infection de la prostate. Elle est responsable de troubles génito-urinaires le plus souvent gênants, voire parfois très invalidants en raison d'un inconfort ou de douleurs du bassin. Si elles deviennent chroniques, elles altèrent la qualité de la vie quotidienne (difficultés à rester assis, à pratiquer une activité physique et/ou sexuelle). Les prostatites concernent les sujets de tous âges avec une prédominance dans la tranche d'âge 30-50 ans.

- La troisième pathologie est le cancer de la prostate. L'adénocarcinome représente environ 95 % des tumeurs et son développement est sous la dépendance des androgènes. À la différence des pathologies non cancéreuses, ce cancer est beaucoup plus nocif pour la sexualité, puisque toutes les fonctions sexuelles peuvent être plus ou moins sévèrement lésées. Cependant, le traitement est beaucoup plus en cause que les symptômes du cancer dans la genèse des troubles sexuels (Bondil P.).

II.2. Epidémiologie

Le cancer de la prostate est le cancer masculin le plus fréquent en France et dans les pays occidentaux en général. Il se situe au premier rang des cancers incidents chez l'homme, loin devant les cancers du poumon et les cancers colorectaux (INCa 2010). À l'heure actuelle, un

homme sur neuf sera atteint d'un cancer de la prostate. La population d'hommes âgés de plus de 50 ans représente, en France, environ huit millions de personnes. On estime que trois millions d'entre elles (environ 40 %), présentent des cellules cancéreuses dans leur prostate.

Bien que son incidence augmente constamment depuis l'introduction du dosage du PSA (*Prostatic Specific Antigen*) dans les années 1980, la mortalité est globalement stabilisée. Celle-ci reste faible, si on la compare au très grand nombre de cancers prostatiques latents, puisque plus de 90 % des patients mourront d'une autre cause.

Il est maintenant connu que le cancer de la prostate est une maladie multifactorielle. Des prédispositions génétiques jouent un rôle prédominant dans la cancérogenèse prostatique, auxquelles vient s'ajouter de nombreux facteurs environnementaux. Ceux-ci incluent des facteurs tels que l'obésité, le tabac, l'alcool, la consommation d'anti-inflammatoires, l'apport de vitamine D et E, de minéraux (calcium, sélénium, zinc) ainsi que l'activité sexuelle. L'exposition à des pesticides toxiques et cancérigènes semble également constituer un facteur de risque (Belpomme et al. 2009). Le niveau d'expression de certaines hormones telles que les androgènes, les œstrogènes, l'insuline etc. peut également varier en fonction des prédispositions génétiques individuelles (Kral et al. 2011). Des études ont montré une forte relation entre la survenue des cancers prostatiques et le mode de vie. En effet, l'incidence de cette pathologie chez les Asiatiques vivant en Asie est la plus faible du monde. Cependant, cette incidence augmente rapidement lorsque cette population vit dans d'autres régions du monde et notamment aux USA (Robbins et al. 2007). De façon similaire, des Afro-Américains ont un cancer plus agressif que des Caucasiens habitant pourtant la même région (Robbins et al. 2007). Une des explications avancée est la combinaison de différences de polymorphismes de gènes de susceptibilité par rapport à l'exposition à des facteurs environnementaux et au mode de vie (Gronberg 2003).

II.3. Etiologie

II.3.1. Les risques liés à la génétique

L'importance des facteurs génétiques concernerait une proportion de cancers de la prostate diagnostiqués à un jeune âge (43 % chez les hommes de plus de 55 ans ; 34 % chez les plus de 70 ans et 9 % chez des hommes de plus de 85 ans). En effet, des études ont été menées pour tenter d'évaluer la part des facteurs génétiques et leur mode d'hérédité dans ces

formes familiales (Carter et al. 1992). Elle conclut à la survenue d'une forme familiale de cancer de prostate dans 13 à 26 % des cas. Il est alors possible d'établir, pour chaque facteur génétique, un degré de probabilité de survenue du cancer. Cela implique que des mutations d'un gène peuvent sensibiliser un individu à développer la maladie.

Des cancers sporadiques apparaissent chez des patients sans antécédents familiaux. En revanche, les cancers « dits » familiaux affectent au moins deux hommes d'une même famille et les cancers « dits » héréditaires touchent au moins trois hommes d'une même famille sur trois générations consécutives.

La relation entre les antécédents familiaux et le risque de développer un cancer de la prostate est présenté dans le tableau 1.

Antécédents familiaux	Risque relatif	Risque absolu (%)
Aucun	1	8
Père ou frère	2	15
Père ou frère < 60 ans	3	20
Père et frère	4	30
Cancer de la prostate héréditaire	5	35-45

Tableau 1 - Relation antécédents familiaux / risque de cancer de la prostate.

Cependant, il n'existe pas de différence en termes de survie, d'agressivité et de rechute entre ces trois groupes.

À ce jour, des études globales du génome ont permis l'identification de gènes et de loci de susceptibilité au cancer de la prostate. Ces gènes sont impliqués dans l'apparition des cancers héréditaires.

Les gènes identifiés sont indiqués dans le tableau 2 (Gronberg 2003; Olivier Cussenot 2004).

Localisation	Gène/Locus candidats	Détails sur le gène et/ou le locus
1q25.3	<i>RNaseL/HPC1</i>	Ribonucléase L / Hereditary Prostate Cancer 1 Activité endoribonucléasique
1q42.2-43	<i>PcaP</i>	Predisposing for prostate cancer
17p11	<i>ELAC2/HPC2</i>	elaC 2 homolog (E.coli) / Hereditary Prostate Cancer 2 Activité endoribonucléasique
8p22-23	<i>MSR1</i>	Macrophage Scavenger Receptor 1 Initiateur et effecteur de l'inflammation
Xq27-28	<i>HPCX</i>	Hereditary Prostate Cancer X
20q13	<i>HPC20</i>	Hereditary Prostate Cancer 20
17q21	<i>BRCA1</i>	BReast Cancer 1
13q12-13	<i>BRCA2</i>	BReast Cancer 2

Tableau 2 - Liste des gènes et des loci associés au risque de développer un cancer de la prostate (Gronberg 2003; Olivier Cussenot 2004)

En 2000, une étude a identifié que la région 1q24-25 du chromosome 1 contenait un gène de prédisposition au cancer de la prostate (Xu 2000). Des mutations du gène codant la ribonucléase L sont associées à une augmentation du risque du cancer de prostate et sont associées à des hauts scores de Gleason (Meyer et al. 2010). En 2001, le locus PcaP fut trouvé associé à des cas de cancers de prostate héréditaires chez des familles originaires du Sud et de l'Ouest de l'Europe (Cancel-Tassin et al. 2001). La mutation non-sens du gène *ELAC2* sur le chromosome 17 a été montrée comme jouant un rôle dans la susceptibilité aux cancers de prostate héréditaires. D'autres altérations de ce gène n'influencent pas ce risque, suggérant qu'il ne joue qu'un rôle limité sur la forme héréditaire de ce cancer ou que d'autres gènes sont impliqués (Wang et al. 2001). D'autres loci pour des gènes de prédisposition aux formes héréditaires ont été identifiés : HPCX (Lange et al. 1999) et HPC20 (Bock et al. 2001).

Certains gènes candidats ont été étudiés dans les loci identifiés, comme par exemple le gène *MSR1*. Il avait été proposé que les mutations de séquence puissent augmenter le risque de cancer de prostate héréditaire, mais plusieurs études n'ont pas pu le démontrer. Une de ces mutations (R293X) a néanmoins été associée à un diagnostic plus précoce de la maladie (55,4 contre 65,4 ans) (Seppala et al. 2003; Wang et al. 2003). Les gènes *BRCA1* et *BRCA2*,

quant à eux, prédisposent aux cancers du sein héréditaire, mais ont également été évoqués pour le cancer de prostate (Gayther et al. 2000; Edwards et al. 2003; Douglas et al. 2007).

Des polymorphismes génétiques ont aussi été associés à un risque individuel ou familial accru. Ils pourraient expliquer les importantes variations d'incidence observées entre les populations. Un polymorphisme est une variation génétique présente dans au moins 1 % de la population. Elle peut porter sur la modification d'une seule base (*SNP : Single Nucleotide Polymorphism*), une substitution/délétion d'une ou plusieurs bases conduisant à une modification du cadre de lecture ainsi que le nombre variable de la répétition d'un motif (microsatellite). Parmi les nombreux gènes impliqués sont retrouvés des gènes importants comme le récepteur aux androgènes (RA), deux gènes appartenant à la famille des cytochromes (CYP17 et CYP1B1), un gène codant un facteur de croissance (VEGF), *TP53*, un gène codant une enzyme du peroxisome de type racémase (*AMACR*), un gène impliqué dans la réparation de l'ADN par excision de base (*XPD*), etc. (Olivier Cussenot 2004).

À l'inverse de ces mutations ou SNP, d'autres altérations génétiques sont retrouvées de manière beaucoup plus fréquente. Dans les cancers de la prostate, elles concernent le gène codant le récepteur aux androgènes et le gène de fusion *TMPRSS2/ERG*.

II.3.2. Récepteur aux androgènes et métabolisme hormonal

Le gène codant le récepteur aux androgènes est situé sur une des régions du génome les plus conservées, le locus q12 situé sur le chromosome X ; les mutations y sont rares. Une fois activé, il agit comme un facteur de transcription en se fixant sur des régions spécifiques (*androgen responsive elements*) et régule l'expression de nombreux gènes androgéno-dépendants comme le PSA, les facteurs de croissance *EGF*, *VEGF*, *IGF* et *KGF*.

Des différences de taille du gène codant le RA sont rencontrées dans différentes ethnies. Ces polymorphismes concernent des microsatellites situés dans la région N-terminale du gène. Il y a deux séquences répétées (CAG et GGC) décrites comme affectant la transcription et l'activation du gène. Une étude a montré que des patients arborant moins de 22 répétitions du motif CAG ont trois fois plus de risque de développer le cancer de prostate. La présence de 16 répétitions du motif GGC est aussi associée à une augmentation du risque (Irvine et al. 1995). Ces polymorphismes conduisent à des formes plus agressives de cancers prostatiques, dues notamment à une plus forte affinité de liaison au ligand (Gronberg 2003).

II.3.3. Gènes de fusion dans les tumeurs sporadiques

Certaines altérations présentes dans les cancers sporadiques sont la résultante d'une translocation aboutissant à une fusion de gènes. L'exemple le plus étudié est celui du gène de fusion *TMPRSS2-ERG* qui résulte de la fusion de la partie 5' du gène *TMPRSS2*, dont le promoteur est fortement régulé par le récepteur aux androgènes, avec la partie N-terminale du gène *ERG*, qui encode un facteur de transcription de la famille des ETS. Ce mécanisme est présenté figure 4.

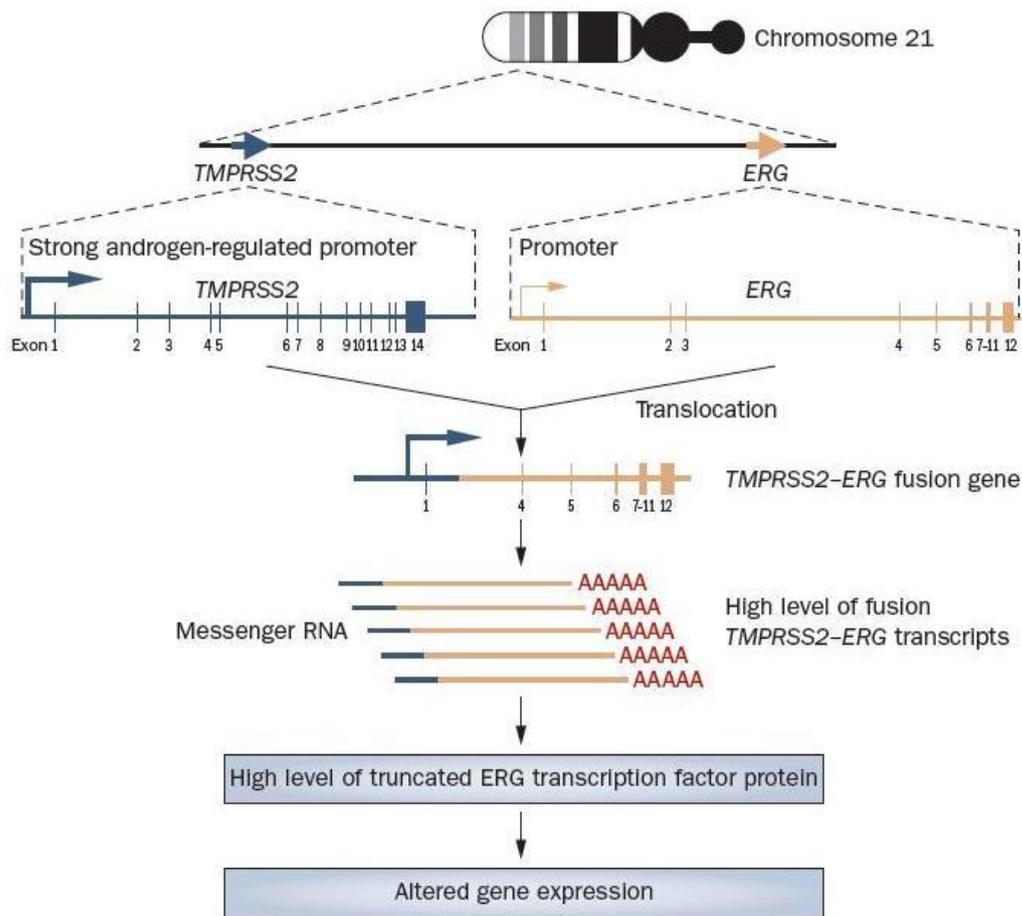


Figure 4 – Mécanismes de formation du gène de fusion *TMPRSS2-ERG*.

*Le promoteur du gène *TMPRSS2* contenant une séquence de fixation du récepteur aux androgènes est fusionné au gène *ERG* (à l'exception des 3 premiers exons). Sous l'influence des androgènes, ce gène de fusion conduit à une forte expression de la protéine *TMPRSS2-ERG* conduisant à la dérégulation des gènes cibles de *ERG* (Clark et al. 2009).*

**TMPRSS2* encode un récepteur transmembranaire de type II à activité sérine protéase. Il est majoritairement exprimé dans l'intestin et faiblement dans la prostate, le colon, l'estomac et la glande salivaire. Dans le tissu prostatique, il est majoritairement exprimé dans les cellules*

épithéliales. Son expression est fortement régulée par les androgènes et se trouve fortement induite dans les lignées cellulaires de la prostate hormono-sensibles. Sous l'influence des androgènes, ce gène fusionné exprime une grande quantité de protéines ERG tronquées, conduisant à l'activation de multiples gènes par le domaine de liaison à l'ADN de *ERG* (Tomlins et al. 2005; Lapointe et al. 2007; Narod et al. 2008). Les cancers arborant ce gène de fusion présentent des profils plus agressifs et de plus mauvais pronostics. L'expression d'une isoforme particulière de ce gène de fusion (*TMPRSS2* exon2 – *ERG* exon 4) est associée à un état hautement agressif des cellules cancéreuses. Une autre isoforme (*TMPRSS2* exon 2 - *ERG* exon 3) est associée à l'invasion des vésicules séminales et est corrélée à un mauvais pronostic après prostatectomie radicale (Wang et al. 2006). *TMPRSS2* a été également montré fusionné avec d'autres membres de la famille des ETS, comme *ETV1*, *ETV4* et *ETV5*, mais dans des proportions beaucoup plus faibles que la fusion avec le gène *ERG* (Clark and Cooper 2009).

Le pourcentage de cancers de la prostate dans lequel on retrouve ce gène de fusion est encore controversé. En 2005, il a été établi que 79 % des cancers prostatiques arboraient ce gène de fusion (Tomlins *et al.* 2005), résultat confirmé l'année suivante par une autre étude (78 %) (Soller et al. 2006). De façon plus générale, les études s'accordent à dire que ce gène de fusion est retrouvé dans plus de 50 % des cas (Hermans et al. 2006; Perner et al. 2006; Rajput et al. 2007). De plus, il semblerait que 50 à 70 % des cancers de la prostate montrent une surexpression du gène *ERG* liée, dans 90 % des cas, à la présence du gène de fusion *TMPRSS2/ERG*.

Toutes localisations confondues, cette fusion est, à l'heure actuelle, le réarrangement le plus commun identifié dans une tumeur maligne. Parmi toutes les altérations génétiques recensées dans le cancer de la prostate, il est également le plus fréquemment retrouvé.

II.4. Dépistage / Diagnostic

Contrairement à d'autres tumeurs, le cancer de la prostate se développe très lentement et la nécessité d'un diagnostic précoce se pose moins chez les hommes âgés, ayant une espérance de vie de moins de 10 ans car la plupart du temps, ils décèdent « avec » et non pas « à cause » du cancer.

Il est rarement diagnostiqué avant l'âge de 50 ans (moins de 1 % des cas). La moyenne d'âge au diagnostic est d'environ 74 ans et plus de 85 % des patients sont diagnostiqués après

85 ans. Passé cet âge, le risque de développer ce cancer au niveau mondial passe de 5 à 20 %. L'accroissement considérable de l'incidence clinique de ce cancer est la conséquence de l'amélioration du dépistage des cancers encore non évolués.

Bien que le cancer de la prostate reste asymptomatique à un stade localisé, le diagnostic précoce de la maladie est possible grâce à trois examens : le toucher rectal, le dosage du PSA et les biopsies prostatiques. L'examen physique de la prostate et une analyse sanguine sont systématiquement pratiqués afin de dépister un cancer précoce confiné à la prostate.

II.4.1. Le toucher rectal

Pendant longtemps, le cancer de la prostate a été diagnostiqué essentiellement par le toucher rectal, qui permet de déterminer le stade de la tumeur. Elle pouvait également être tardivement découverte lors de l'apparition de signes cliniques marquant l'extension de la maladie à d'autres organes (douleurs osseuses, insuffisance rénale essentiellement). Actuellement, environ 10 % des cancers prostatiques diagnostiqués sont suspectés par une anomalie au toucher rectal en l'absence d'élévation du PSA.

Cet examen permet de palper la glande et d'y détecter des modifications de volume, de la forme et de la consistance, caractéristiques d'une anomalie prostatique. Il est associé à l'analyse anatomopathologique de biopsies de la prostate, ainsi qu'à l'évaluation de l'extension ganglionnaire et métastatique, et permet de classer la tumeur selon la classification TNM (T : Tumeur ; N : Adénopathies ; M : Métastases). Elle s'étend des stades précoces T1a qui réfèrent à une tumeur non palpable découverte fortuitement jusqu'à des stades T4 qui indiquent une tumeur fixée ou ayant envahi les organes voisins autres que les vésicules séminales. Ensuite, les stades N soulignent la présence de ganglions allant de moins de 2 à plus de 5 cm. Enfin, les stades M1a jusqu'à M1c indiquent le type d'organe atteint par une métastase.

La classification TNM complète pour les cancers de la prostate est présentée dans le tableau 3.

T = tumeur primitive	Sous classe	Description
T1 = tumeur non palpable et non visible à l'imagerie	Tx	Tumeur primitive non évoluée
	T0	Tumeur primitive non retrouvée
	T1a	Tumeur occupant moins de 5 % du tissu réséqué
	T1b	Tumeur occupant plus de 5 % du tissu réséqué
	T1c	Décoouverte par biopsie en raison de l'augmentation de PSA
NB	T1a	< 5 % du tissu réséqué avec score de Gleason < 7 ou absence de grade 4 ou 5
	T1b	> 5 % du tissu réséqué et/ou score de Gleason > 7 ou présence de grade 4 ou 5
T2 = tumeur limitée à la prostate	T2a	Atteinte de la moitié d'un lobe ou moins
	T2b	Atteinte de plus de la moitié d'un lobe mais sans atteinte des deux lobes
	T2c	Atteinte des deux lobes
T3 = extension au-delà de la capsule	T3a	Extension extra capsulaire uni ou bilatérale
	T3b	Extension aux vésicules séminales uni ou bilatérale
T4	-	Tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales
N = ganglions régionaux	Sous classe	Description
Nx	-	Ganglions régionaux non évalués
N0	-	Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1	-	Atteinte ganglionnaire régionale
N1 mi	-	Métastase ganglionnaire < 0,2 cm (optionnel)
M = métastases	Sous classe	Description
Mx	-	Métastases à distance non évaluées
M0	-	Absence de métastase à distance
M1 = métastase à distance	M1a	Atteinte des ganglions non régionaux
	M1b	Atteinte osseuse
	M1c	Autres sites

Tableau 3 – La classification TNM pour les cancers de la prostate.

II.4.2. Le dosage du PSA

Le dosage du PSA, « Prostatic Specific Antigen », est le second paramètre étudié. À l'état normal ce marqueur spécifique de la prostate est retrouvé à de faibles concentrations dans le sang. C'est un antigène sécrété uniquement par le tissu prostatique et il témoigne de l'activité de la glande. Sa suractivité induit une augmentation du taux sérique de PSA. La présence d'un cancer provoquant une augmentation de la quantité de cellules prostatiques composant la glande, le niveau de PSA produit est ainsi plus important. Lors de la cancérogenèse, la désorganisation du tissu est également à l'origine d'un passage plus important de PSA dans la circulation sanguine. Cependant, l'inflammation, l'adénome bénin, l'éjaculation et une intervention physique sur la prostate sont également des causes d'élévation éphémères du taux de PSA. Ainsi, une augmentation du taux n'est pas

considérée comme une preuve directe de la présence d'un cancer, il marque simplement une anomalie de fonction de la glande prostatique. Le PSA est donc spécifique de la prostate et non pas du cancer de la prostate.

Un dosage sérique du PSA est considéré comme normal pour une concentration inférieure à 4 ng/mL. Une augmentation légère (entre 4 et 10 ng/mL) suivie d'un retour à la normale au bout de quelques semaines indique une pathologie d'origine non cancéreuse. En revanche, une augmentation constante du taux de PSA (augmentation de plus de 0,75 ng/mL par an) fera suspecter un cancer de la prostate (Crawford *et al.* 1993; Frizell 1998).

Le risque de cancer de la prostate en fonction du taux de PSA est présenté dans le tableau 4.

Valeur du PSA (ng/mL)	Risque de cancer	Stade du cancer
3 à 7	25%	Très précoce et curable dans plus de 8 cas/10
7 à 30	65%	Précoce, mais curable dans moins de 5 cas/10
30 à 100	90%	Avancé non curable, présence de métastases ganglionnaires
100 à 1000	100%	Tardif non curable, présence de métastases osseuses

Tableau 4 - Tableau de correspondance entre le taux de PSA et le risque de cancer.

II.4.3. Le système de *grading* de Gleason

Pour confirmer le diagnostic, le médecin a recours à une analyse anatomopathologique à partir de biopsies prostatiques, lui permettant de classer la tumeur selon 5 grades de Gleason, schématisés figure 5.

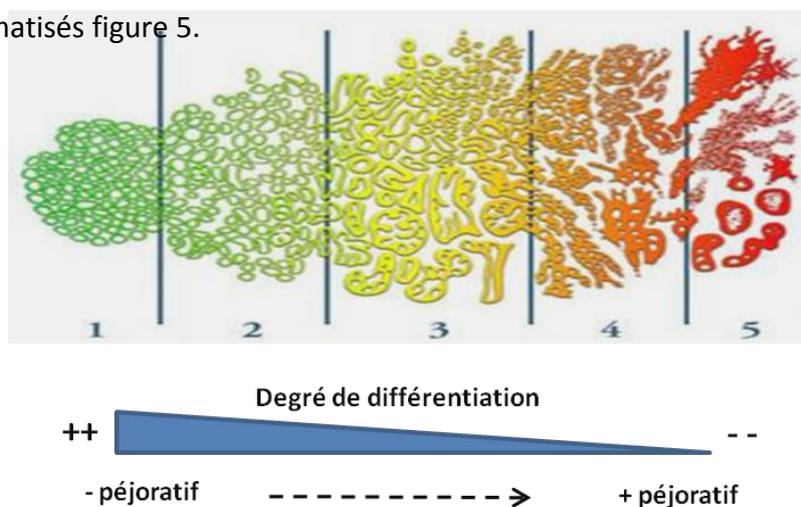
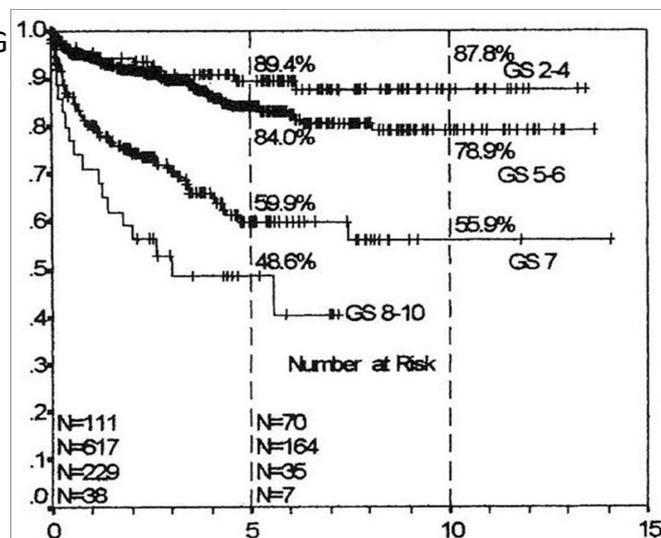


Figure 5 - Grades de Gleason et degrés de différenciation de la tumeur (Gleason 1992).

Il existe cinq grades allant d'un tissu bien différencié (grade 1) vers un tissu de plus en plus différencié (grade 5). La cancérogenèse étant un processus de différenciation, les grades élevés ont un profil plus agressif et sont de pronostic très péjoratif.

Le cancer prostatique est très hétérogène et donc multifocal. C'est pour cette raison que les pathologistes attribuent un score de Gleason, qui correspond aux deux grades les plus représentés au sein de la tumeur. D'après l'observation microscopique, le grade le plus représenté est additionné au second grade le plus représenté. Le score décrit le degré d'agressivité de la tumeur. L'échelle s'étend de 2 à 10, d'une tumeur précoce peu agressive vers une tumeur évoluée, très agressive et capable de métastaser. Actuellement, deux grands groupes sont distingués, classés selon leur score de Gleason. Jusqu'aux stades 3 + 4 la tumeur est dite de bas grade, à croissance lente et peu agressive. À partir des stades 4 + 3, les tumeurs sont dites de haut grade. Elles se développent beaucoup plus vite, sont plus agressives et possèdent une forte capacité métastatique.

Cette relation forte a été démontrée par des études de survie chez des populations classées selon leur score de G



ure 6.

Figure 6 - Courbes de survie sans progression, de type Kaplan-Meier, en fonction du score de Gleason (GS) (Hull *et al.* 2002; Olivier Cussenot 2004).

Ces études montrent la valeur pronostique du score de Gleason. Des patients atteints d'un cancer de la prostate avec un score de Gleason élevé ont un taux de survie beaucoup plus

bas (inférieure à 50 % à 5 ans) que ceux atteints d'un cancer avec un score de Gleason plus faible (Hull et al. 2002).

II.4.4. Le dosage du PCA3

La généralisation du dosage du PSA sérique dans la démarche de dépistage individuel présente plusieurs inconvénients notables. D'une part sa faible spécificité entre 4 et 10 ng/mL, où le taux de biopsies négatives est estimé de 45 à 70 %. Ainsi, la recherche de marqueurs spécifiques de la prostate, plus performants et plus spécifiques que le PSA, a abouti à l'identification de plusieurs marqueurs intéressants, spécifiques du tissu prostatique cancéreux, parmi lesquels *PCA3* (Prostate CAncer gene 3) (de Kok et al. 2002). Il est retrouvé 66 fois plus exprimé dans le tissu tumoral que dans le tissu sain. La détermination du score de *PCA3* semble plus efficace que le dosage du PSA pour le diagnostic du cancer de la prostate (Marks et al. 2007).

Le dosage du *PCA3* est un outil supplémentaire permettant de déterminer plus facilement si une biopsie est vraiment nécessaire chez les hommes dont le taux de PSA est entre 2,5 et 10 ng/mL (Vlaeminck-Guillem et al. 2008). Cependant, le coût du dosage du *PCA3* fait que ce test n'est pas pratiqué en routine.

II.5. Prise en charge thérapeutique

Le traitement du cancer de la prostate est déterminé en fonction de l'état général du patient et du stade pronostique de la maladie. Plusieurs cas de figures sont possibles : soit une abstention thérapeutique et/ou une surveillance active, soit différentes thérapeutiques (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, curiethérapie).

Les cancers au stade T1 ou T2 sont des cancers localisés. Ils peuvent bénéficier de traitements à visée curative ou d'une surveillance active.

II.5.1. Traitements à visée curative

Le traitement de référence est l'ablation chirurgicale : c'est la prostatectomie radicale, réalisée par voie classique rétropubienne, ou par coelioscopie. La glande prostatique étant petite, la prostatectomie peut être totale ou partielle mais reste un acte délicat. Dans le cas d'une prostatectomie totale, le taux de PSA doit devenir nul ou indétectable. Cependant, l'acte chirurgical est dans certains cas impossible.

La radiothérapie, second traitement standard, est une alternative à la chirurgie lorsque celle-ci n'est pas possible mais elle peut également être utilisée comme adjuvant dans la prévention de récurrence. Elle irradie les foyers des cellules cancéreuses dans la prostate. Une autre méthode efficace est la curiethérapie, dont le principe repose sur l'implantation de grains de matière faiblement radioactive dans la prostate, au sein même des foyers cancéreux. Cette technique permet de reproduire le principe de la radiothérapie sur une période de temps plus courte, comparée aux dizaines de séances nécessaires pour la radiothérapie. De plus, le temps d'irradiation est continu car la graine délivre sa radioactivité jusqu'à épuisement. Elle présente également l'avantage d'épargner les organes environnants.

Ces techniques curatives sont appliquées de manière à éradiquer définitivement toutes les cellules cancéreuses en agissant de façon agressive. Parmi ces cancers, un certain nombre sont considérés comme indolents et peuvent être soumis à une simple surveillance, minimisant les effets indésirables potentiels.

II.5.2. La surveillance active

Ce protocole est proposé à des sujets jeunes dont le cancer est très localisé et probablement indolent. Elle consiste à suivre un protocole strict et soutenu de surveillance, basé sur l'analyse régulière de 3 tests : toucher rectal, dosage du PSA et biopsies. Il permet de détecter tout signe d'évolution clinique, biologique et histologique du cancer de la prostate. Ce protocole ne peut s'appliquer qu'à des patients acceptant l'idée de vivre avec un cancer et de ne se soumettre qu'à une surveillance. Dans les cas contraires, un traitement est proposé.

II.5.3. Traitements à visée palliative

Des stratégies ont été élaborées afin de « contrôler » le cancer le plus longtemps possible. Les cancers avancés ou généralisés bénéficient de traitements palliatifs visant à ralentir au mieux la progression de la maladie. Le traitement appliqué est l'hormonothérapie et s'adresse surtout à des personnes âgées car il s'inscrit dans la durée. Le cancer prostatique est hormono-dépendant dans la plupart des cas. La testostérone en est l'hormone principale et stimule la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques. Elle est convertie en DHT (Di-Hydro Testostérone) par la 5- α -réductase dans le cytoplasme des cellules. Le traitement hormonal utilise une stratégie de déprivation hormonale, que l'on définit comme un

procédé de « castration chimique » pour faire opposition à la chirurgie, considérée comme une castration physique (Miyamoto et al. 2004). Ainsi, le but est de diminuer au maximum le taux d'androgènes circulants. Pour cela, le médecin peut avoir recours à plusieurs agents comme par exemple des œstrogènes de synthèse, ou bien des agonistes de la LH-RH, qui inhibent la sécrétion de la testostérone par l'hypothalamus. Des inhibiteurs de la 5- α -réductase sont également utilisés afin d'inhiber la production de DHT qui est la forme active de la testostérone. Des anti-androgènes stéroïdiens et non stéroïdiens sont également utilisés. Ils rentrent en compétition avec la testostérone pour la liaison au récepteur aux androgènes et le séquestrent en l'empêchant d'activer les voies de signalisation hormonales en aval.

La liste des médicaments utilisés pour la déprivation hormonale est présentée dans le tableau 5.

Classe	Médicament	Mécanismes d'action
Oestrogènes	Diéthylstilbéstrol, Fosfestrol, Estramustine	Bloquent la sécrétion par l'hypophyse de LH et donc de la testostérone
Agonistes LH-RH	Leuproréline, Triptoréline, Goséréline, Buséréline	Bloquent la sécrétion par l'hypophyse de LH et donc de la testostérone
Antagonistes LH-RH	Abarélix, Dégalérix	Bloquent les récepteurs de la LH-RH
Anti-androgènes stéroïdiens	Cyprotérone, Mégestrol	Antagoniste du récepteur aux androgènes
Anti-androgènes non stéroïdiens	Flutamide, Nilutamide, Bicalutamide	Antagoniste du récepteur aux androgènes
Inhibiteur 5- α -réductase	Finastéride, Benzoquinoline	Inhibent la conversion de la Testostérone en DHT par la 5- α -réductase
Inhibiteur CYP17	Abiraterone	Inhibe la synthèse de testostérone

Tableau 5 – Les différentes stratégies de l'hormonothérapie du cancer de la prostate.

Malgré cela, certaines tumeurs acquièrent la capacité de résister à ces traitements, ce qui se traduit par une reprise de la progression tumorale et/ou de l'apparition de métastases. Les cellules de la tumeur ne deviennent pas toutes en même temps hormono-résistantes, ce pourquoi le traitement hormonal est souvent maintenu. Ces tumeurs, résistantes à la castration chimique, sont dites « CRPC » (*Castration-Resistant Prostate Cancer*).

À ce stade, le clinicien propose généralement une chimiothérapie complémentaire. C'est justement dans les cas de cancers de haut grade, contenant les tumeurs de type CRPC, que l'on a souvent recours à la chimiothérapie. La problématique des tumeurs de haut grade est

qu'il n'existe toujours pas de chimiothérapies clairement établies, pour les traiter. Dans ce contexte, notre travail a été de proposer une chimiothérapie alternative efficace contre ce type de cancer.

III. LA PROBLÉMATIQUE DES CANCERS DE HAUT GRADE

III.1. Mécanismes impliqués dans la transition du bas grade vers le haut grade.

Les cancers de haut grade représentent environ 10 % des cancers de la prostate. Ils possèdent la particularité d'être résistants d'emblée ou de devenir rapidement résistants à l'hormonothérapie. La transition des bas grades vers les hauts grades est hétérogène et multifactorielle (Bonkhoff *et al.* 2010), elle implique l'altération de différentes voies de signalisation conduisant à la surexpression du récepteur aux androgènes, induisant une signalisation continue en aval, y compris sous blocage androgénique. Des études ont montré que la surexpression du RA est suffisante pour conférer une résistance des cellules à l'hormonothérapie (Chen *et al.* 2004). Le RA peut également être activé d'une façon indépendante des androgènes, par des récepteurs de facteurs de croissance non-hormonaux (HER-1, HER-2 *etc.*). Une autre étude suggère que l'activation des voies MAPK et Akt peut spécifiquement induire la phosphorylation du récepteur aux androgènes et engendrer l'activation des voies de signalisation androgéniques (Abreu-Martin *et al.* 1999; Wen *et al.* 2000). Ce récepteur peut aussi être activé par des stéroïdes non androgéniques (œstrogène, progestine *etc.*) dont l'origine vient d'une mutation réduisant sa spécificité au ligand. Il peut ainsi lier des œstrogènes non stéroïdiens mais également des ligands généralement antagonistes (comme le bicatulamide et le flutamide), constituant la base moléculaire de cette activation non androgénique (Heinlein *et al.* 2004). La surexpression de Bcl-2, un inhibiteur de l'apoptose, a été également décrite comme un mécanisme permettant le contournement de la voie du récepteur aux androgènes. Ce court-circuit de la signalisation du RA assure le maintien des voies de prolifération (McDonnell *et al.* 1992).

En dépit des progrès dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le phénotype « haut grade », les médecins font face à une maladie très évoluée. Les traitements actuels ont au mieux un effet palliatif, c'est-à-dire qu'ils arrivent à limiter la progression tumorale mais en aucun cas ne l'éradiquent.

III.2. Essais cliniques pour le traitement des hauts grades

Il existe donc un réel besoin quant à l'identification de thérapeutiques efficaces pour le traitement de ces cancers. De nombreuses études cliniques ont ainsi été menées ces dernières années dans le but de trouver une chimiothérapie efficace à proposer pour ce type

de tumeurs (Mike et al. 2006). Ces essais cliniques sont à la base de l'homologation de l'utilisation d'une molécule dans une indication donnée.

III.2.1. Le principe des essais cliniques

Le développement de nouveaux médicaments est un processus complexe, long et coûteux. La séquence conventionnelle d'études précliniques peut durer 10 à 15 ans. Actuellement, un nouveau médicament antitumoral entrant dans un processus de phase I n'a que 5 % de chances d'intégrer le marché du médicament.

Les essais cliniques comprennent plusieurs étapes (ou phases) qui sont chacune destinées à recueillir des informations spécifiques sur le nouveau traitement.

Les essais de Phase I ont pour objectif premier d'évaluer la tolérance de l'organisme à un traitement expérimental, dans le but de déterminer le dosage recommandé. Le traitement est administré à un petit nombre de patients (10 à 40). Le second objectif est de mesurer, *via* des études de pharmacocinétique, le devenir du médicament au sein de l'organisme en fonction de son mode d'administration (absorption, diffusion, métabolisme et excrétion). Depuis peu et afin de restreindre le nombre de molécules à inclure dans des essais de phase I, il est possible d'effectuer des essais à très faibles doses afin de vérifier si la molécule peut atteindre sa cible pharmacologique. Ainsi, les essais de Phase 0, dits très précoces, sont un nouveau type d'essai clinique constituant la première administration de la molécule chez l'homme. Le nombre de patients est également restreint et les durées de traitements sont courtes (moins de 7 jours). Le but est d'établir la preuve du concept d'efficacité biologique de la molécule, ce qui, d'un point de vue de l'industrie, présenterait l'avantage de pouvoir sélectionner plus rapidement les molécules et permettrait d'éviter la mise en place d'essais sans assurance que le médicament n'atteigne sa cible (Takimoto 2009).

Les essais de Phase II évaluent la posologie optimale du produit en termes d'efficacité et de tolérance sur une population limitée de patients (une centaine). Les critères de jugement principal d'un essai de phase II en cancérologie sont généralement l'activité anti-tumorale, la tolérance et les durées jusqu'à récurrence ou progression. La qualité de vie doit désormais être évaluée. On distingue les phases IIa, dites « exploratoires », dans lesquelles une nouvelle molécule est évaluée sans connaissance préalable formelle de son domaine d'action. Les phases IIb, dites « confirmatoires », évaluent un médicament déjà connu suite à une modification de son utilisation (nouvelle association ou nouveau schéma thérapeutique) ou

suite à un essai de phase IIa. En résumé, les essais de phase II déterminent si l'activité anti-tumorale du traitement évalué justifie de développer des essais de phase III.

Les essais de Phase III sont une étape essentielle de la validation de l'efficacité d'un nouveau traitement auprès d'une population moins sélectionnée que pour un essai de phase II. Cependant, ils sont de grande envergure, en incluant plusieurs milliers de patients représentatifs de la population de malades à laquelle le traitement est destiné. En cancérologie, le critère de jugement principal doit être un critère démontrant un bénéfice clinique pour le patient. Ce critère est la survie globale, la qualité de vie étant le second critère de jugement pour la FDA (Food and Drug Administration). Ces essais de phase III sont des tests comparatifs. Ils permettent de comparer l'efficacité du traitement expérimental avec celui de référence (dit standard). Deux groupes de patients homogènes et comparables (âge, sexe, caractéristiques de la maladie, etc.) sont constitués au hasard : l'un recevra le traitement de référence, l'autre le nouveau traitement. Aucun des deux partis (médecin et patient) ne connaît la nature du traitement afin que les attentes du médecin et du patient n'affectent pas les résultats. Ce principe, appelé « double aveugle », garantit l'absence de biais dans l'analyse des résultats.

Si les données et les résultats de ces essais sont en faveur du traitement expérimental, cela permet de constituer un nouveau dossier d'enregistrement qui sera soumis aux autorités de santé afin qu'elles délivrent l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), permettant sa commercialisation dans l'organe testé et pour les conditions évaluées.

Même après avoir obtenu l'AMM, le nouveau traitement fait encore l'objet d'une surveillance étroite appelée pharmacovigilance. Ainsi, tout signe anormal inattendu dû à son administration fait l'objet d'une déclaration à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS). C'est ce qui est défini comme les essais de Phase IV. Ils permettent d'approfondir la connaissance du médicament dans les conditions réelles d'utilisation et d'évaluer sa tolérance à grande échelle (2010).

III.2.2. Chimiothérapies dans les cancers de la prostate de haut grade

III.2.2.1. Les chimiothérapies bénéficiant de l'AMM

Mitoxantrone. Dans la seconde partie des années 1990, des essais de phase III ont montré la sensibilité des CRPC à la chimiothérapie. La mitoxantrone, un inhibiteur de l'ADN topoisomérase 2, associée au Prednisone ou à l'Hydrocortisone a démontré une amélioration de la qualité de vie ainsi qu'un meilleur contrôle des symptômes (Tannock et al. 1996; Kantoff et al. 1999). Depuis son approbation par la FDA (Food and Drug Administration) en 1999, cette association est devenue le premier traitement standard des CRPC.

Docétaxel. Depuis 1996, d'autres essais précliniques et essais de phase I/II ont obtenu des taux de réponse prometteurs avec des poisons du fuseau (famille des taxanes) (Oh *et al.* 1999). Ces agents inhibent la dépolymérisation des microtubules. Cette structure microtubulaire figée conduit à l'arrêt de la mitose (Picus *et al.* 1999). Des essais de phase III ont ensuite clairement démontré un gain sur la survie globale d'environ 3 mois pour les patients atteints de CRPC. Le docétaxel constitue, depuis 2004, la chimiothérapie de première ligne pour le traitement de ce type de cancer, remplaçant ainsi la mitoxantrone.

Cabazitaxel. Cet autre taxane diffère du docétaxel par sa faible affinité pour la glycoprotéine-P (P-gp), un transporteur de la famille ABC, produit du gène MDR (*Multi Drug Resistance*). C'est une pompe d'efflux de drogue dépendante de l'ATP. En surexprimant la P-gp, les cellules cancéreuses deviennent résistantes au docétaxel, limitant donc son bénéfice à un effet palliatif, dans le meilleur des cas. La forte affinité de la pompe d'efflux pour le docétaxel est le mécanisme principal conduisant à la résistance tumorale à cet agent. Dans ces conditions, des études randomisées de phase III (Paller *et al.* 2011) ont montré que les tumeurs résistantes au docétaxel restent sensibles au cabazitaxel. Son association avec la prednisone montre un bénéfice sur la survie globale qui est de 2,4 mois supérieure au bras mitoxantrone/prednisone sur les CRPC résistantes au docétaxel. La FDA et l'EMA (*European Medicine Agency*) ont récemment approuvé l'administration de ce taxane pour les patients présentant ce profil.

Acétate d'abiratéronne. L'acétate d'abiratéronne (AA) est une thérapie ciblée. Ce type de thérapie utilise une molécule spécifiquement modélisée pour atteindre une cible précise dans la cellule. L'AA a été conçu pour inhiber CYP17, qui est requis pour la synthèse des

androgènes dans les testicules et le tissu prostatique entre autres (Wadelius *et al.* 1999). Son association avec la prednisone a été évaluée pour ses activités anti-tumorales et pour réduire les effets indésirables de l'AA seul. Les résultats ont montré que 36 % des patients ont une réduction de leur taux de PSA d'au moins 50 %. La majorité des patients ont rencontré des effets indésirables beaucoup moins prononcés qu'avec l'AA seul. L'association AA/prednisone est bien tolérée avec une activité anti-tumorale encourageante (Danila *et al.* 2010). Des essais de phase III ont ensuite montré une nette augmentation de la survie globale pour des patients atteints de HRPC, dont la tumeur a progressé à la suite d'une première chimiothérapie à base de docétaxel, recevant une association prednisone/acétate d'abiratérone versus prednisone/placebo (14,9 vs 10,9 mois, respectivement) (de Bono *et al.* 2011). L'AA, bloquant la synthèse des androgènes, ouvre une nouvelle ère dans l'approche de l'hormonothérapie en lui intégrant la thérapie ciblée. Suivant la même stratégie, d'autres agents utilisant des mécanismes ciblant l'axe androgénique sont actuellement en cours de développement. L'objectif est d'offrir la possibilité de combinaisons rationnelles avec des agents bloquant la voie androgénique de différentes façons (Sonpavde *et al.* 2011). L'AA a reçu en Avril 2011, son AMM.

III.2.2.2. Les chimiothérapies ne bénéficiant pas de l'AMM

Paclitaxel. Le paclitaxel a été étudié seul ou en combinaison avec d'autres chimiothérapies. Une administration hebdomadaire a montré le meilleur rapport entre bénéfice clinique et effets indésirables. 39 % des patients ont montré une diminution de plus de 50 % du taux sérique de PSA et d'excellents taux de réponse (Trivedi *et al.* 2000). Malgré ces résultats prometteurs, le paclitaxel n'a pas encore fait l'objet d'essais cliniques de Phase III (Mancuso *et al.* 2007).

Atrasentan. Le récepteur aux endothélines ET-1 a été identifié comme participant activement dans la progression du cancer prostatique en facilitant sa prolifération, son échappement à l'apoptose, son invasion et la formation de métastase osseuse. Les endothélines et leurs récepteurs ont donc émergé comme des nouvelles cibles potentielles. Ces données ont abouti à l'évaluation clinique de l'atrasentan, un antagoniste du récepteur ET-1, dans l'idée d'inhiber les interactions entre les cellules cancéreuses et l'environnement osseux, dans le traitement des HRPC. De par son action dirigée contre une cible spécifique, l'atrasentan fait partie des thérapies ciblées. Son action biologique a montré une suppression des marqueurs de progression des formes métastatiques osseuses du cancer de

la prostate. L'apparition de métastases osseuses est largement retardée dans le bras traité à l'atrasentan comparé au bras placebo. Des essais cliniques de phase III proposant l'association de l'atrasentan avec le docétaxel n'ont pas montré de bénéfices sur la survie de patients atteints de cancer de la prostate avancé. Néanmoins, d'autres antagonistes des récepteurs aux endothélines sont en développement (Carducci *et al.* 2006).

Satraplatine et autres dérivés du platine. Le satraplatine est la troisième génération d'analogues du platine (voir ci-après). Il possède des capacités supérieures aux autres dérivés du platine comme le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine (Kelland 2000). De la même façon que les autres platines, le satraplatine se lie à l'ADN, formant des adduits responsables de l'arrêt de la fourche de réplication, de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'induction de l'apoptose. Ces adduits sont réparés par le système de réparation par excision de nucléotides (NER). Le satraplatine est plus lipophile et chimiquement stable, ce qui lui permet d'être le seul agent de la famille des platines administré par voie orale. Les premières études précliniques montrent que ses effets cytotoxiques sont comparables à ceux du cisplatine et du carboplatine tout en étant moins néphrotoxique que le cisplatine et moins neurotoxique que l'oxaliplatine (Sternberg 2005). Le ratio bénéfice/risque est donc bien meilleur. Des essais de phase III ont montré que l'association du satraplatine avec la prednisone permet de doubler la survie globale comparée à un traitement avec la prednisone seul, ainsi que de diminuer de 40 % le risque de progression. En résumé, l'association du satraplatine avec la prednisone émerge comme un traitement de seconde ligne contre les HRPC. A l'heure actuelle, l'efficacité du satraplatine en traitement de première ligne n'est pas connue.

À l'heure actuelle, rares sont les chimiothérapies qui ont abouti à une AMM, et cela en dépit du grand nombre d'essais réalisés. En 2006, la *Cochrane Database* a publié une revue décrivant toutes les études effectuées sur des cancers de la prostate hormono-résistants (Mike *et al.* 2006). Depuis 1977, de nombreuses études ont été réalisées dont 47 sont décrites dans cette revue. Les critères retenus étaient que l'essai ait été réalisé sur des patients résistants à l'hormonothérapie. Les agents thérapeutiques utilisés dans ces essais étaient l'estramustine (21), la doxorubicine (14), le 5-fluorouracile (14), le cyclophosphamide (10), la mitoxantrone (6), le méthotrexate (6), le cisplatine (4), le docétaxel (4), l'épirubicine (4), les nitrosourées (4), la mitomycine (3), la vinblastine (3), la vincristine (2), le paclitaxel

(2), l'oxaliplatine (1), le melphalan (1), l'hydroxyurée (1), l'étoposide (1), la péplomycine (1), la vinorelbine (1), la prednimustine (1) et l'ixabépilone (1).

Dans huit de ces essais, les bras comparés étaient l'hormonothérapie avec des agents incluant la prednisone, l'acétate de médrocyprogesterone, l'hydroxycortisone, le flutamide et le kétoconazole.

La « faiblesse » de ces essais était qu'ils n'incluaient que peu de patients. Ils ont été classés selon la drogue majeure utilisée car beaucoup d'études ont évalué la combinaison de plusieurs agents. Ils ont donc été regroupés en plusieurs catégories selon que la drogue de base étudiée était l'estramustine, le 5-fluorouracile, le cyclophosphamide, la doxorubicine, la mitoxantrone ou le docétaxel. Seules les études basées sur le docétaxel ont montré un gain de survie globale significatif, bien que modeste (moins de 2,5 mois). Les pourcentages de patients montrant une diminution de leur taux de PSA d'au moins 50 % étaient : estramustine (48 %), 5-fluorouracile (20 %), doxorubicine (50 %), mitoxantrone (50 %) et docétaxel (52 %). La qualité de vie est également meilleure avec le docétaxel (Mike *et al.* 2006).

Les résultats de ces essais, malgré quelques réponses intéressantes, n'ont malheureusement pas permis de proposer une alternative au docétaxel pour les cancers de la prostate hormono-résistants. Cela est principalement lié à l'hétérogénéité des populations de patients recrutés dans ces essais et l'absence de sélection sur des critères histologiques ou génétiques, notamment le grade Gleason. Or, le développement massif des technologies à haut débit, comme la technologie des puces à ADN a permis de mettre en évidence des différences notoires entre le transcriptome des cellules normales et celui des cellules tumorales. Sur cette base, il est aujourd'hui possible non seulement de caractériser un type tumoral particulier, mais également d'utiliser des signatures d'expression pour identifier des marqueurs de réponse à différents types de chimiothérapie. Des signatures ont également permis de différencier les cancers de prostate de bas grade des cancers de haut grade ((Lapointe *et al.* 2004; True *et al.* 2006).

C'est sur cette base que repose notre travail de recherche d'alternatives thérapeutiques aux taxanes dans les cancers de la prostate de haut grade.

IV. LES SIGNATURES D'EXPRESSION PREDICTIVES DE REPONSE

Les cliniciens ont en main un large panel d'agents antiprolifératifs et ont besoin d'outils leur permettant de prédire quelle sera la meilleure stratégie thérapeutique à adopter. Une identification préalable de biomarqueurs, permettant de prédire la chimiosensibilité de la tumeur, faciliterait ce choix. Cela permettrait également d'éviter les effets indésirables liés à l'administration d'un traitement peu ou pas efficace. Ces biomarqueurs peuvent justement être identifiés sur la base de signature d'expression génique spécifique aux cellules tumorales. Chaque tumeur présente effectivement des caractéristiques génétiques qui lui sont propres et qui imposent un nouveau regard sur la façon d'aborder la thérapeutique antitumorale. La stratégie des lignes successives est maintenant un concept dépassé et nous nous dirigeons irrévocablement vers l'individualisation des traitements.

IV.1. Obtention des signatures d'expression par les puces à ADN

IV.1.1. Historique

L'identification de gènes marqueurs a profité du développement des technologies automatisées à haut débit et leur évolution vers l'étude globale des génomes, (Pollack *et al.* 1999; Gorlov *et al.* 2009). En effet, il n'était pas possible d'étudier un grand nombre de gènes dans des conditions identiques par les méthodes conventionnelles.

La technologie de « *microarray* », ou puce à ADN, est une technologie dérivée du Southern Blot, dans laquelle un fragment d'ADN est attaché à un substrat et hybridé avec un fragment de gène connu (Maskos *et al.* 1992). Après la miniaturisation de cette technique, il est maintenant possible d'analyser en parallèle l'expression de milliers de gènes dans une même expérience. En fonction du type d'échantillon immobilisé sur la puce et l'information recherchée, les expériences *microarray* peuvent être utilisés pour l'analyse d'expression, de variates de type SNP ou permettre une analyse génomique comparative.

En 1995 fut publiée la première utilisation d'un *microarray* miniaturisé (Schena *et al.* 1995) ; les résultats du premier génome entier eucaryote (*Saccharomyces cerevisiae*) hybridé sur une puce fut présenté en 1997 (Lashkari *et al.* 1997). Par la suite, devant l'abondance et l'hétérogénéité des données obtenues, le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) a créé le *Gene Expression Omnibus* (GEO), base de données regroupant et formatant

les résultats de l'expression de gènes issus de centaines d'études, facilitant par la même leur exploitation (Barrett et al. 2005). D'autres bases de données comme *ArrayExpress* (Brazma et al. 2003; Parkinson et al. 2005) à l'*European Bioinformatics Institute* (EBI) ainsi que la base *Oncomine* (Rhodes et al. 2004; Rhodes et al. 2007) ont vu le jour et représentent des ressources supplémentaires afin d'uniformiser et d'exploiter la quantité importante de données publiées.

IV.1.2. Méthodologie

Le principe de base repose sur l'hybridation entre deux brins d'ADN par la formation de liaisons hydrogènes entre les bases complémentaires. La méthode la plus répandue est la détection à deux canaux, chaque canal correspondant à une condition particulière que l'on veut comparer. Les ARN totaux sont extraits des cellules et amplifiés par PCR. Ils sont ensuite rétrotranscrits en ADNc et marqués aux fluorochromes vert (Cyanine 3) ou rouge (Cyanine 5) avant d'être hybridés simultanément sur la puce. Chaque spot de la puce sera analysé individuellement par un scanner à très haute résolution, à la longueur d'onde de chaque fluorochrome. Le logiciel d'analyse superpose les fluorescences obtenues afin de comparer l'intensité du signal entre le vert et le rouge et interpréter le niveau d'expression du gène correspondant dans les 2 conditions. Cette technique permet donc de quantifier le niveau d'expression de chaque gène.

Plusieurs cas de figures sont alors possibles. Si un gène est différenciellement exprimé entre les échantillons comparés, le spot sera de la couleur correspondant à l'échantillon dans lequel le gène est le plus exprimé (par exemple il sera rouge si il est plus exprimé dans la condition 1 et il sera vert si il est plus exprimé dans la condition 2). Si le niveau d'expression est équivalent entre les deux conditions, on obtiendra, par addition des fluorescences, un spot jaune, correspondant à l'addition de la fluorescence verte et rouge.

Le principe général d'une étude *microarray* comparative est présenté dans la figure 7.

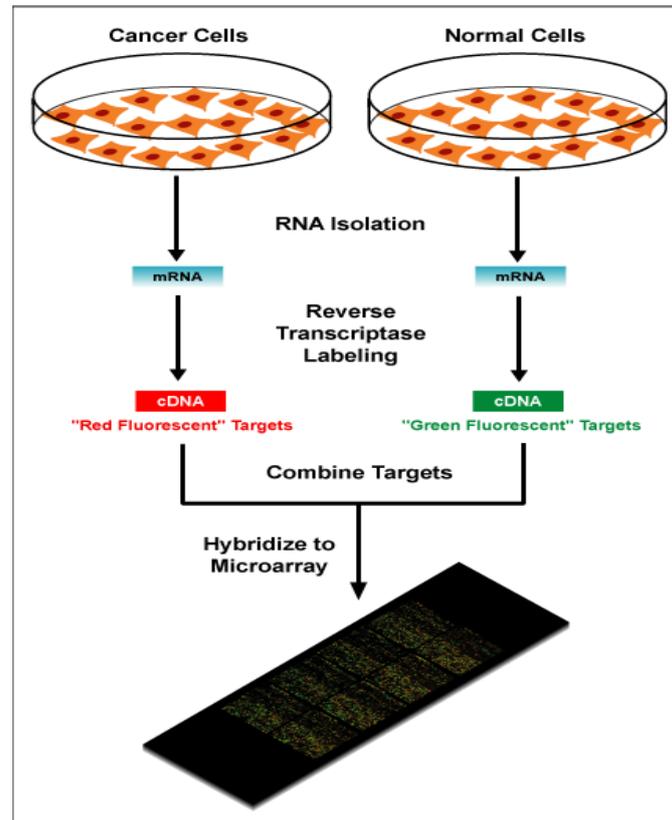


Figure 7 - Principe général de l'hybridation comparative utilisant la technologie des puces à ADN (*microarray*).

D'autres technologies, comme le « *Gene Chip* » d'Affymetrix ou le « *Bead Chip* » d'Illumina utilisent des *microarrays* à un seul canal, quantifiant l'hybridation d'un seul échantillon. Ainsi, Cette technique présente le désavantage d'imposer l'hybridation de deux puces si on souhaite comparer l'expression de deux échantillons. Cependant, son avantage réside dans le fait qu'un échantillon aberrant n'affecte pas les données des autres échantillons, car chaque puce n'est exposée qu'à un seul échantillon. En effet, sur un système à double sonde, il suffit qu'un des deux échantillons soit de mauvaise qualité pour rendre inexploitable l'ensemble des résultats.

IV.1.3. Standardisation et analyses statistiques

Les données issues des *microarrays* sont difficiles à échanger en raison du manque de standardisation entre les différentes plateformes, les protocoles et les méthodes d'analyses. Cela représente un vrai problème en bioinformatique. Des études ont ainsi définis des

protocoles afin de faciliter l'échange et l'analyse des données, les rendant compatibles avec la totalité des technologies existantes.

Par exemple, le protocole MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) définit le niveau de détails minimum requis pour la soumission de travaux utilisant des *microarrays* (Brazma et al. 2001). Il permet d'établir un standard pour la publication des résultats afin de faciliter, en retour, le développement d'outils d'analyse des données. Selon la même idée, la FDA a conduit le projet MAQC (*Microarray Quality Control*) pour développer des standards et des contrôles qualités permettant l'exploitation des résultats obtenus par ce type d'approche (Shi et al. 2006).

L'analyse statistique des résultats de *microarrays* est propre à la plateforme utilisée pour l'analyse des puces. Elle prend en compte un certain nombre de variables comme le bruit de fond et les méthodes de normalisation utilisées. Les algorithmes utilisés pour l'analyse statistique incluent l'analyse de l'image (reconnaissance des spots et suppression des profils de mauvaises qualités), le traitement des données (soustraction du bruit de fond, détermination et normalisation de l'intensité des ratios...) et l'identification des variations significatives entre puces ou au sein d'une même puce (t-test, ANOVA, Mann-Whitney...).

IV.2. Signatures d'expression dans les cancers de la prostate

Malgré la détection précoce des cancers de la prostate depuis l'introduction du dosage du PSA, un certain nombre de tumeurs expriment un taux normal de cet antigène, soulignant l'importance d'identifier de nouveaux marqueurs. Des études transcriptomiques ont été utilisées afin de caractériser les gènes dont l'expression varie en fonction du statut sain ou cancéreux de la cellule. Cette approche permet donc de mettre en évidence des gènes (et les voies dans lesquelles ils sont impliqués) jouant un rôle déterminant dans le processus de cancérogenèse. Ainsi, en comparant le transcriptome des cellules normales avec celui des cellules cancéreuses, il est possible de mettre en évidence des gènes dont le niveau d'expression est diminué dans les cellules cancéreuses, suggérant que les voies auxquelles ils appartiennent sont réprimées, et des gènes surexprimés dans les cellules cancéreuses, suggérant que les voies auxquelles ils appartiennent sont activées, voire suractivées, au cours du processus tumoral. Les gènes surexprimés sont, de ce fait, de bonnes cibles pharmacologiques.

Des signatures d'expression ont ainsi été établies depuis le début des années 2000 et les données rendues publiques sont disponibles sur des bases de données comme par exemple Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>).

Pour des raisons didactiques, nous ne présentons dans le tableau 6 que les études majeures ayant abouti à des signatures d'expression dans le domaine des cancers de la prostate (Dhanasekaran *et al.* 2001; Luo *et al.* 2001; Welsh *et al.* 2001; Luo *et al.* 2002; Lapointe *et al.* 2004; True *et al.* 2006).

Auteur	Année	Technologie	Paramètres comparés	Caractéristiques de la signature
Dhanasekaran	2001	Microarray ADNc 9984 gènes	normal/BPH/K localisée/K métastatique/HRPC	1520 gènes discriminants
Luo	2001	Microarray ADNc 6112 gènes	tissu normal VS BPH	210 gènes discriminants
Welsh	2001	Microarray ARN 8900 gènes	tissu normal VS lignées cancéreuses de la prostate	400 gènes surexprimés dans les lignées cancéreuses
Luo	2002	Microarray ARN 12000 gènes et 35000 EST	tissu normal/ K localisé/ K métastatique	84 gènes discriminants
Lapointe	2004	Microarray ARN 26260 gènes	tissu normal VS tissu cancéreux	42 gènes discriminants
True	2006	Microarray ARN 7700 gènes	tissu normal/ Gleason bas grade/ Gleason haut grade	86 gènes discriminants

Tableau 6 – Les différentes signatures d'expression extraites de la base Oncomine permettant de discriminer entre différents stades d'évolution des cancers de la prostate.

IV.3. Les signatures d'expression spécifiques des cancers de haut grade

Dans une première étude, publiée par True *et al.*, les profils d'expression de tumeurs avec des grades de Gleason spécifiques ont été caractérisés (True *et al.* 2006). Pour cela, une étude *microarray* comparative a été utilisée pour développer un modèle capable de distinguer les tumeurs de bas grade (grade 3) et les tumeurs de haut grade (grade 4 et 5). Parmi les 7700 gènes présents sur la puce d'hybridation, les auteurs ont recherché les gènes dont le niveau d'expression était significativement différent entre les tumeurs de bas grades et les tumeurs de haut grade (figure 8).

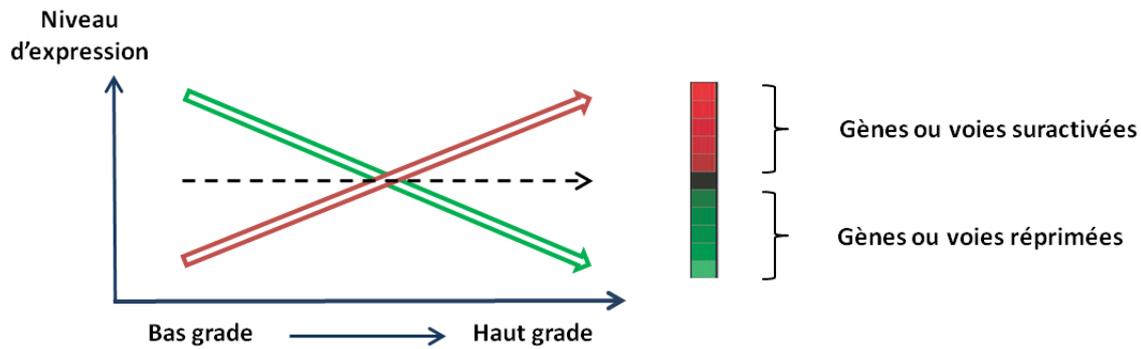


Figure 8 - Profil du niveau d'expression des gènes recherchés.

Les gènes dont l'expression augmente (rouge) témoignent de l'éventuelle activation d'une voie. Au contraire, les gènes dont l'expression est diminuée (vert) dans les hauts grades sont les marqueurs moléculaires d'une voie éventuellement réprimée au cours du développement tumoral. Les gènes dont le niveau d'expression ne varie pas ne présentent, a priori, pas d'intérêt particulier et représentent la majorité des gènes présents sur la puce.

Grâce à une approche statistique appropriée, les auteurs ont déterminé trois signatures d'expression de gènes comprenant 40, 64 et 86 gènes, permettant de prédire le grade tumoral avec une fiabilité respective de 90, 84 et 81 %.

Une étude supervisée sur le modèle de signature comprenant 86 gènes a été réalisée sur un lot indépendant de 32 biopsies, dont les grades ont été déterminés par analyse microscopique. Le niveau d'expression des 86 gènes a été mesuré et a permis de classer correctement 29 des 32 tumeurs (figure 9). Seules deux tumeurs de bas grade (en bleu) sont classées parmi les hauts grades et une seule tumeur de haut grade (en jaune) est retrouvée dans les tumeurs de bas grade.

Parmi les 86 gènes de la signature, 70 sont surexprimés dans les cancers de la prostate de hauts grades et 16 sont sous-exprimés. Environ la moitié des gènes ont un rôle dans le métabolisme cellulaire.

Les résultats sont présentés dans la figure 9.

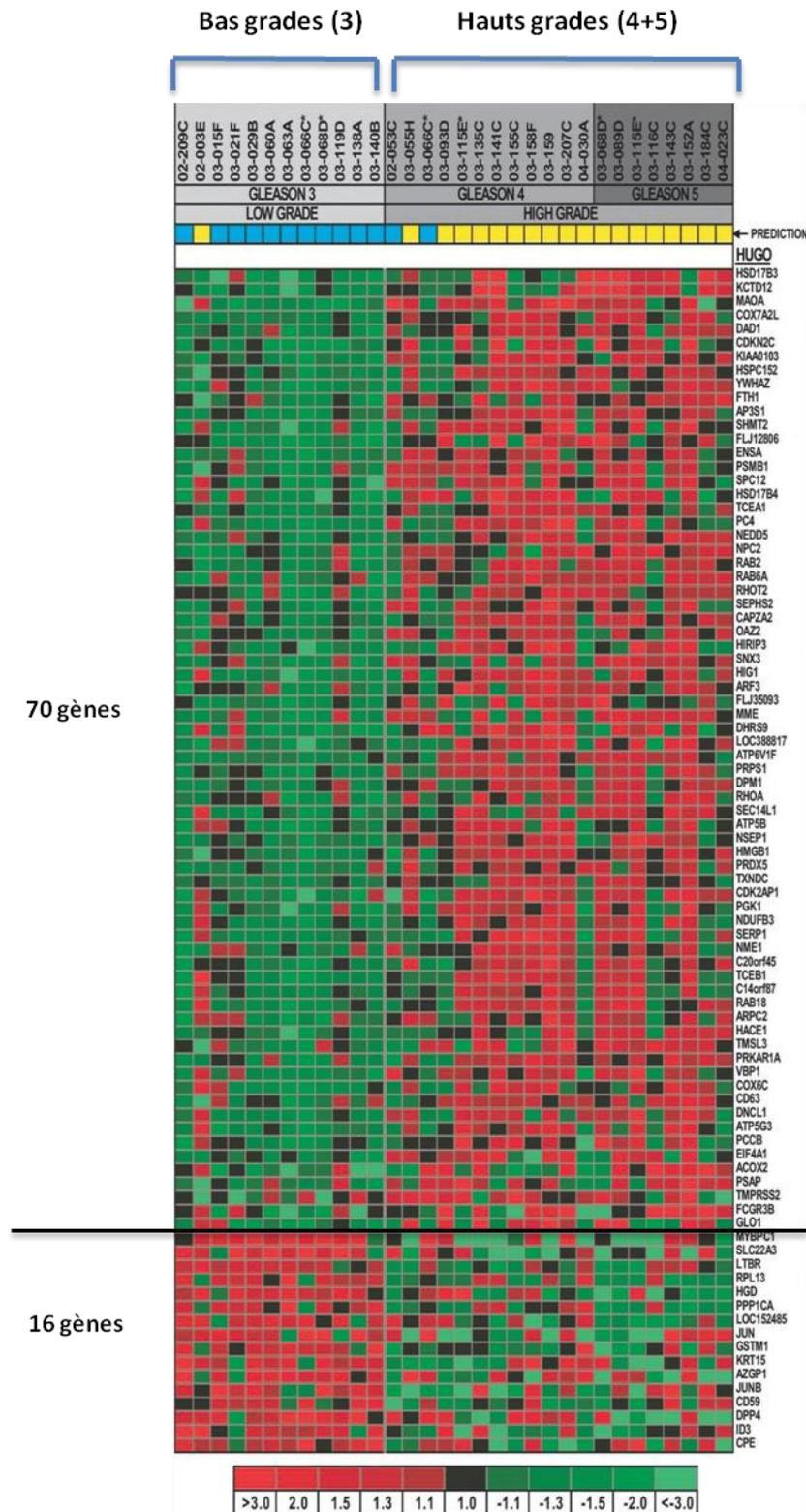


Figure 9 – Signature des 86 gènes dont le niveau d'expression permet de différencier les tumeurs de haut grade des tumeurs de bas grade (True et al. 2006).

La comparaison de ces résultats avec d'autres signatures d'expression corrélant avec le grade s'est révélée problématique car les études précédentes avaient pris en compte le score plutôt que les grades de Gleason. Par exemple, un score de Gleason égal à 8 peut être composé de profils 5 + 3 ou 4 + 4. Cela pose un problème dans la mesure où dans ce cas il est impossible de différencier les scores de 4 + 3 correspondant à une tumeur de haut grade et les scores de 3 + 4 correspondant à une tumeur de bas grade.

Deux études, publiées par Singh *et al.* et Lapointe *et al.*, ont identifié 29 et 42 gènes, respectivement, dont l'expression permet de discriminer le score de Gleason. Leur comparaison révèle que seulement trois gènes sont retrouvés en commun dans ces analyses : SPARC, BGN et COL1A2. Aucun de ces trois gènes ne figurant parmi ceux de la signature de True.

L'échantillonnage des analyses pose également problème puisqu'à la différence de l'étude de True, dont les échantillons ont été micro-disséqués, l'étude de Lapointe a été réalisée à partir de matériel non micro-disséqué. L'inconvénient de ce type d'échantillon est qu'il peut être hétérogène en termes de grade et contenir une quantité non négligeable de tissu normal. Or, l'altération de l'expression de gènes du stroma adjacent est maintenant bien démontrée (Cunha *et al.* 2002). Dans ce contexte, SPARC a été montré surexprimé dans le stroma adjacent d'un cancer du poumon non à petites cellules (Koukourakis *et al.* 2003), des carcinomes pancréatiques (Sato *et al.* 2003) et de façon similaire aux cancers de la prostate.

True et ses collaborateurs ont quand même testé la validité de leur signature dans l'étude de Lapointe. Sur leur 86 gènes, 77 sont présents dans l'étude de Lapointe *et al.*, avec suffisamment de données pour permettre une analyse associée au grade. L'étude non supervisée sur les 77 gènes a permis de classer correctement 73 % des Gleason 3 + 3 et des grades 4 + 4 et 4 + 5 d'après les échantillons et les données de Lapointe, démontrant ainsi la puissance de la signature de True.

Entre temps, d'autres publications ont identifié des signatures d'expression prédictives et/ou pronostiques du cancer de la prostate. Cuzick et ses collaborateurs ont créé un modèle pronostic de l'agressivité de la maladie, basé sur la combinaison de variables, telles que le score de Gleason, le niveau de PSA, le stage et le grade, ainsi que plusieurs paramètres cliniques (extension extracapsulaire, invasion de la vessie et des vésicules séminales). Ils ont aussi étudié le niveau d'expression de 31 gènes du cycle cellulaire et calculé, pour chaque

échantillon (cohorte prostatectomie (PR) et prostatectomie radicale trans-urétrale (TURP)), le score des gènes du cycle cellulaire (*CCP score*). Dans une analyse univariée et multivariée, le *CCP score* s'est avéré être le paramètre le plus prédictif du risque de rechute. D'après leurs résultats, le modèle le plus prédictif est l'association du niveau de PSA avec le *CCP score*. Leurs travaux montrent que l'étude des gènes du cycle cellulaire est un marqueur pronostique robuste du risque de rechute (Cuzick et al. 2011).

L'étude de Penney (Penney *et al.* 2011) a également identifié une signature de 157 gènes dont le niveau d'expression permet de discriminer les bas grades de Gleason des hauts grades. Cette signature permet de séparer de manière efficace (94 %) les scores de Gleason ≤ 6 et ≥ 8 . Elle est également capable de significativement différencier les scores 3 + 4 des scores 4 + 3. Ces résultats sont importants dans la compréhension de l'augmentation d'agressivité observée à partir des grades 4 + 3. Étant donné sa publication très récente, cette signature n'a pas pu être prise en compte dans notre approche *in silico*. Cependant, elle contient un certain nombre de gènes communs à ceux de la signature de l'étude de True *et al.*

IV.4. Signatures prédictives de réponse aux chimiothérapies

L'identification de ces signatures d'expression permet donc de caractériser les tumeurs de haut grade et d'utiliser ces gènes spécifiquement dérégulés pour prédire la réponse à divers types d'agents antiprolifératifs, ce que nous avons réalisé dans notre approche *in silico*.

IV.4.1. Données du National Cancer Institute (Scherf et al. 2000; Shoemaker 2006)

Des bases de données, comme celle du *Developmental Therapeutic Program* (DTP) du *National Cancer Institute* (NCI), contiennent une multitude d'informations relatives aux niveaux d'expression de milliers de gènes dans les 59 lignées tumorales et à la sensibilité *in vitro* de ces lignées à des centaines d'agents cytotoxiques.

Ces bases ont été construites par le NCI à la fin des années 1980 avec pour but de mieux comprendre les modes d'action des drogues et de découvrir des agents potentiellement intéressants. Le concept était basé sur une stratégie « orientée vers la maladie » exploitant un riche panel constitué de 59 lignées cancéreuses représentant différents types tumoraux : Leucémie, colon, poumon, système nerveux central (CNS), rein, mélanome, ovaire, sein et prostate. Ces lignées ont été caractérisées pharmacologiquement par leur niveau de

sensibilité à plus de cent mille composés, testés individuellement. Cette sensibilité a été évaluée par inhibition de croissance après 72 heures de culture en présence de l'agent cytotoxique. Le paramètre pris en compte pour l'évaluation de leur sensibilité était la concentration inhibant 50 % de la croissance (IC_{50}). Le profil d'activité des agents sur ces lignées cellulaires fournit des informations sur le mécanisme potentiel d'action des drogues et/ou le mécanisme de résistance à ces drogues. De plus, leurs profils d'expression génique ont été évalués par *microarray*.

La base de données du NCI représente donc une base riche en informations dans laquelle les données d'expression de milliers de gènes ainsi que la cytotoxicité de milliers d'agents antiprolifératifs sont en accès libre dans un format facilement manipulable à l'adresse web <http://dtp.nci.nih.gov>.

IV.4.2. Exemples de prédiction de réponse

De multiples études ont été réalisées à partir de ces banques de données (Robert et al. 2004). Elles ont, par exemple, confirmé que la surexpression du gène MDR1, codant la glycoprotéine-P responsable de l'exclusion des drogues hors de la cellule, apportait une résistance au traitement du cancer du sein (tous les agents cytotoxiques et en particulier la doxorubicine ainsi que l'hormonothérapie) (Trock et al. 1997). Un autre exemple montre que la surexpression du gène de l'ADN topoisomérase 2 (TOP2) est corrélée à une sensibilité aux anthracyclines (MacGrogan et al. 2003) et à l'étoposide (Braybrooke et al. 2003) dans le cancer du sein, ainsi qu'à une résistance à l'étoposide (Dingemans et al. 1999) dans les cancers du poumon à petites cellules.

Ces résultats confirment l'intérêt de la recherche de corrélations entre le niveau d'expression des gènes et la sensibilité aux drogues, afin d'identifier de nouveaux agents qui pourraient être utilisés dans un type tumoral spécifique, comme les cancers de la prostate de haut grade dans notre cas. Des études dans la vessie et le poumon ont déjà montré des résultats intéressants.

IV.4.3. Etudes dans la vessie

Dans le but d'exploiter la base de données du NCI pour prédire les réponses cliniques de patients atteints de cancer de vessie, l'équipe de Theodorescu a développé l'algorithme COXEN (« *coexpression extrapolation* »). Son développement fut motivé par le constat que le panel des lignées du NCI ne contenait pas tous les types tumoraux et notamment pas de lignées cellulaires provenant de cancers de la vessie. Leur démarche consistait donc à démontrer que les données de sensibilité du panel pouvaient être extrapolées afin de prédire la sensibilité de types cellulaires non inclus dans le panel initial. D'une façon plus ambitieuse, les données produites permettraient-elles de prédire la réponse des cancers chez l'Homme ? Ils ont démontré que leur algorithme était capable d'extrapoler les données de chimiosensibilité des 60 lignées du NCI aux lignées de cancers de vessie et du sein et de prédire la sensibilité à 45 545 agents candidats. Les résultats ont été validés sur une cohorte de patients atteints de cancer du sein traités au tamoxifène. L'utilisation de l'algorithme a correctement différencié les répondeurs des non répondeurs avec une précision de 71 % (Lee *et al.* 2007).

Les auteurs ont ensuite montré (Williams *et al.* 2009) l'utilité de leur modèle d'expression génique pour la prédiction du taux de survie de cohortes de patients japonais et danois. Ainsi, la prédiction du taux de survie globale à 3 ans était, par exemple, de 81 % pour les patients possédant une signature d'expression génique favorable et de 33 % pour les patients à signature défavorable, dans une cohorte de patients atteints de cancers de la vessie et traités avec du méthotrexate, de la vinblastine, de l'adriamycine et du cisplatine.

IV.4.4. Etudes dans le poumon

L'utilisation de l'algorithme COXEN a ensuite été repris lors d'une étude visant à optimiser l'identification de biomarqueurs prédisant l'efficacité thérapeutique de deux composés : le vorinostat, un inhibiteur d'histone déacétylase et le velcade, un inhibiteur du protéasome. Le modèle prédictif de la sensibilité à ces composés a été réalisé sur un panel de 9 lignées cellulaires du panel du NCI. Indépendamment, des concentrations inhibant 50 % de la croissance (IC_{50}) ont été calculées sur un panel de 40 lignées cellulaires cancéreuses de cancer du poumon non-à-petites cellules (NSCLC). Le profil d'expression génomique de ces deux panels de lignées cellulaires a été réalisé par *microarray* Affymetrix utilisant des puces U133A, générant une signature prédictive de 45 gènes pour le vorinostat et de 15 gènes

pour le velcade. L'analyse multivariée de ces deux signatures a significativement prédit l'efficacité d'une combinaison de ces deux agents ($p = 0,007$) dans des cellules NSCLC. Cette étude montre, encore une fois, l'efficacité d'une telle approche *in silico*, générant des biomarqueurs qui prédisent la sensibilité des tumeurs aux thérapeutiques seules ou en combinaison (Nagji et al. 2010).

VI. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

À l'heure actuelle, les cancers de la prostate de haut grade restent un challenge thérapeutique. Contrairement à la plupart des pathologies cancéreuses, il n'existait pas, jusqu'à très récemment, de seconde ligne pour le traitement des patients atteints d'un cancer prostatique agressif résistant à l'hormonothérapie. De nombreux essais cliniques ont évalué l'efficacité d'agents cytotoxiques autres que les taxanes, comme les dérivés du platine. Cependant, les résultats en termes de réponse sont loin des objectifs escomptés, et les oncologues n'ont guère de solutions à proposer.

L'association du docétaxel aux thérapeutiques habituelles permet d'obtenir au mieux une stabilisation de la progression tumorale. Il existe donc un besoin crucial d'identifier de nouvelles stratégies pour ces cancers de prostate de haut grade.

Pour cela, il est nécessaire d'identifier les déterminants de la sensibilité ou de la résistance aux drogues. De nombreuses études ont identifié des marqueurs prédictifs de la réponse, en se basant sur les caractéristiques individuelles de chaque tumeur. Ces approches rationnelles partent du principe que l'altération du niveau d'expression de gènes importants pour la prolifération des cellules cancéreuses conditionne l'efficacité des agents antiprolifératifs.

À ce sujet, les outils bioinformatiques, permettant de croiser les données pharmacologiques des agents utilisés en clinique avec les caractéristiques génétiques des tumeurs, représentent une possibilité intéressante dans la recherche de ces facteurs prédictifs de réponse. Les oncologues se dirigent irrémédiablement vers une idéologie thérapeutique bien différente : ne plus prescrire en fonction de la localisation tumorale mais plutôt en fonction du profil moléculaire spécifique de chaque tumeur.

Dans la plupart des essais cliniques, la population recrutée était très hétérogène, allant de patients lentement évolutifs asymptomatiques à des patients présentant des tumeurs plus agressives. De plus, ils n'étaient pas stratifiés selon le grade de Gleason. Or, nous avons mentionné précédemment les études ayant clairement identifié les différences génétiques entre les grades de Gleason. Ainsi, l'étude de True *et al.* a clairement montré qu'il était possible de distinguer les grades de Gleason en évaluant le niveau d'expression de 86 gènes,

avec une fiabilité supérieure à 75 %. Ces gènes sont probablement le reflet des voies cellulaires altérées dans le processus de cancérogenèse.

Le but de notre travail était d'identifier une alternative thérapeutique au docétaxel sur une base plus rationnelle qui prenne en compte les caractéristiques génétiques spécifiques des tumeurs de haut grade et en particulier l'expression des 86 gènes de la signature de True *et al.*

Le premier objectif était de rechercher, parmi ces gènes, ceux dont le niveau d'expression était susceptible d'influencer la réponse cellulaire à un ou plusieurs agents cytotoxiques ou antiprolifératifs afin d'identifier des drogues ou des familles de drogues qui pourraient éventuellement être testées en deuxième ligne de traitement. Cette analyse a donc pour but d'identifier des couples gène-drogue d'intérêt et repose sur l'exploitation de la base de données du *Developmental Therapeutic Program* du *National Cancer Institute*, dont l'utilité et la richesse ont été largement démontrées. Le but est d'y extraire le profil d'expression des 86 gènes de la signature de True *et al.* dans les 59 lignées et de rechercher, par des tests statistiques appropriés, des corrélations entre le niveau d'expression de ces gènes et la sensibilité à un panel de drogues, représentant différentes classes d'agents antiprolifératifs.

Le second objectif était de valider, parmi les corrélations obtenues par cette approche *in silico*, si la modulation du niveau d'expression des gènes d'intérêt permet effectivement de modifier la sensibilité cellulaire *in vitro* aux drogues candidates. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser une approche d'interférence à l'ARN pour moduler le niveau d'expression des gènes candidats dans des lignées cellulaires de cancer de la prostate et de vérifier si cette modulation avait un impact sur l'efficacité de l'agent testé. Cette validation devrait permettre l'identification d'une signature de gènes, dans laquelle, le niveau d'expression d'un gène sera prédictif de l'efficacité de la drogue.

Sur le plan fondamental, cette approche permet d'identifier de nouveaux mécanismes et marqueurs de la réponse à ces médicaments.

Cette signature devra ensuite être validée sur des modèles précliniques tels que les xénogreffes ou primocultures obtenues à partir de biopsies de patients. A plus long terme, ces résultats devraient permettre la mise en place d'essais cliniques dans lesquels les drogues identifiées seraient testées seules ou en association, chez une population de patients sélectionnés sur la base de la signature.

INTRODUCTION - PARTIE II

Sommaire

I. LES SELS DE PLATINE	77
I.1. Historique	77
I.2. Les analogues du platine et leur utilisation thérapeutique	77
I.3. Modes d'action.....	79
I.4. Signature de réponse spécifique des DACH platines	80
II. ALTÉRATION DES VOIES MÉTABOLIQUES DANS LES HAUTS GRADES	82
III. LE MÉTABOLISME MONOCARBONÉ	83
III.1. Régulation du pool glycine – sérine	84
III.2. Cycle du THF	86
III.3. Cycle de la méthionine et de la méthylation de l'ADN	87
III.4. Dérégulation des voies métaboliques dans les cancers de la prostate.....	89
IV. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	94

Comme nous le verrons plus loin, notre approche *in silico* a permis de mettre en évidence un très grand nombre de corrélations entre le niveau d'expression des 86 gènes de la signature de True et la sensibilité des 59 lignées cellulaires du panel à de multiples agents antiprolifératifs. Étant donné que notre objectif était de valider la preuve de concept de notre approche, nous avons fait le choix de restreindre la partie validation fonctionnelle des résultats *in silico* à une seule classe d'agents anticancéreux : les dérivés du platine, notamment le cisplatine et l'oxaliplatine qui sont couramment utilisés en clinique dans d'autres indications que les cancers de la prostate.

I. LES SELS DE PLATINE

I.1. Historique

Les sels de platines ont été découverts fortuitement par Barnett Rosenberg en 1965 qui, en étudiant l'effet de courants électriques sur des cultures bactériennes, a constaté que la proximité des électrodes de platines plongées dans un tampon de chlorure d'ammonium inhibait la croissance des bactéries. Il en a déduit que les sels de platine formaient des complexes comprenant des ions ammonium et chlore. Il démontra la formation de dichlorodiamine-platine et dès lors il orienta ses recherches vers l'activité antitumorale de ces composés (Rosenberg et al. 1965; Rosenberg et al. 1969).

I.2. Les analogues du platine et leur utilisation thérapeutique

Le développement et l'amélioration des thérapeutiques a permis à la famille des platines de s'enrichir de composés toujours plus efficaces et mieux tolérés.

Ainsi, les générations successives des analogues du platine sont représentées sur la figure 10 :

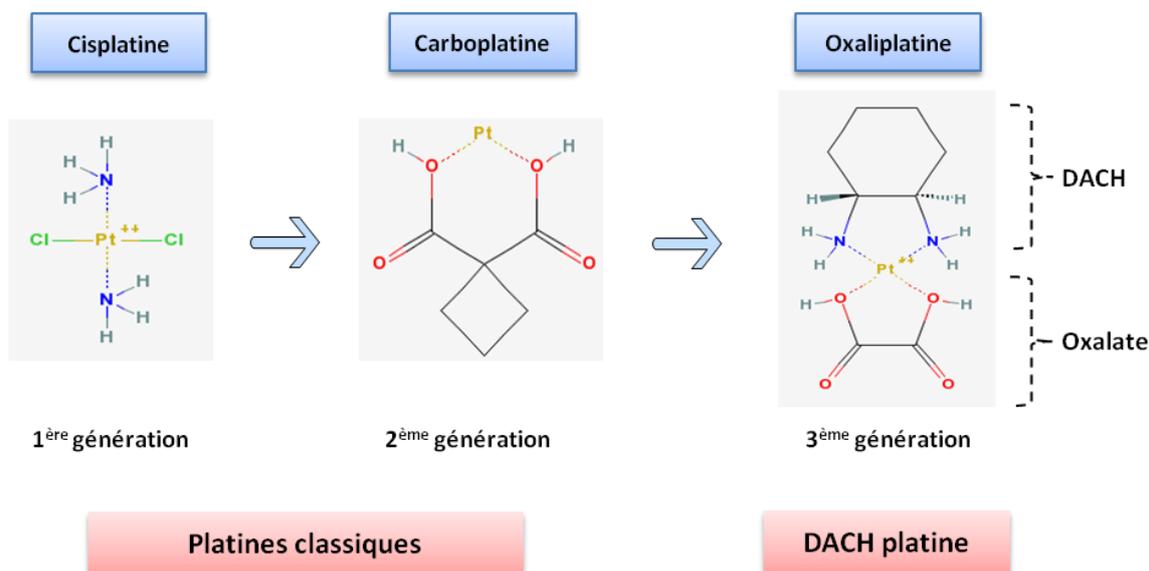


Figure 10 – Structure des principaux dérivés des sels de platine.

Dans les années 1970, l'arrivée du cisplatine représente une avancée majeure dans le traitement des tumeurs solides. Les résultats les plus remarquables à ce jour sont une possibilité de guérison pour la majorité des patients porteurs de tumeurs germinales testiculaires et une amélioration de la survie dans les cancers avancés de l'ovaire. Le cisplatine est aussi à la base de nombreux protocoles de chimiothérapie, concernant les tumeurs de la prostate, du col de l'utérus, de l'ovaire, de l'endomètre, du poumon, de la vessie, des voies aérodigestives, des sarcomes et des neuroblastomes. La prescription de ce médicament est cependant responsable de toxicités limitantes (rénale, auditive et neurologique) et les moyens thérapeutiques mis à la disposition des cliniciens pour les maîtriser sont d'une efficacité limitée. De nombreuses équipes de recherche ont donc synthétisé des analogues présentant à la fois un profil de toxicité clinique différent, un spectre de cytotoxicité plus large et contournant les phénomènes de résistance. Sur les 3000 dérivés qui ont vu le jour, seulement 6 ont été inclus dans des essais cliniques et seulement 3 sont utilisés : le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine (Laadem *et al.* 2001).

Le carboplatine diffère du cisplatine par le remplacement des groupements chlores par des groupements carboxylates. Cette modification diminue la capacité du carboplatine à se distribuer dans l'organisme, nécessitant d'utiliser des concentrations plus importantes que

pour le cisplatine pour obtenir le même effet. Le carboplatine est utilisé pour le traitement des cancers du testicule, de l'ovaire, des voies aérodigestives et du poumon. Il provoque moins de toxicité rénale et neurologique que le cisplatine. En revanche, il existe un risque plus marqué de saignements et une résistance croisée avec le cisplatine (InfoCancer). Bien qu'il fasse partie de la seconde génération d'analogues, il appartient toujours à la famille des platines dits « classiques ».

L'oxaliplatine, un analogue de troisième génération, est utilisé pour le traitement de tumeurs résistantes au cisplatine et au carboplatine. Il est prescrit notamment pour le traitement du cancer du colon. Son association avec le 5-fluoro-uracile et l'acide folinique, appelé protocole FOLFOX, ainsi que le protocole FOLFIRI (Irinotecan en remplacement de l'acide folinique) sont particulièrement efficaces (Laadem and Cvitkovic 2001). Par rapport aux autres dérivés à base de platine, il est peu hémotoxique et n'a pas de toxicité rénale. En revanche, il est responsable de neuropathies sévères. L'oxaliplatine est le premier analogue de troisième génération appartenant à la famille des DACH-platines, en raison de son groupement DiAminoCycloHexane. Il contient également un groupement oxalate qui est en partie responsable, *via* des canaux sodium voltage-dépendants (Grolleau et al. 2001), de la neurotoxicité de la molécule (Gamelin et al. 2007).

1.3. Modes d'action

L'ADN est la cible cellulaire principale des sels de platine et leur propriété anti-tumorale résulte de leur capacité à former des pontages intra-brins ou inter-brins avec l'ADN, bloquant la réplication, la transcription et induisant la mort cellulaire (Farrell et al. 1989; Johnson et al. 1998).

Les propriétés anti-tumorales du cisplatine sont attribuées à la mobilité de ses groupements chlorés à l'origine des pontages de l'ADN (« *cross-links* »). Cette structure interfère avec la réplication et la transcription, causant l'arrêt de la prolifération cellulaire. La majorité des dommages à l'ADN causés par le cisplatine sont des pontages intra-brins sur des motifs dinucléotides de type GG ((dG)₂) et AG (d(ApG)) (Teni Boulikas 2007). Il a aussi été montré que la fixation de certaines protéines (dont la protéine HMGB1) sur l'ADN lié au cisplatine permet de sensibiliser les cellules au cisplatine (Jamieson *et al.* 1999; Jamieson *et al.* 1999). Les pontages formés sont préférentiellement réparés par les systèmes NER (*Nucleotide Excision Repair*) et le système HR (*Homologous Recombination*). Une déficience du système

HR est corrélée avec une sensibilité accrue au cisplatine (Takata *et al.* 2001; van der Heijden *et al.* 2005). Bien que possédant une résistance croisée avec le cisplatine, le carboplatine constitue une alternative raisonnable en raison de sa toxicité moindre et de ses bénéfices lors de son association à la gemcitabine dans le traitement des cancers du poumon non-à-petites cellules. La combinaison carboplatine/paclitaxel et carboplatine/docétaxel est également efficace contre ce type de tumeurs (Kosmidis *et al.* 2002). Cependant, le carboplatine n'élargit pas le spectre d'activité clinique des platines ; il est intéressant seulement dans l'optique de réduire les effets indésirables du cisplatine.

La substitution des groupements amines du cisplatine par un groupement 1,2-DACH a permis la naissance des DACH platines. Rapidement, ces analogues (oxaliplatine et tétraplatine) se sont montrés actifs sur des lignées résistantes au cisplatine (Burchenal *et al.* 1980). Le spectre d'activité est différent de celui des platines classiques. L'évaluation du tétraplatine est restée au stade de phase I, stoppé par une neurotoxicité sensorielle pure, sévère et précoce. L'oxaliplatine est donc le seul de la famille des DACH platines à avoir passé les essais cliniques avec succès (Schilder *et al.* 1994). L'oxaliplatine se fixe sur des répétitions de désoxyguanosines (d(GpG)) sur l'ADN simple-brin. D'autres types d'adduits sont formés sur l'ADN double-brin, incluant des liaisons intra-brins sur les sites d(ApG) et des liaisons inter-brins sur des guanosines des chaînes opposées (dG)₂ (Inagaki *et al.* 1985; Boudny *et al.* 1992).

La formation des adduits sur les brins d'ADN serait pour l'oxaliplatine plus rapide que pour les autres platines : la platination (nombre maximal d'adduits formés) est maximale à la 12e heure pour le cisplatine, à la 24e heure pour le carboplatine (Micetich *et al.* 1985); alors que pour l'oxaliplatine, les liaisons aux sites nucléotidiques d(GpG) et (dG)₂ sont établies en quinze minutes et la fixation aux sites d(ApG) en 2 heures environ (Jennerwein *et al.* 1989).

I.4. Signature de réponse spécifique des DACH platines

Notre approche nous a permis d'identifier des gènes dont l'expression était sélectivement corrélée à l'oxaliplatine et d'autres uniquement au cisplatine. Ces résultats nous ont conduits à explorer de façon plus détaillée le mécanisme de cette spécificité en nous intéressant plus particulièrement à certains gènes impliqués dans des voies importantes dérégulées dans les cancers de hauts grades, notamment certaines voies du métabolisme au sens large du terme. En effet, parmi les 86 gènes dont le niveau d'expression varie entre les

différents grades de Gleason, 42 % d'entre eux jouent un rôle dans le métabolisme énergétique, des sucres, des lipides et des protéines. D'après nos résultats *in silico*, 38,8 % des gènes, dont le niveau d'expression est corrélé à la sensibilité aux dérivés du platine, jouent un rôle dans une des voies métaboliques étudiées.

II. ALTÉRATION DES VOIES MÉTABOLIQUES DANS LES HAUTS GRADES

Parmi les gènes de notre signature jouant un rôle dans des processus métaboliques, deux gènes ont retenu notre attention :

- Le gène *TMPRSS2* qui a largement été décrit comme étant un marqueur du cancer de la prostate. En effet, dans la majorité des cancers de la prostate, une translocation aboutit à la fusion du gène *TMPRSS2* avec un facteur de transcription de la famille ETS, le gène *ERG*. Cette translocation est uniquement retrouvée dans le tissu prostatique et fut, à ce titre, le premier réarrangement chromosomique identifié comme étant spécifique d'un tissu. Le promoteur du gène *TMPRSS2* contient une séquence de fixation au récepteur aux androgènes, lui assurant une expression de base élevée dans le tissu prostatique ainsi qu'une forte surexpression dans le carcinome prostatique. De plus, *ERG*, lorsqu'il est retrouvé fusionné à *TMPRSS2*, se retrouve également surexprimé (Tomlins *et al.* 2005; Rostad *et al.* 2007; Narod *et al.* 2008).

- Le gène *SHMT2*, codant la *Serine HydroxyMethyl Transferase 2*, appartient à une des voies métaboliques les plus couramment dérégulées dans le processus de carcinogenèse (Niclot *et al.* 2006; Weinstein *et al.* 2006; Rouissi *et al.* 2009; Donkena *et al.* 2010; Eussen *et al.* 2010; Levine *et al.* 2010; Mohammad *et al.* 2011) : la voie du métabolisme monocarboné, également appelé voie des folates et de la méthionine. Cette voie est impliquée dans la synthèse des bases de l'ADN, la production d'acide folique ainsi que les réactions de méthylation de l'ADN. Il s'agit donc d'une voie cruciale pour la prolifération cellulaire ainsi que la régulation épigénétique du génome. Il n'est donc pas surprenant que sa dérégulation soit associée aux processus de cancérogenèse.

Jusqu'à présent, aucun lien n'avait été rapporté entre le gène *SHMT2* et la voie du métabolisme monocarboné dans laquelle il joue un rôle clé, et la sensibilité aux dérivés du platine.

III. LE MÉTABOLISME MONOCARBONÉ

Le schéma général du métabolisme monocarboné est présenté figure 11. Cette voie a pour fonction le transfert d'unités à un carbone (C1) pour la synthèse de l'ADN et pour la méthylation de l'ADN et de protéines, tout en dépendant des apports nutritionnels (Vitamines B12, B2, B6, et B9 (ou acide folique) et d'autres micronutriments). Elle est composée de trois cycles interconnectés, dans laquelle la perturbation d'un des cycles a des répercussions sur l'ensemble des réactions métaboliques de cette voie :

- Le cycle de régulation du pool glycine-sérine : il est le moteur principal de la voie. La conversion de la sérine en glycine est indispensable au cycle du tétrahydrofolate (THF) puisque la sérine est le donneur d'unité C1 pour le THF.
- Le cycle du THF : ce cycle, dépendant des apports en vitamines, permet la synthèse de méthionine, nécessaire au bon fonctionnement du cycle assurant la méthylation de l'ADN et des protéines.
- Le cycle de la méthionine : il est d'une importance capitale pour la régulation épigénétique du génome. Sa dérégulation a des conséquences directes sur le degré de méthylation de l'ADN.

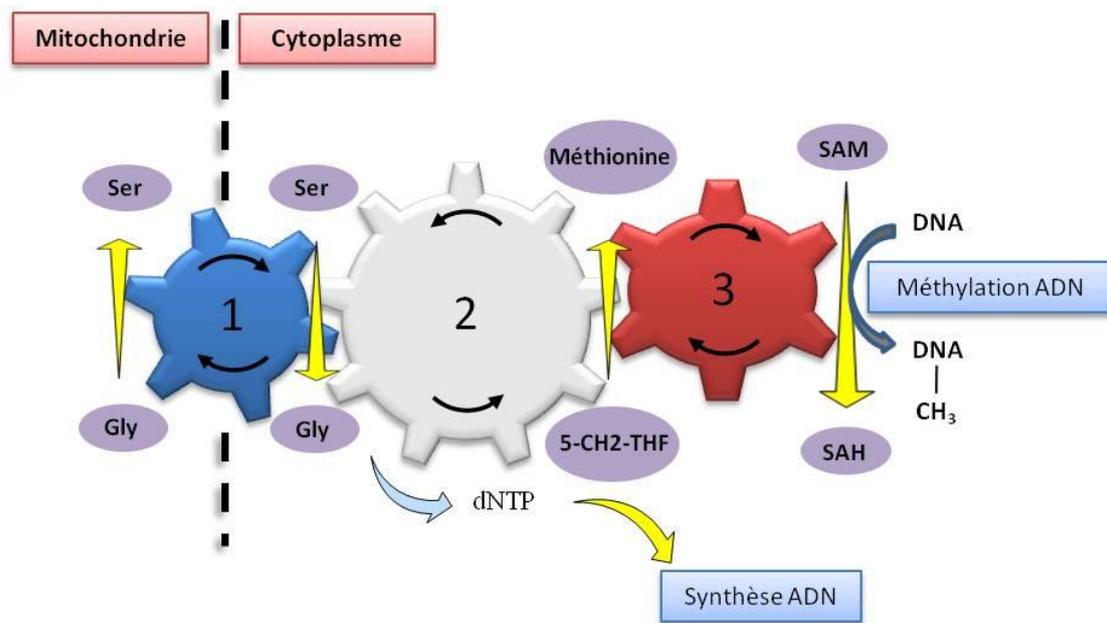


Figure 11 - Schéma général du métabolisme monocarboné.

5-CH₂-THF, 5-méthylène-THF; *dNTP*, désoxy NucléotideTriPhosphate; *Ser*, Sérine ; *Gly*, Glycine ; *SAM*, S-Adénosyl-Méthionine ; *SAH*, S-Adénosyl-Homocystéine.

Étant donné l'interconnexion entre ces deux cycles, il est possible que la dérégulation du pool de glycine et de sérine dans la mitochondrie puisse avoir des répercussions sur les autres métabolites de ces voies et conduire à des altérations du niveau de méthylation de l'ADN, cible principale des dérivés du platine. C'est cette hypothèse que nous avons voulu tester dans le volet plus « fondamental » de notre travail.

III.1. Régulation du pool glycine – sérine

Le schéma de la régulation du pool de glycine et de sérine est présenté sur la figure 12.

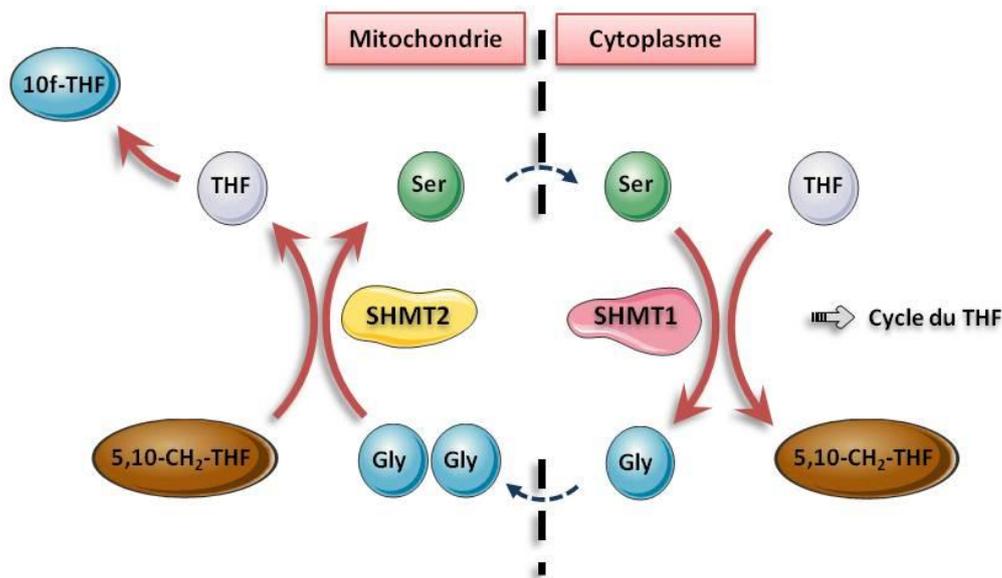


Figure 12 - Schéma de la régulation du pool de glycine et de sérine.

5,10-CH₂-THF, 5,10-méthylène-THF; **10f-THF**, 10 formyl-THF; **Gly**, Glycine; **Ser**, Sérine; **SHMT1**, Sérine HydroxyMethyl-Transferase 1; **SHMT2**, Sérine HydroxyMethyl-Transferase 2; **THF**, Tétrahydrofolate.

Cette voie contrôle la disponibilité en glycine et en sérine dans 2 compartiments de la cellule : le cytoplasme et la mitochondrie. Le gène SHMT2, dont l'étude de True a révélé la surexpression dans les tumeurs de haut grade, joue un rôle déterminant dans cette voie. Il est responsable, dans le compartiment mitochondrial, de la conversion de deux glycines en sérine. La conversion initiale d'une sérine en glycine, dans le cytoplasme, est assurée par l'enzyme SHMT1. Ces conversions sont réversibles et à l'origine, on pensait qu'une seule et même enzyme assurait les deux réactions (Appling 1991). Or, il fut démontré plus tard que cela résultait de l'action de deux isoformes distinctes, à activité redondante, la SHMT cytoplasmique (cSHMT ou SHMT1) et la SHMT mitochondriale (mSHMT ou SHMT2). Ces deux protéines ubiquitaires sont codées par deux gènes distincts, dérivant d'un gène ancestral, situés sur des chromosomes différents : le chromosome 17, locus p11.2 pour SHMT1 et le chromosome 12, locus q12-q14 pour SHMT2. Ces gènes possèdent 63 % d'homologie et sont très conservés entre les espèces (Garrow et al. 1993).

La concentration en sérine et en glycine dans le cytoplasme dépend des apports nutritionnels en acides aminés. L'apport d'unités monocarbonées par la conversion de la

sérine en glycine par SHMT1 est la réaction initiant la voie du métabolisme monocarboné. Cette réaction est couplée à la transformation du THF en 5,10-CH₂-THF. La glycine produite possède la capacité de diffuser dans la mitochondrie pour y être « recyclée ». Ainsi, lorsque sa concentration y est suffisante, deux glycines seront converties en sérine par l'activité de SHMT2. Cette sérine ainsi produite va repasser dans le cytoplasme et reformer le pool de sérine disponible. Cette réaction nécessite la présence de 5,10-CH₂-THF dans un cycle similaire au cycle du THF cytoplasmique. Il est responsable de la production d'unités monocarbonées sous forme de formate (10f-THF) qui seront exporté dans le cytoplasme.

Il a été montré que la protéine SHMT1 agit comme un interrupteur métabolique (« *switch* »), qui lors d'une suractivation de la voie va prioriser la production des bases pyrimidiques, au détriment de la synthèse de S-Adénosyl-Méthionine (SAM).

Cette régulation du pool de glycine et de sérine est donc un cycle finement régulé qui garantit la disponibilité de ces acides aminés, essentiels à la division cellulaire.

III.2. Cycle du THF

Le cycle du THF est présenté figure 13. L'initiation de ce cycle va de paire avec la conversion de la sérine en glycine par la SHMT1. Le transfert de deux C1 sur une molécule de THF produit de la glycine et du 5,10-CH₂-THF. Le 5,10-CH₂-THF représente la source principale d'unités C1 pour l'ensemble des réactions du cycle. Deux voies, utilisant le 5,10-CH₂-THF, permettent la synthèse des bases de l'ADN. La première convertit le 5,10-CH₂-THF en dihydrofolate (DHF) par la thymidilate synthase (TS) et permet la synthèse de dTMP à partir de dUMP et de dCMP à partir du dTMP. Cette voie permet donc la synthèse des pyrimidines. La seconde voie utilise le formate produit dans la mitochondrie pour le convertir en THF grâce à la 5-aminoimidazole-4-carboxamide formyltransferase (ATIC). Cette voie permet la synthèse des purines (adénine et guanine).

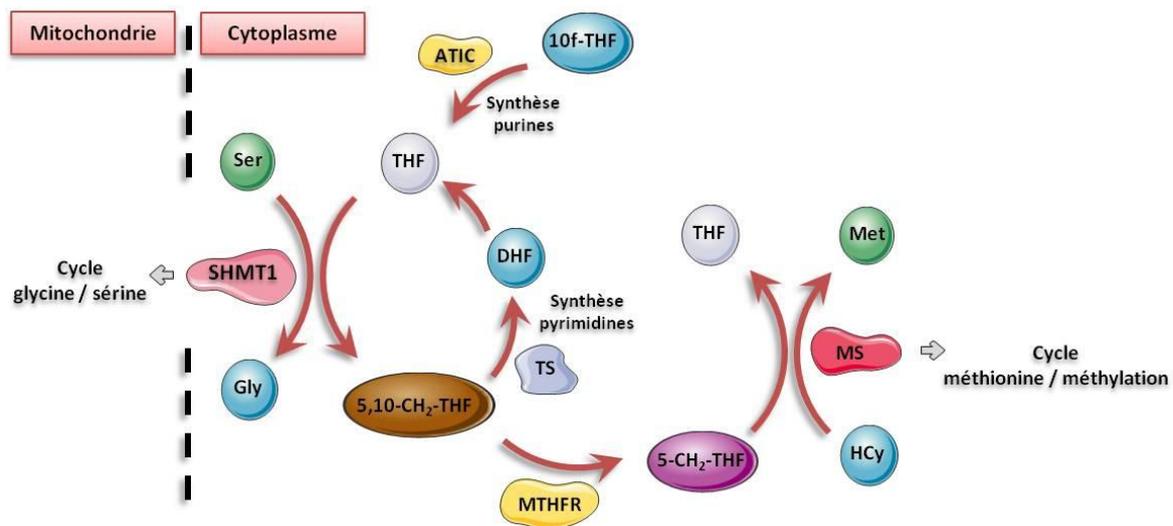


Figure 13 - Schéma du cycle du tétrahydrofolate.

5-CH₂-THF, 5-méthylène-THF; **5,10-CH₂-THF**, 5,10-méthylène-THF; **10f-THF**, 10 formyl-THF ; **ATIC**, 5-aminoimidazole-4-carboxamide formyltransférase ; **DHF**, DiHydroFolate ; **Gly**, Glycine ; **HCy**, HomoCystéine ; **Met**, Méthionine ; **MS**, Méthionine Synthase ; **MTHFR**, Méthylène TétrahydroFolate Réductase ; **Ser**, Sérine ; **SHMT1**, Sérine HydroxyMethyl-Transférase 1 ; **THF**, TétrahydroFolate ; **TS**, Thymidilate Synthase.

Le 5,10-CH₂-THF peut être réduit en 5-CH₂-THF par la Méthylène TétrahydroFolate Reductase (MTHFR), qui servira ensuite de donneur d'unité C1 pour la reméthylation de l'homocystéine (HCy) en méthionine. Cette réaction permet de maintenir un apport constant en méthionine pour la synthèse protéique et pour les réactions de méthylation de l'ADN (Herbig et al. 2002). Le THF ainsi que ses formes méthylées représentent les éléments régulateurs de cette voie.

III.3. Cycle de la méthionine et de la méthylation de l'ADN

Le cycle de la méthionine et de la méthylation de l'ADN est représenté figure 14. Ce cycle est couplé à celui du THF. Le 5-CH₂-THF est la forme de folate majoritaire dans le cytoplasme. Il est le donneur principal d'unités C1 et se retrouve transformé en S-Adénosyl-Méthionine (SAM) par la Méthionine Adénosyl Transférase (MAT) en présence d'ATP. La SAM est le cofacteur pour les réactions de méthylation des protéines, des lipides, des neurotransmetteurs, de l'ARN et de l'ADN (Herbig et al. 2002). La SAM est le donneur de groupement CH₃, principalement pour la méthylation de l'ADN par la famille des DNA-Methyl Transférase (DNMT). La S-Adénosyl-Homocystéine (SAH) produite sera reconvertie en Homo-

Cystéine (HCy) par la S-Adénosyl-Homocystéine Hydrolase (SAHH). L'Homo-Cystéine formée sera finalement reconvertie en méthionine.

Un élément régulateur crucial de cette voie se trouve dans la réaction de conversion de la SAM en SAH. En effet, il a été montré que lors de l'accumulation de SAM (par une alimentation riche en folates par exemple), la cellule utilise une autre réaction métabolique pour convertir la SAM en SAH. Le but de ce contournement est d'éviter des réactions aberrantes de méthylation de l'ADN. Ainsi, l'excès de SAM est consommé par la production de sarcosine (Sar) à partir de glycine grâce à l'activité de la Glycine N-Méthyl Transférase (GNMT). Cette enzyme est un élément clé régulant les réactions de méthylation. De plus, la conversion de la glycine en sarcosine est régulée par la fixation du 5-CH₂-THF à la GNMT. En effet, il a été montré que deux molécules de 5-CH₂-THF se fixent à un tétramère de GNMT et inhibent son activité (Luka 2008).

Ce cycle dispose donc d'un système de régulation complexe qui lui permet d'assurer des fonctions aussi importantes que le processus de méthylation. Son interconnexion avec les autres cycles est indispensable à son fonctionnement, les métabolites synthétisés par les autres voies étant impliqués dans l'activation ou l'inhibition de certaines réactions. Sa complexité en fait aussi son point faible ; la modification de la concentration d'un métabolite peut avoir des répercussions sur l'ensemble du métabolisme monocarboné.

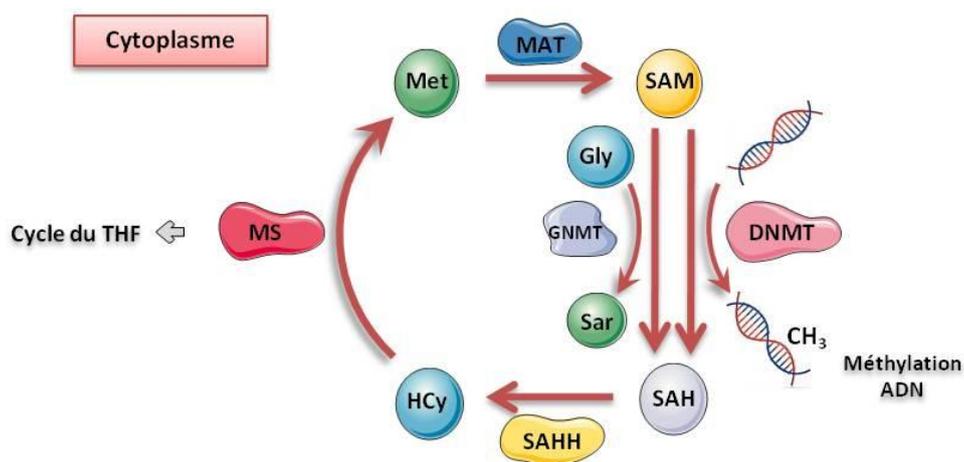


Figure 14 - Schéma du cycle de la méthionine et de la méthylation de l'ADN.

DNMT, DNα Méthyl-Transférase ; **Gly**, Glycine ; **GNMT**, Glycine N-Méthyl Transférase ; **HCy**, HomoCystéine ; **MAT**, Méthionine Adénosyl Transférase ; **Met**, Méthionine ; **MS**, Méthionine Synthase ; **SAHH**, S-Adénosyl-Homocystéine Hydrolase ; **Sar**, Sarcosine ; **THF**, TétrahydroFolate.

III.4. Dérégulation des voies métaboliques dans les cancers de la prostate

La dérégulation du cycle des folates et de la méthionine et son implication dans de multiples pathologies humaines a été largement étudiée. Par exemple, une étude a évalué s'il existait un lien entre des facteurs de l'alimentation et le risque de développer un cancer de la prostate. Ce travail a étudié les habitudes alimentaires et notamment la prise de vitamine B2 (folate), B6, B12 et de méthionine, de 1270 patients atteints d'un cancer de la prostate. Leurs résultats montrent que l'alimentation riche en vitamine B6 est inversement associée au risque de cancer de la prostate alors que la prise de vitamine B12 est corrélée à une augmentation du risque de développer ce cancer. D'après leurs résultats, il n'est pas possible de confirmer le rôle supposé protecteur du cycle des folates contre le cancer de la prostate (Weinstein et al. 2006). Néanmoins, cette étude montre que la dérégulation de ce cycle semble avoir un impact sur la cancérogenèse. Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude de True montre qu'environ la moitié des gènes, différenciellement exprimés dans les cancers de la prostate de haut grade, jouent un rôle dans des processus métaboliques (True *et al.* 2006). Une autre étude, réalisée par Penney et ses collaborateurs a étudié les voies dérégulées dans les cancers de la prostate de haut grade par une analyse GSEA, pour *Gene Set Enrichment Analysis*. Cette technique, permettant l'interprétation des données d'expression, se concentre sur des groupes de gènes partageant des fonctions biologiques, des localisations chromosomiques ou des modes de régulation communs. Leurs résultats montrent que, parmi les voies surexprimées, figurent les voies du métabolisme de la pyrimidine, de la GSK3, de Notch ainsi que la voie des folates et du métabolisme monocarboné. Le gène SHMT2 figure parmi leur signature de 157 gènes dont le niveau d'expression est prédictif du grade de Gleason. Ces résultats démontrent une fois de plus l'implication de cette voie dans l'oncogenèse des cancers de la prostate de haut grade (Penney *et al.* 2011).

Une autre étude d'envergure a également montré une dérégulation du métabolisme associé à l'évolution des cancers de la prostate (Sreekumar *et al.* 2009). Cette étude visait à identifier des marqueurs de la progression tumorale directement au niveau des métabolites retrouvés dans les tissus ou dans l'urine des patients.

Ces résultats présentés figure 16 montrent une différence significative de la concentration en plusieurs métabolites de patients atteints de pathologies bénignes, de cancers localisés et de cancers métastatiques.

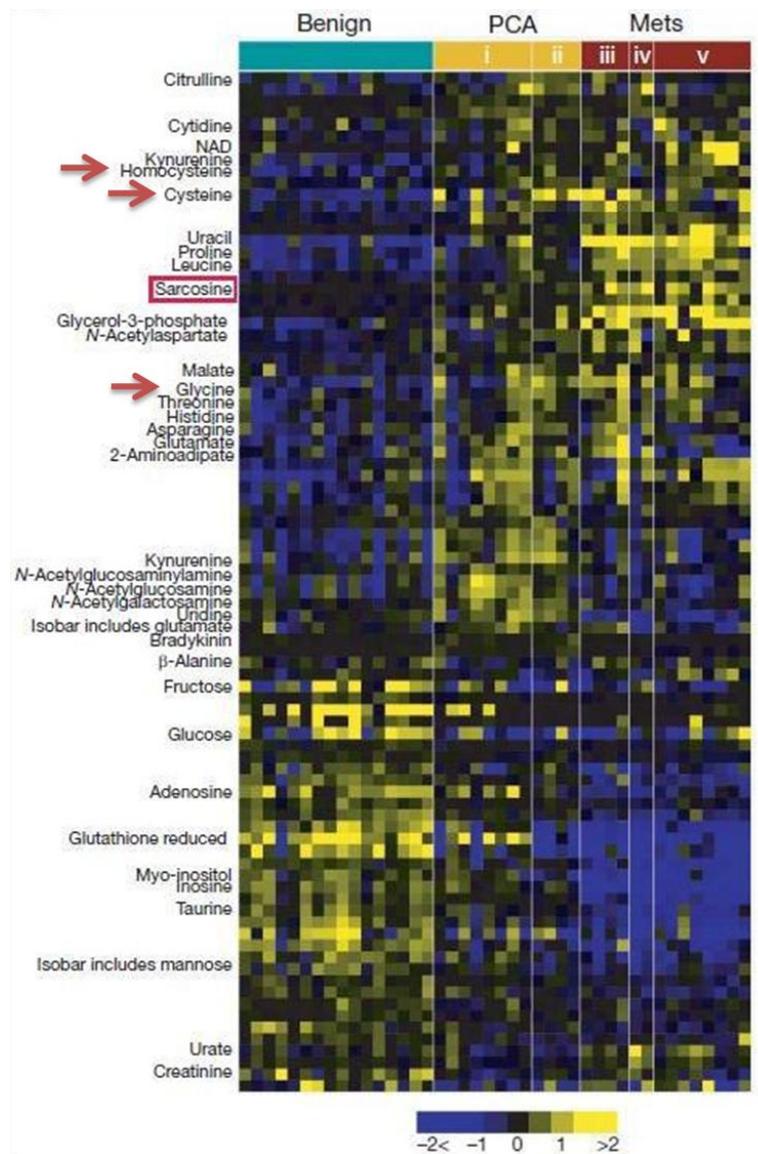


Figure 15 – Représentation graphique de type *Heat-map* montrant les 87 métabolites dérégulés dans les cancers de la prostate (Sreekumar *et al.* 2009).

i, cancers de prostate localisés (Gleason 3+3 et 3+4) ; **ii**, cancers de prostate localisés (Gleason 4+3 et 4+4) ; **iii**, métastases au niveau des tissus mous ; **iv**, métastases au niveau du diaphragme ; **v**, métastases au niveau hépatique.

Parmi ces métabolites, quatre sont directement impliqués dans le métabolisme monocarboné : l'homocystéine, la cystéine, la glycine et la sarcosine. Leur concentration augmente proportionnellement avec le degré d'agressivité tumorale.

Dans cette étude, les auteurs se sont particulièrement intéressés à la sarcosine en démontrant son accumulation dans les cancers localisés et plus particulièrement dans les tumeurs métastatiques (fig. 16A). Sa forte concentration dans les lignées cellulaires de cancers de la prostate est corrélée avec leur degré d'invasivité (fig. 16B). De façon intéressante, l'apport exogène de sarcosine déclenche l'invasion de cellules initialement non invasives, démontrant son rôle fonctionnel dans la cancérogenèse prostatique. Cette augmentation d'invasivité est également observée par l'apport de glycine (fig. 16C) (Sreekumar *et al.* 2009). Ces résultats démontrent que l'effet de la sarcosine peut être mimé par l'apport de glycine et suggèrent également la relation fonctionnelle entre les différents cycles constituant la voie du métabolisme monocarboné.

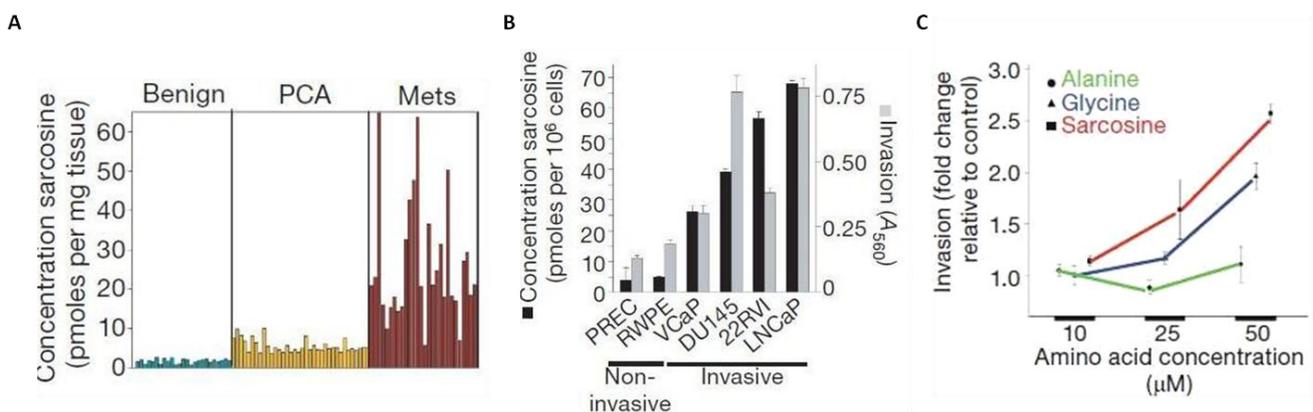


Figure 16 – Lien entre la dérégulation des métabolites dans les cancers de la prostate et le caractère invasif des cellules de cancers de prostate (Sreekumar *et al.* 2009).

A, Concentration de sarcosine dans les tumeurs bénignes (« benign »), les cancers de prostatites localisés (« PCA ») et les tumeurs métastatiques (« Mets »). **B**, Quantification du niveau de la sarcosine et degré d'invasivité dans deux lignées non-invasives et dans quatre lignées invasives. **C**, Augmentation de l'invasivité de lignées, à la base non-invasives, par un apport exogène de glycine et de sarcosine.

Cette étude a conduit à proposer la mesure de la sarcosine sérique comme marqueur de la progression tumorale. Cependant, d'autres études n'ont pas permis de démontrer la capacité de la sarcosine à différencier les grades tumoraux (Jentzmik *et al.* 2010; Struys *et al.*

2010; Jentzmik et al. 2011). Il s'avère également que le niveau d'expression de la GNMT, enzyme responsable de la production de la sarcosine est diminué dans 82 % des échantillons de cancers de la prostate (Wang et al. 2007). Cette observation est contradictoire avec une augmentation attendue de la production de sarcosine.

D'après une analyse plus récente, il apparaît que la concentration de sarcosine n'est effectivement pas corrélée avec le grade de Gleason mais qu'elle est bien augmentée dans les cancers de la prostate comparés aux autres tissus non tumoraux (Wagner *et al.* 2011). Néanmoins, son élévation au niveau tumoral traduit bien une augmentation du métabolisme de la méthionine qui est compensé par la synthèse de sarcosine au détriment de la méthylation de l'ADN (Wagner and Luka 2011). La sarcosine, après diffusion dans la mitochondrie est consommée par la SARcosine DésHydrogénase (SARDH) afin de reformer de la glycine. De plus, il apparaît clairement d'après l'étude publiée par Sreekumar et ses collaborateurs que plusieurs métabolites de la voie du métabolisme monocarboné sont dérégulés dans les cancers de la prostate de haut grade, démontrant son implication dans la cancérogenèse prostatique et l'étude publiée par Penney et ses collaborateurs va également dans ce sens.

En considérant ces données, il est donc possible d'envisager que la dérégulation du pool de glycine-sérine puisse moduler les capacités de méthylation de l'ADN. À partir de là, cette différence de méthylation de l'ADN, représentant une altération majeure de l'épigénétique, est susceptible de moduler l'action de composés ciblant l'ADN, comme les agents alkylants dont font partie les dérivés du platine. Des publications ont en effet montré qu'il était possible de prédire la sensibilité des 60 lignées cancéreuses du panel du NCI à des drogues en évaluant le profil de méthylation de gènes spécifiques. Ainsi, Shen *et al.* ont identifié des marqueurs de méthylation prédictifs de la sensibilité à des drogues utilisées en chimiothérapie, c'est-à-dire des gènes dont le degré de méthylation est associé à une sensibilité à un agent. Parmi ceux-ci, l'hyperméthylation du gène P73 est retrouvée corrélée avec la sensibilité aux agents alkylants et notamment au cisplatine. Les auteurs ont montré que l'inhibition de l'expression de P73 augmentait sensiblement la sensibilité des lignées cellulaires au cisplatine (Shen *et al.* 2007). Des études se sont ensuite succédé, démontrant l'impact de la méthylation globale ou de la méthylation de gènes spécifiques sur la sensibilité aux agents antitumoraux. Par exemple, une étude a démontré qu'une augmentation du taux de méthylation du gène hMLH1 était une cause majeure de résistance aux dérivés du platine

dans les cancers de l'ovaire (Watanabe *et al.* 2007). Les résultats d'une autre étude supposent que l'augmentation de la méthylation du gène BRCA1 est associée à la sensibilité aux platines et représente donc un bon marqueur prédictif de réponse (Chaudhry *et al.* 2009). Dans une autre étude, l'augmentation du taux de méthylation global de l'ADN est montrée corrélée positivement à la sensibilité au cisplatine et au carboplatine, c'est-à-dire conduisant à une augmentation de la résistance à ces agents. Cette résistance semble être reversée par l'action d'agents déméthylants. L'analyse des voies impliquées dans cette résistance indique que les voies de la PI3K/Akt, du TGF β et les voies impliquées dans la progression du cycle cellulaire sont les principales voies impliquées (Li *et al.* 2009). En se basant sur l'évidence que la modulation du niveau de méthylation du génome semblait moduler la réponse à certains agents, une étude clinique a montré pour la première fois que l'utilisation de la 5-azacytidine, un agent déméthylant, pouvait partiellement re-sensibiliser des tumeurs de l'ovaire au carboplatine. En effet, 14 patients sur 29 inclus dans l'étude ont montré des bénéfices cliniques grâce à cette association (Fu *et al.* 2011).

Les évidences sont donc nombreuses laissant suggérer que le degré de méthylation de l'ADN, de façon globale ou sur des gènes spécifiques, peut moduler la sensibilité des agents antitumoraux, et notamment ceux dont le mécanisme d'action implique une interaction avec l'ADN.

IV. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Il a été démontré l'implication du métabolisme monocarboné dans la cancérogenèse. Ce cycle, qui dépend des apports nutritifs en vitamines et en acides aminés, est capital dans la synthèse des bases de l'ADN ainsi que dans la régulation épigénétique du génome par les réactions de méthylation.

Plusieurs métabolites, représentant à la fois des substrats et des produits de cette voie, sont trouvés dérégulés dans les cancers prostatiques. Certains d'entre eux concernent l'activité de SHMT2, une enzyme au centre du mécanisme de régulation du pool de glycine et de sérine. Cette enzyme est retrouvée surexprimée dans les tumeurs prostatiques de haut grade et, d'après nos résultats, son niveau d'expression dans les lignées cellulaires module la sensibilité à l'oxaliplatine, un agent alkylant l'ADN. Cependant, l'activité d'agents alkylants de structure chimique différente ne semble pas être affectée par le niveau d'expression de SHMT2, suggérant un mécanisme spécifique à la famille des DACH platines, dont fait partie l'oxaliplatine.

Récemment, des études ont établi que l'association de platines avec un agent déméthylant l'ADN, comme la 2'-désoxy-5-azacytidine (Plumb et al. 2000) ou la zébularine (Balch et al. 2005), pouvait sensibiliser les cellules *in vitro* ou réverser la résistance au cisplatine (Fu et al. 2011). Pour l'oxaliplatine, très peu d'informations existante, une seule étude ayant montré une légère sensibilisation de cellules de cancer du colon par des inhibiteurs de DNMT comme la décytabine (Flis et al. 2009). Cependant, aucune de ces études n'a décrit les mécanismes impliqués.

Notre objectif principal est donc d'établir le lien mécanistique entre le niveau d'expression de SHMT2 et la modulation de la sensibilité à l'oxaliplatine des cellules cancéreuses prostatiques. Le gène SHMT2 est le seul gène de cette voie métabolique représenté sur la puce Affymetrix, utilisée dans la puce de True et al. Nous avons donc cherché si cette modulation était la conséquence de la seule augmentation du niveau d'expression de SHMT2 ou bien si elle nécessitait la dérégulation du cycle de façon globale. Dans ce dernier cas, cette dérégulation du cycle aboutit-elle à une modification du taux de méthylation globale de l'ADN ?

Dans un second temps, il serait intéressant d'étudier si la modification du taux de méthylation globale de l'ADN, due à une altération du métabolisme monocarboné, peut modifier l'efficacité de platination des agents alkylants et notamment de l'oxaliplatine. Des facteurs comme la vitesse de platination ou la nature des adduits formés pourront être étudiés.

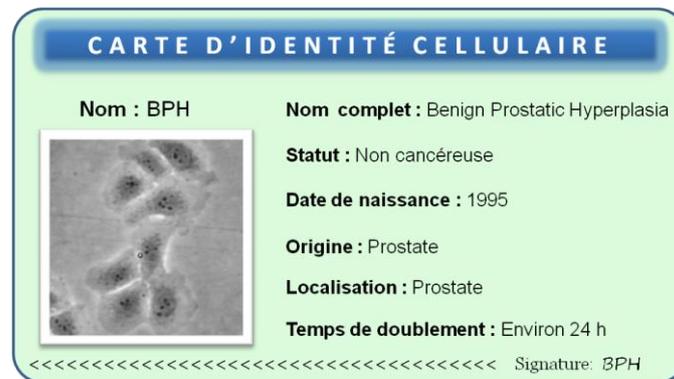
MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sommaire

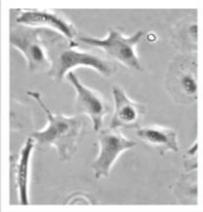
I. CULTURE CELLULAIRE	99
I.1. Lignées cellulaires – cartes d’identités.....	99
I.2. Conditions de culture	101
I.3. Comptage des cellules.....	102
II. APPROCHE IN SILICO	103
II.1. Liste des lignées cellulaires du panel du NCI.....	103
II.2. Liste des gènes de l’étude	104
II.3. Corrélations expression / sensibilité	105
III. PRINCIPE DE LA VALIDATION FONCTIONNELLE IN VITRO	106
IV. TRANSFECTION TRANSITOIRE D’ARN INTERFÉRANT	107
V. TEST DE CYTOTOXICITÉ	109
V.1. Test de clonogénicité	110
V.2. Test au MTT.....	110
V.3. Coloration au cristal violet	111
VI. MESURE DE L’EXPRESSION DES GÈNES	111
VI.1. Mesure de l’expression au niveau protéique.....	111
VI.2. Mesure de l’expression des ARN messagers.....	113
VII. ANALYSE DE LA MÉTHYLATION DE LINE-1	120
VII.1. Extraction d’ADN génomique à partir des lignées	121
VII.2. Conversion au bisulfite de sodium.....	122
VII.3. Amplification de LINE-1 par PCR	123
VII.4. Pyroséquençage	124
VII.5. Analyse des résultats.....	126

I. CULTURE CELLULAIRE

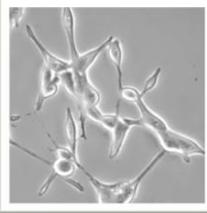
I.1. Lignées cellulaires – cartes d'identités



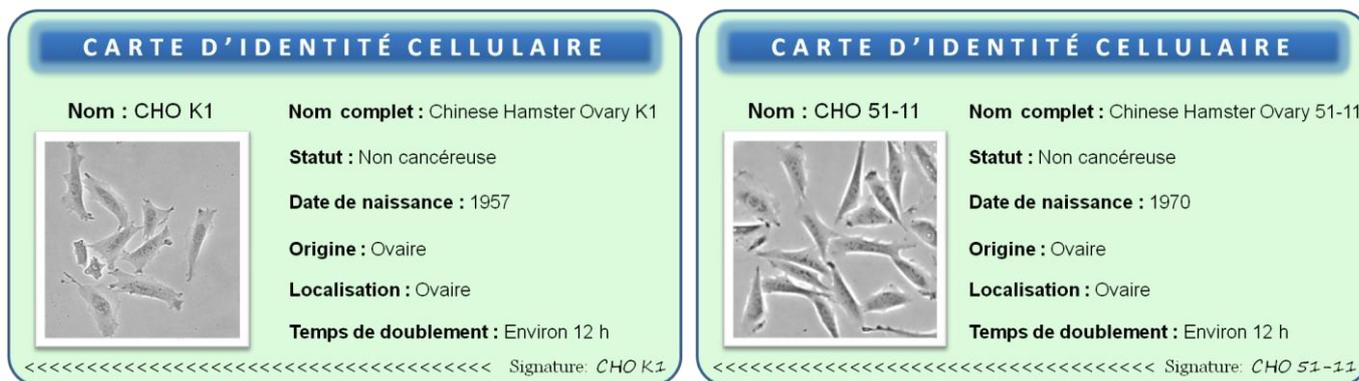
. La BPH, Benign Prostatic Hyperplasia, est une lignée prostatique non cancéreuse liée à une augmentation de taille de la prostate. Elle a été immortalisée (mais non transformée) en 1995 avec l'antigène SV40 large T à partir de cellules épithéliales prostatiques. Le processus originel est une hyperplasie des cellules épithéliales et stromales, plutôt qu'une hypertrophie, résultant en l'apparition de larges nodules en région périphérique. Une maladie des cellules stromales semble à l'origine de l'hyperplasie bénigne (Lawson 1990). Elle implique une dérégulation de facteurs de croissance de la famille de l'EGF, le FGF et le TGF β (DESGRANDCHAMPS F. (1) *et al.* 1992). L'hyperplasie bénigne n'est pas considérée comme une lésion précancéreuse, bien que les taux sériques de PSA puissent être élevés en raison de l'augmentation du volume de l'organe et de l'état inflammatoire local qu'elle provoque. Pour cette raison, nous l'avons utilisée comme un « contrôle » de cellules prostatiques non cancéreuses.

CARTE D'IDENTITÉ CELLULAIRE	
Nom : DU145	Nom complet : -
	Statut : Cancéreuse métastatique
	Date de naissance : 1977
	Origine : Prostate
	Localisation : Cerveau
	Temps de doublement : Environ 24 h
Signature: DU145	

. La lignée DU145 est une lignée d'adénocarcinome de prostate établie en 1977 (Stone et al. 1978) à partir d'une métastase cérébrale chez un patient atteint d'un cancer de la prostate. Cette tumeur n'exprime pas le PSA, ni le récepteur aux androgènes, elle est donc insensible aux stimulations androgéniques (van Bokhoven et al. 2003). Elle possède également une mutation faux-sens du gène p53 (Carroll et al. 1993).

CARTE D'IDENTITÉ CELLULAIRE	
Nom : LNCaP	Nom complet : Lymph Node Cancer Prostate
	Statut : Cancéreuse métastatique
	Date de naissance : 1980
	Origine : Prostate
	Localisation : Ganglions lymphatiques
	Temps de doublement : 48 à 72 h
Signature: LNCaP	

. La lignée LNCaP, *Lymph Node Cancer Prostate*, est de loin la plus étudiée et la plus utilisée des lignées prostatiques. Elle fut établie en 1980 à partir d'un ganglion lymphatique sous-claviculaire. Malgré le fait que cette lignée dérive d'un patient atteint d'un cancer de la prostate hormono-résistant, la LNCaP exprime le PSA et le récepteur aux androgènes et est donc une lignée hormono-sensible (van Bokhoven *et al.* 2003). Le récepteur aux androgènes contient une mutation faux-sens dans son domaine de liaison à son ligand (Veldscholte et al. 1990), entraînant sa perte de spécificité vis-à-vis de son ligand. Ainsi, les cellules sont sensibles non seulement aux androgènes mais aussi aux anti-androgènes, aux estrogènes et à la progestérone. Cette lignée est considérée comme la lignée de cancer de la prostate la plus agressive avec un fort pouvoir métastatique.



. Dans la seconde partie de notre travail, nous nous sommes intéressés au gène SHMT2. Cela nous a conduits à utiliser deux lignées d'ovaire de hamster chinois (CHO). La lignée CHO K1 est un clone dérivé de la lignée parentale CHO. Elle requiert la présence de proline dans le milieu dû à l'absence du gène de synthèse de la proline impliqué dans l'étape de conversion de l'acide glutamique en glutamine-semialdéhyde (Kao *et al.* 1967; Valle *et al.* 1973). La lignée CHO 51-11 est dérivée de la lignée CHO K1 et a été obtenue par mutagenèse à l'éthyl méthane sulfonate. Elle possède une mutation ponctuelle de SHMT2, la privant de son activité catalytique mais pas de son expression (Chasin *et al.* 1974). Cette lignée a été initialement identifiée comme la lignée CHO *glyA*, pour « *glycine auxotrophe* », et sa culture nécessite l'apport de cet acide aminé dans le milieu de culture.

I.2. Conditions de culture

. Les lignées CHO et DU145 sont cultivées en milieu MEM (Invitrogen) contenant du GlutaMAX™ I (L-Alanyl-L-Glutamine) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF).

. Les lignées BPH et LNCaP nécessitent un milieu spécial *Quantum 263* (PAA) prêt à l'emploi, pour cellules cancéreuses difficiles à cultiver ou faiblement adhérentes.

Toutes les lignées sont cultivées en incubateur à 37 °C, sous une atmosphère saturée en humidité (90 %) et contenant 5 % de CO₂. Elles sont maintenues dans des flasques (Dutscher) de 75 cm² et repiquées lorsqu'elles arrivent à sub-confluence, c'est-à-dire deux fois par semaine excepté pour la lignée LNCaP (une fois seulement) qui possède un taux de doublement d'environ 72 h contre 24 h pour les autres lignées.

Le repiquage est réalisé par trypsinisation du tapis cellulaire par de la trypsine-EDTA (Gibco, Invitrogen). La trypsine est neutralisée par dilution avec du milieu de culture complet. Une fraction de suspension cellulaire est ré-ensemencée dans une nouvelle flasque.

1.3. Comptage des cellules

L'ensemencement d'un nombre fixe de cellules a nécessité le comptage des cellules à l'aide d'un compteur Coulter Z2 (Beckman Coulter). Il est effectué sur une dilution au $1/20^{\text{ème}}$ de la suspension cellulaire. À chaque passage d'une cellule à travers l'ouverture de l'électrode du compteur, une dépolarisation est induite et comptabilisée. Le compteur fournit ensuite un graphique représentant le nombre de cellules en fonction de leur diamètre et offre la possibilité d'exclure les débris cellulaires.

II. APPROCHE IN-SILICO

II.1. Liste des lignées cellulaires du panel du NCI

Nos travaux initiaux reposent sur l'exploitation des banques de données du NCI (Korcok 1985; Scherf *et al.* 2000) disponibles publiquement sur le site du DTP à l'adresse <http://dtp.nci.nih.gov>. Ces données concernent une collection de 59 lignées cellulaires tumorales de différentes origines : leucémies, cancer du poumon, côlon, système nerveux central, mélanome, ovaire, rein, prostate et sein. La liste des lignées cellulaires est présentée dans le tableau 7.

Type de tumeur	Nom de la lignée	Type de tumeur	Nom de la lignée
Leucémies	CCRF-CEM	Mélanomes malins	LOX IMVI
	HL-60		MALME-3M
	K-562		M14
	MOLT-4		SK-MEL-2
	RPMI-8826		SK-MEL-28
	SR		SK-MEL-5
cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC)	A549/ATCC	Cancer de l'ovaire	UACC-257
	EKVX		UACC-62
	HOP-62		IGROV1
	HOP-92		OVCAR-3
	NCI-H226	OVCAR-4	
	NCI-H23	OVCAR-5	
	NCI-H322M	OVCAR-8	
	NCI-H460	SK-OV-3	
NCI-H522	Cancer du rein	786-0	
COLO 205		A498	
HCC-2998		ACHN	
HCT-116		CAKI-1	
HCT-15		RXF 393	
HT29		SN12C	
KM12	TK-10		
SW-620	UO-31		
Cancer du système nerveux central	SF-268	Cancer du sein	MCF7
	SF-295		NCI/ADR-RES
	SF-539		MDA-MB-231/ATCC
	SNB-19		HS 578T
	SNB-75		MDA-MB-435
Cancer de la prostate	U251	BT-549	
	PC-3	T-47D	
	DU-145		

Tableau 7 - Liste des 59 lignées du panel du NCI.

Cette collection a été établie au début des années 1990 dans le but de cribler les propriétés antiprolifératives de milliers de composés issus des recherches académiques et industrielles. Le NCI a évalué la cytotoxicité de chaque composé par mesure de l'inhibition de croissance après 48 h, par un test à la sulphorhodamine B qui évalue la croissance cellulaire par la

mesure du contenu protéique total (Scherf *et al.* 2000). Cette inhibition de croissance est exprimée sous la forme d'IC₅₀ qui correspond à la concentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire. Cette base de données contient également, pour chaque lignée, les niveaux d'expression de milliers de gènes, obtenus sur plusieurs séries de *microarray* Affymetrix, puces à ADN codifiées sous les noms U95 (A à E) et U133 (A et B).

II.2. Liste des gènes de l'étude

La liste des gènes, dont le niveau d'expression permet de discriminer grades de Gleason, identifiés par l'étude de True (True *et al.* 2006), est présentée dans le tableau 8.

Voie cellulaire	Nom du gène	gene id	Voie cellulaire	Nom du gène	gene id
Métabo - sucre	GLO1	2739	Transduction du signal	CDK2AP1	8099
	HIG1	25 994		RAB6A	5 870
	PGK1	5230		MME	4311
	PRPS1	5 631		SNX3	8 724
	DPM1	8813		RAB18	22931
	PPP1CA	5 499		RHOT2	89 941
Métabo - énergie	COX7A2L	9167		RHOA	387
	ATP5B	506		RAB2	5 862
	ATP5G3	518		PRKAR1A	5573
	NDUFB3	4 709		JUN	3 725
	COX6C	1345		CD59	966
	ATP6V1F	9 296	TMSL3	7 117	
	PRDX5	25824	ARPC2	10109	
TXNDC	81 542	CAPZA2	830		
LOC152485	152485	DNCL1	8655		
Métabo - lipides	HSD17B3	3 293	MYBPC1	4 604	
	HSD17B4	3295	KRT15	3866	
	ACOX2	8 309	HIRIP3	8 479	
	DHRS9	10170	PC4	10923	
	YWHAZ	7 534	HMGB1	3 146	
	NPC2	10577	NSEP1	4 904	
PSAP	5 660	TCEA1	6 917		
Métabo - protéines	MAOA	4128	JUNB	3726	
	SHMT2	6 472	ID3	3 399	
	TMPRSS2	7113	LOC388817	388817	
	SPC12	28 972	SERP1	27 230	
	PSMB1	5689	EIF4A1	1973	
	PCCB	5 096	CD63	967	
	TCEB1	6921	VBP1	7411	
	SEPHS2	22 928	RPL13	6 137	
	HACE1	57531	KCTD12	115207	
	CPE	1 363	AP3S1	1 176	
Métabo - autre	HGD	3081	SEC14L1	6397	
	GSTM1	2 944	ENSA	2 029	
	DPP4	1803	ARF3	377	
	OAZ2	4 947	SLC22A3	6 581	
	CDKN2C	1031	FLJ12806	64853	
	FTH1	2 495	FCRG3B	2 215	
Prolif - Diff - Apoptose	DAD1	1603	FLJ35093	374986	
	NEDD5	4 735	KIAA0103	9 694	
	NME1	4830	HSPC152	51504	
	LTBR	4 055	C20orf45	51 012	
	AZGP1	563	C14orf87	51218	

Tableau 8 - Liste des 86 gènes de l'étude de True dont le niveau d'expression permet de prédire le grade d'une tumeur de prostate avec une fiabilité de 76 % (True *et al.* 2006).

II.3. Corrélations expression / sensibilité

Les étapes de l'approche in silico sont représentées sur la figure 17.

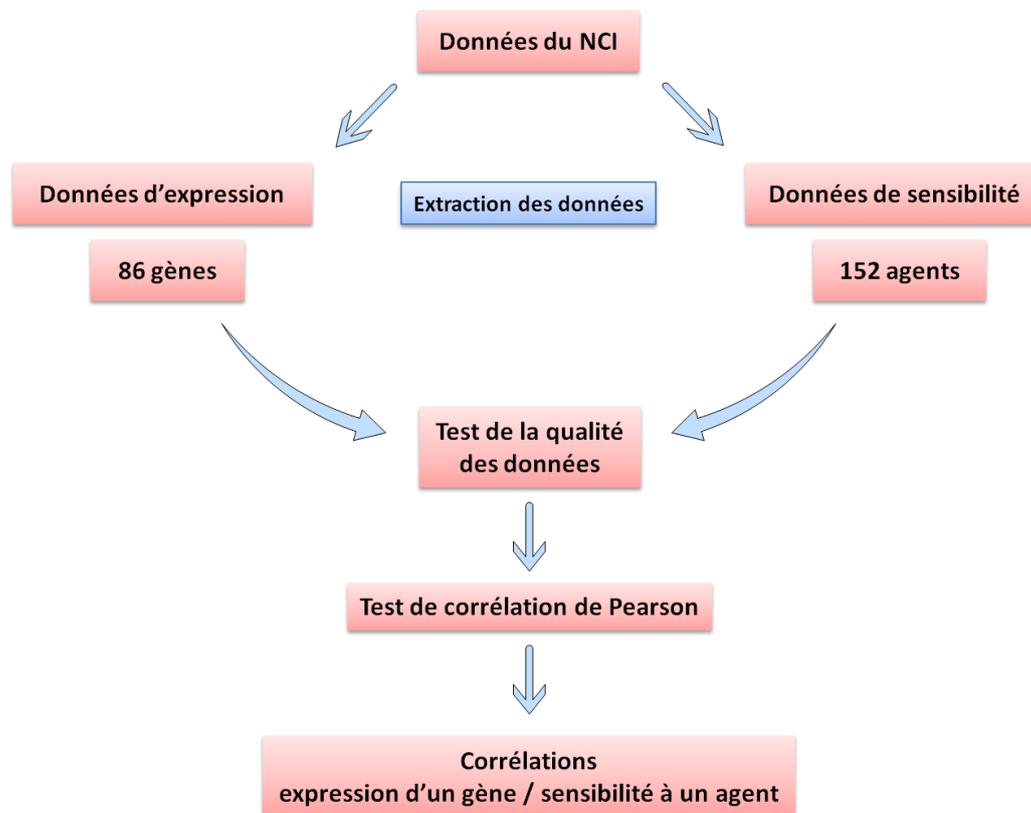


Figure 17 - Schéma de l'approche *in silico*.

Un test de corrélation de Pearson a été utilisé pour rechercher des corrélations entre le niveau d'expression de chacun des 86 gènes de cette signature et la sensibilité à un agent antiprolifératif.

Ce test permet de calculer des coefficients de corrélation compris entre -1 et +1. Un résultat proche de zéro souligne une absence de corrélation. *A contrario*, un test s'écartant de zéro suggère que le niveau d'expression du gène d'intérêt est corrélé à la sensibilité des lignées cellulaires à l'agent testé. Plus la valeur se rapproche de -1 ou de +1 et plus la corrélation sera forte et significative. Une corrélation négative indique que la surexpression d'un gène est corrélée à une plus forte résistance à l'agent testé. Une corrélation positive indique, au contraire, qu'une surexpression du gène est corrélée à une plus forte sensibilité à cet agent.

III. PRINCIPE DE LA VALIDATION FONCTIONNELLE *IN VITRO*

Le but de cette validation est de démontrer expérimentalement que la modulation du niveau d'expression des gènes candidats dans des lignées de cancer de la prostate, induit bien une modification de la sensibilité à la drogue pour laquelle une corrélation a été trouvée. Nous avons choisi d'utiliser une approche d'interférence à l'ARN pour moduler le niveau d'expression des gènes, en espérant que leur niveau d'expression basal soit suffisamment élevé pour pouvoir mettre en évidence une diminution d'expression. Pour chaque gène, une séquence de siRNA spécifique sera comparé avec un siRNA contrôle ne ciblant aucun gène en particulier. Les cellules ont été transfectées transitoirement avec les siRNA grâce à un vecteur lipidique (oligofectamine). La modulation de sensibilité à l'agent a été mesurée par des tests de mesure de la survie. Les IC_{50} ont été mesurées et comparées entre les différentes conditions.

Le principe de la validation fonctionnelle *in vitro* est présenté dans la figure 18.

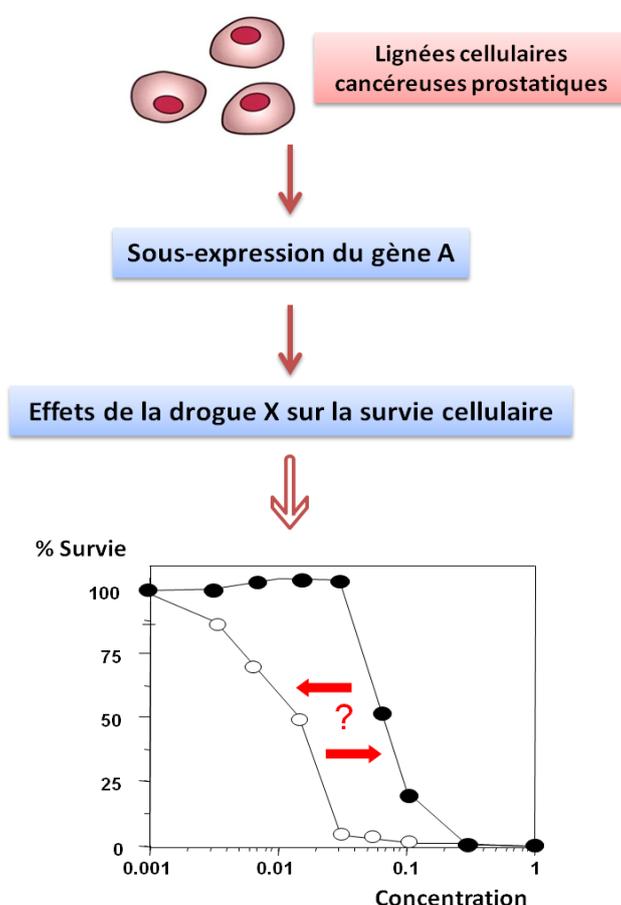


Figure 18 - Principe général de la validation fonctionnelle *in vitro*.

IV. TRANSFECTION TRANSITOIRE D'ARN INTERFÉRANT

La technique d'interférence à l'ARN (siRNA pour « *small interfering* » RNA) permet d'éteindre spécifiquement l'expression d'un gène d'intérêt. Pour la grande majorité des siRNA, les conditions optimales d'extinction sont obtenues en transfectant 100 nM de siRNA avec de l'Oligofectamine (Invitrogen) pendant 48 h. L'oligofectamine est un vecteur lipidique qui, par fusion avec la membrane plasmique d'une cellule cible, va libérer son contenu dans le compartiment cytoplasmique. Les siRNA, de type « *ON-TARGET* », ont été synthétisés par la société Dharmacon sous forme d'un pool de 4 séquences ciblant différents locus de l'ARNm cible, afin d'en optimiser sa dégradation.

Chaque transfection ciblée est accompagnée d'une transfection contrôle utilisant un siRNA « *non-targeting* », dont la séquence ne cible aucun ARNm.

Les séquences des siRNA utilisés sont présentées dans le tableau 9.

		Séquence du siRNA 5'-3'			
Gène	Orientation	siRNA N° 1	siRNA N° 2	siRNA N° 3	siRNA N° 4
RPL13	sens	UGGCAUGGUCUUGAAGCCUU	GCCCCACUUCCACAAGGACUU	GGACUGGCAGCGGCGUGUU	CCAGCCGGCCGUAAGAUCUU
	antisens	GGGCUUCAAGACCAUGCCAUU	GUCCUUGUGGAAGUGGGCUU	CACGCGCCGUCGCCAGUCCUU	GAUCUUACGGGCCGGCUGGUU
PRDX5	sens	GUGGCCGUGGGGCGGUUUUU	GACGGUGCAGUGAAGGAGAUU	GGAGAGUGGGGUCUGGCGUU	UCAAGGUGGGAGAUGCCAUUU
	antisens	AUACCCGCCCCACGGCCACUU	UCUCCUUCACUGCACCGUCUU	CGCCAGACGCCACUCUCCUU	AUGGCAUCUCCACCUUGAUU
CD59	sens	AGAAUGCGGGGCGAGCGUU	UGC GG GCGAGCGCAGAUU	GCGGCUCGAGGCUGGAAGAUU	GAGGAUCUUGGGCGCCGCUU
	antisens	CGCUCAGCCCCGCAUUCUUU	UCUGCGCUCAGCCCCGCAUU	UCUUCAGCCUCGAGCCGCUU	GGCGGCGCCCAAGAUCUCUU
RAB6A	sens	GUGGAUUGAUGAUGCAGAUU	CCAAAGAGCUGAAUGUUUUU	GAGCAAAGCGUUGGAAAGAUU	GAAAGAGGAAGUGAUGUUUUU
	antisens	UCUGACAUCAUCAUCCACUU	AUAACAUCAGCUCUUUGGUU	UCUUUCCAACGCUUUGCUCUU	UAACAUCACUUCUCUUUCUU
EIF4A1	sens	GAACGAGACGUGAUUAUGAUU	GCUCGAGAUUUCACUGAUUUU	GAAGCUGGACACACUAUGUUU	AUUGAGACCUUCUACAACAUU
	antisens	UCAUAAUCACGUCUCGUUCUU	AUACAGUGAAAUCGAGCUU	ACAUAGUGUGUCCAGCUUCUU	UGUUGUAGAAGGUCUCAUUU
RHOT2	sens	GACGUUGCCUGCUUGAUGUUU	ACGAAGAGCUCACGCUUUUU	GGACGUGCGCAUCCUGUUUU	GAGAAGAUUCGAACUAAGUUU
	antisens	ACAUCAAGCAGGCAACGUCUU	AAAGCGUUGAGCUCUUCGUUU	UACAGGAUGCGCACGUCCUU	ACUUGAUUCGAAUCUUCUCUU
SHMT2	sens	ACAAGUACUCGGAGGGUUUU	GGAGAUCCUACACAUUUUU	UCGAGUCUAUGCCCUAUAUUU	UCACUGGUUACAGGUGGUUU
	antisens	UAACCCUCCGAGUACUUGUUU	AAAUGUGUAAGGGAUUCUUU	UUUAUGGGCAUAGACUCGAUU	UACCACUGAUACCAGUGAUU
CDKN2C	sens	GAACUGGUUUCGUCUGAUUUU	GAAUGAGGUUGUUAGCCUGUU	CCACAAUUCUCAAUAACUU	GGACACCGCCUGUGAUUUGUU
	antisens	AUGACAGCGAAACCAGUUCUU	CAGGCUAACAACCUAUUCUU	GUUAUUGAAGAUUUGUGGUU	CAAUCACAGGCGGUGUCCUU
DPM1	sens	AACAGGAAGUUUCAGAUUUUU	CUUCUAAGACCACGAGAGAUU	GGGACUAGGAACUGCAUUUU	GGAGAUAGAUUGUUCGGGCAUU
	antisens	UAAUCUGAAACUUCUGUUUU	UCUCUCGUGGUCUUAGAAGUU	AUAUGCAGUUCUAGUCCUUU	UGCCCGAACAUCUUCUCCUU
JUN	sens	UGAAAGCUCAGAACUCGGAUU	GAAACGACCUUCUAGACGUU	GAACAGGUGGCACAGCUUUU	GAGCGGACCUUUAUGGCUACUU
	antisens	UCCGAGUUCUGAGCUUUCUU	CGUCAUAGAAGGUCGUUUUU	UAAGCUGUGCCACCUUGUUCUU	GUAGCCAUUAGGUCCGUCUU
PCCB	sens	GGACGAGGCCGAAUCAUGUU	CCAAGCUUCUCUACGCAUUUU	GGCCACCUUGUUAACGAAUU	GCACAAGCGAGGAAAGCUUUU
	antisens	CAUUGAUUCGGCCUCGUCCUU	AAUGCGUAGAGAAGCUUGGUU	UUCGUUAACAGAGGUGGCCUU	UAGCUUUCUCGCUUGUGCUU
TMPRSS2	sens	GAACACAAGUGCCGGCAAUUU	AAAGUGAUUUCUCAUCCAUU	GCUAUUGGACCUUACUUGUU	AACAUAUCUGGUGGCUGAUU
	antisens	AUUGCCGGCACUUGUUCUUU	UUGGAUGAGAAAUCACUUUUU	CAUAGUAAGGUCCAUAUGCUU	UCAGCCACCAGAUUUGUUUU
SHMT1	sens	GAGCUGGCAUGAUCUUCUAUU	CCUAGGCUCUUGCUUAAUUUU	CCUAUAAGCUGGACCCACAUU	GGGCGUAUCUUAUGGCGGAUU
	antisens	UAGAAGAUCAUGCCAGCUCUU	AUUUAAGCAAGAGCCUAGGUU	UGUGGGUCCAGCUUAUAGGUU	UCCGCCAUGAGAUACGCCUUU

Tableau 9 - Liste des siRNA utilisés.

Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à raison de 150 000 par puits pour les lignées BPH et DU145 et 300 000 par puits pour la lignée LNCaP. Cette quantité de cellules assure que les puits contrôles non traités n'atteignent pas la confluence en fin d'expérience.

La transfection se réalise ensuite en diluant séparément le siRNA et l'Oligofectamine dans du milieu Optimem (Invitrogen) sans sérum selon le protocole schématisé dans la figure 19.

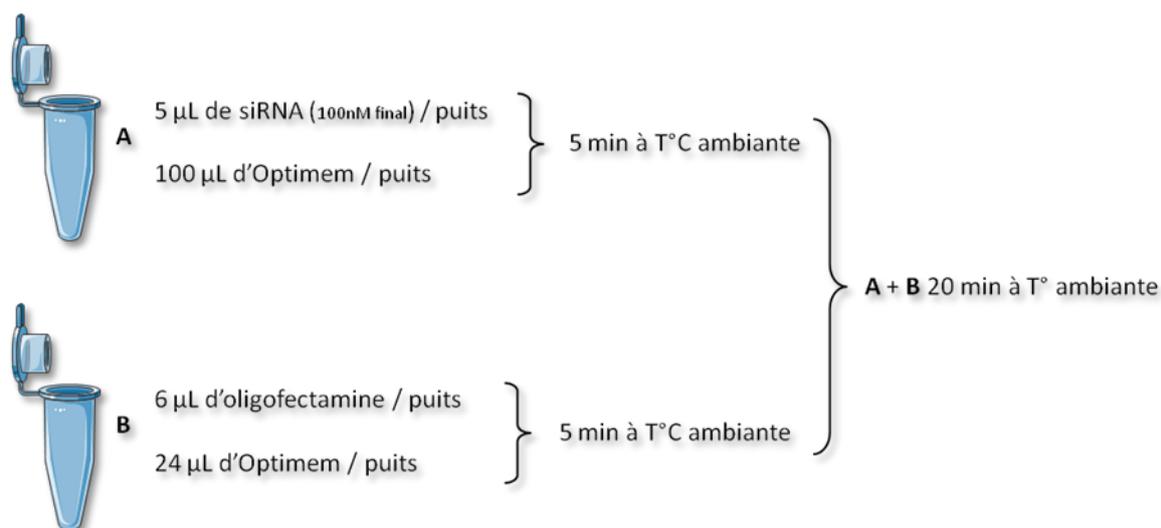


Figure 19 - Protocole de transfection des siRNA.

Les solutions A et B sont incubées séparément 5 min à température ambiante avant d'être mélangées et incubées 20 min à température ambiante. Cette étape permet aux capsules lipidiques d'intégrer les séquences de siRNA. Le mélange est ensuite dilué dans du milieu complet avant d'être ajouté goutte à goutte sur les cellules. La transfection est stoppée 48 h après incubation à l'étuve.

V. TEST DE CYTOTOXICITÉ

Le traitement des cellules par l'agent cytotoxique a été réalisé après 48 h de transfection. Les cellules sont incubées avec différentes concentrations de la drogue testée pendant un temps minimal de 2,5 cycles de division. La cytotoxicité a été évaluée par un test de clonogénicité, un test au MTT ou par coloration au cristal violet.

V.1. Test de clonogénicité

Le test de clonogénicité mesure la capacité des cellules à proliférer et à former des clones, après un traitement cytotoxique. Seules les cellules ayant survécu au traitement gardent la capacité à former des clones en culture.

Après un traitement de 24 h, les cellules sont comptées et ré-ensemencées dans des puits de plaque 6 puits. La quantité de cellules à ensemercer est primordiale afin de s'assurer de la pousse de clones. En effet, plus la concentration en drogue augmente et moins le taux de cellules ayant survécu est important. Il faut donc ensemercer plus de cellules pour garantir un nombre de clone suffisant à compter. Ainsi, 200 cellules sont ensemençées dans un puits de plaque 6 puits pour les cellules transfectées mais non traitées à la drogue. Pour les cellules traitées, les quantités à ensemercer peuvent aller jusqu'à 20000 cellules par puits. Du milieu complet est ajouté puis les cellules sont laissées à l'incubateur au moins 7 jours pour les lignées DU145 et BPH ou 14 jours pour la lignée LNCaP afin de permettre le développement des clones. Les clones sont colorés au cristal violet et comptés.

V.2. Test au MTT

Afin de cribler plus rapidement plusieurs gènes et plusieurs drogues simultanément, nous avons eu recours au test MTT qui est plus rapide que le test de clonogénicité. Cela nous permet, en utilisant une seule plaque 96 puits, d'étudier une échelle plus vaste de concentration en drogue et cela avec plusieurs drogues et en quadruplicat.

Le test utilise le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényl tétrazolium). Il repose sur la capacité des mitochondries fonctionnelles des cellules vivantes à réduire le MTT en cristaux de formazan, solubles dans le DMSO et quantifiable par mesure colorimétrique. Il permet donc d'évaluer les effets des traitements étudiés sur la prolifération globale, en déterminant la concentration en drogue qui inhibe 50 % de la croissance cellulaire (IC_{50}), en la comparant à la condition contrôle pour laquelle l'expression du gène n'a pas été inhibée.

Après 24 h de transfection avec le siRNA ciblant un gène ou avec le siRNA contrôle, 1000 cellules pour BPH, 1500 pour DU145, 5000 pour LNCaP et 2000 pour les lignées CHO, sont ensemençées par puits dans une plaque de 96 puits (dans 100 μ L de volume final).

Après un traitement de 72 h avec la drogue, les cellules sont lavées et mises au contact d'une solution de MTT à 0,5 mg/mL, fraîchement préparée, pendant 4 h à 37 °C. Ensuite, le milieu contenant le MTT est éliminé et remplacé par 200 µL de DMSO. L'absorbance spécifique est lue au spectrophotomètre à 570 nm à laquelle est retranchée l'absorbance non spécifique à 630 nm. L'IC₅₀ est déterminée grâce au logiciel *GraphPad Prism 4 Software*.

V.3. Coloration au cristal violet

La lignée LNCaP, de par son faible potentiel d'adhérence, a nécessité la mise au point de la mesure de la prolifération par une autre technique que le MTT, le décollement des cellules au cours des différentes étapes du test ne permettant pas d'obtenir des résultats reproductibles. La cytotoxicité a donc été évaluée après fixation des cellules à l'éthanol 70 % (empêchant leur décollement) puis coloration avec une solution de cristal violet pendant 10 minutes. Les cellules lavées sont lysées par une solution de SDS à 1 % afin de solubiliser le cristal violet et l'absorbance à 600 nm est mesurée au spectrophotomètre *PowerWaveX* (Bio-Tek).

VI. MESURE DE L'EXPRESSION DES GÈNES

VI.1. Mesure de l'expression au niveau protéique

Le niveau d'expression des protéines est mesuré dans des lysats cellulaires totaux par la technique de *Western-blotting*.

VI.1.1. Préparation des lysats totaux

La lyse des cellules a été effectuée par le protocole appelé « *Ultimate freeze-thaw lysis for mammalian cells* » dont le principe repose sur l'éclatement des cellules par des cycles de congélations-décongélations successifs dans de l'azote liquide à -196 °C.

Les cellules d'un puits d'une plaque 6 puits sont rincées au PBS 1X froid, et sont décollées par grattage dans 500 µL de PBS, puis centrifugées à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 50 µL d'un tampon de lyse (600 mM de KCl, 20 mM de tris HCl pH 7.8, 20 % de glycérol) auquel on ajoute un cocktail d'inhibiteurs de protéase (tablette « *complete mini EDTA-free* », Roche). Les cellules sont alors plongées dans un bain d'azote liquide quelques secondes puis laissées à température ambiante jusqu'à décongélation

totale. Ce cycle congélation-décongélation est répété 2 fois. Les lysats cellulaires sont de nouveau centrifugés. Le surnageant, contenant les protéines totales, est transféré dans un tube neuf, puis 1 μL de Benzonase (Novagen, 250 U/ μL) est ajouté au mélange pour digérer l'ADN résiduel. Cette digestion s'effectue à température ambiante pendant 10 min. Les protéines sont ensuite dosées grâce au kit colorimétrique BioRad utilisant la méthode de Lowry. Les échantillons à doser sont comparés à une gamme de BSA (comprenant les concentrations 0.5 ; 1 ; 2 ; 3 et 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). La densité optique du produit de la réaction colorimétrique est mesurée au bout de 15 min à 750 nm avec un spectrophotomètre *PowerWaveX* (Bio-Tek) en plaque 96 puits. Les échantillons sont utilisés immédiatement ou conservés à $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

VI.1.2. Western-blot

Les protéines sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant, dont la composition est présentée dans le tableau 10.

Composants	Gel de concentration	Gel de séparation
Eau MilliQ	2,85 mL	4,1 mL
Acrylamide/Bis 30%	850 μL	3,3 mL
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	-	2,5 mL
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 mL	-
SDS 20 %	25 μL	50 μL
APS 10 %	25 μL	50 μL
Temed	10 μL	10 μL

Tableau 10 - Composition des gels de Western-Blot.

50 μg de protéines sont préalablement diluées dans un tampon de charge 4X (Tris HCl 83 mM ; Glycérol 35 % ; SDS 2,7 % ; Bleu de Bromophémol 0,013 % et H_2O qsp 9,5 mL) avant d'être déposées sur le gel. L'électrophorèse est réalisée à 80 V pendant 120 min. La migration s'effectue dans du tampon Laemmli contenant du Tris pH 8.3 25 mM, de la Glycine à 250 mM et 0.1 % de SDS.

Un marqueur de taille « *Precision Plus Protein* » (Biorad) a également été déposé sur gel, permettant de déduire la taille des protéines par comparaison. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (0.22 μ) avec l'appareil « *iBlot system* » (Invitrogen). Le transfert est réalisé en 7 min à 20 V.

Les sites de liaisons aspécifiques de la membrane contenant les protéines transférées sont saturés pendant 2 h sous agitation dans du PBST (PBS 1X + 0,1 % de Tween 20) contenant 5 % de lait. Ceci permet de prévenir toute fixation aspécifique de l'anticorps primaire.

La membrane est ensuite hybridée avec l'anticorps primaire dans une solution de PBST pendant une nuit à 4 °C sous agitation. Les anticorps utilisés dans cette étude sont listés dans le tableau 11.

Anticorps	Masse moléculaire (kiloDalton)	Espèce	Dilution Ac primaire	Dilution Ac secondaire	Fournisseur	Référence
EIF4A1	46,1	Chèvre	1/500	1/15 000	Santa-Cruz	sc-14211
SHMT1	53	Souris	1/500	1/20 000	Abnova	H00006470-A01
SHMT2	56	Lapin	1/500	1/10 000	Abcam	ab64417
Actine	42	Lapin	1/5 000	1/20 000	Sigma-Aldrich	A2066
GAPDH	37	Souris	1/1 000	1/20 000	Santa-Cruz	sc-59541

Tableau 11 - Liste des anticorps utilisés pour les Western-Blot.

La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 min au PBST pour éliminer l'excès d'anticorps, puis hybridée 1 h avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase à température ambiante sous agitation. L'excès d'anticorps est une nouvelle fois éliminé par 3 lavages au PBS-Tween à 0,1 % suivi d'un lavage final au PBS 1X. La membrane est révélée par une incubation de 5 min avec un substrat de la peroxydase (kit ECL Millipore) et la révélation est réalisée grâce à l'appareil Fusion FX7 (Fisher) qui détecte, par une caméra CCD haute résolution, la lumière émise par chimioluminescence.

VI.2. Mesure de l'expression des ARN messagers

La quantification de l'expression des ARNm est réalisée par qRT-PCR. Cette technique permet de mesurer l'amplification en temps réel d'un ADNc d'intérêt, issu de la rétro-transcription d'un extrait d'ARN totaux.

VI.2.1. Extraction ARN

L'extraction des ARN totaux est effectuée à l'aide du kit « *RNeasy minikit* » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Cette extraction nécessite un nombre de cellules correspondant à 3 puits d'une plaque 6 puits pour la lignée BPH, 2 puits pour DU145 et un

puits pour la lignée LNCaP, de façon à ce que la quantité d'ARN extraits soit suffisante, mais reste inférieure à un million de cellules. Elles sont lysées et homogénéisées au vortex dans du tampon hautement dénaturant contenant de la guanidine-thiocyanate permettant l'inactivation des RNases. De l'éthanol est additionné afin de créer un environnement optimal pour la liaison des ARNs sur la couche de silice après transfert sur la colonne d'extraction. Les ARNs sont lavés et purifiés par plusieurs centrifugations successives puis élués dans 30 μL d'eau ultra pure RNase-Free (Invitrogen). Les ARN extraits sont conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Une lecture de l'absorbance à 260 nm au *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific) permet de déterminer la quantité des ARN ; 1 DO à 260 nm = 44 ng/ μL d'ARN. Le rapport d'absorbance 260/280 nm permet de connaître la pureté des ARN, qui doit être compris entre 1,9 et 2,1, garantissant une absence de contamination par les protéines.

VI.2.2. Transcription inverse

La rétro-transcription des ARN totaux permet de synthétiser les ADNc correspondants. Elle est réalisée à l'aide du kit « *SuperScript VILO cDNA synthesis kit* » (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Cette synthèse d'ADNc se fait à l'aide d'amorces hexanucléotidiques aléatoires et d'une enzyme à activité ADN polymérase ARN dépendante : la SuperScript reverse transcriptase III qui dérive de la M-MLV-RT (*Moloney-Murine Leukemia Virus-Reverse transcriptase*). Ce kit contient en plus un cocktail de protéines inhibitrices de ribonucléases. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicat (nommés RT+) et un tube supplémentaire ne contenant pas d'enzyme nous a permis de détecter d'éventuelles contaminations par l'ADN génomique (nommé RT-).

La réaction se décompose en 3 étapes : le mélange réactionnel est pré-incubé 10 min à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ afin de permettre l'hybridation des amorces puis la transcription inverse est réalisée par incubation du mélange à $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant une heure. La réaction est stoppée par un chauffage de 5 min à $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ afin d'inactiver l'enzyme. Ces trois étapes ont été réalisées avec un thermocycleur *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystem). Les ADNc sont utilisés immédiatement ou conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

VI.2.3. PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR) en temps réel permet le suivi de l'amplification spécifique de la matrice d'intérêt. Elle contraste avec la PCR conventionnelle où les amplicons ne sont détectés que dans la phase finale du processus d'amplification. Ces qPCR utilisent du SYBR green, un agent qui devient fluorescent en s'intercalant dans le petit sillon de l'ADN néo-formé. La quantité de fluorescence émise est donc proportionnelle à la quantité d'amplicons formés.

Les couples d'amorces spécifiques ont été définies à l'aide du logiciel Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Le logiciel a été paramétré de manière à produire des amorces possédant une taille de 20 pb, une température d'hybridation de 60 °C, un pourcentage de GC de 50 % et permettant l'amplification d'un produit de PCR d'environ 200 pb. Les oligonucléotides ont été synthétisés par la société Eurogentec. Ils sont reçus lyophilisés et sont re-suspendus à une concentration stock de 100 µM et conservés à -20 °C. Ils sont ensuite aliquotés et utilisés à une concentration finale de 10 µM. Les amorces permettant l'amplification du contrôle ARN18S ont été synthétisées chez Ambion (référence AM 1718).

La séquence des amorces utilisées est indiquée dans le tableau 12.

Nom de l'amorce	Orientation	Séquence 5'-3'	Taille (en bases)	% en GC	T°C d'hybridation théorique
CD59	sens	CGTGTCTCATTACCAAAGCTGGGTT	25	48,00	57,50
	antisens	CCCTCAAGCGGTTGTGACGT	21	61,90	59,30
CDKN2C	sens	ATCGTCAGGACCCTAAAGAATGGCC	25	52,00	58,30
	antisens	TCCAAGTTTCATAACCTGCAGCGCA	25	48,00	59,40
DPM1	sens	GGATGCTGATCTCTCACACCATCCA	25	52,00	58,10
	antisens	AAAATTGGCCCCACGGCTGA	20	55,00	57,00
EIF4A1	sens	TACCACTGACCTGTGGCCAGAG	23	60,90	59,90
	antisens	CAAACCGTCCACCTCGACCGA	21	61,90	58,80
JUN	sens	CGTGGGGCTGCTCAAGCTGG	21	70,00	60,30
	antisens	GGGCAGCGTGTCTCGGCTGT	20	65,00	59,90
PCCB	sens	AGGAGGAGCTCGGTGGTGCC	20	70,00	60,20
	antisens	ACGGTCACTGGGATCGTGCC	20	65,00	58,80
RHOT2	sens	GGCGCTTCGGTACAGCGAT	20	65,00	59,90
	antisens	TCGCGGTCCTGGTCTGTGCTT	20	65,00	60,80
RPL13	sens	GAGGAGCTCAGGGTGCCCGG	20	75,00	60,90
	antisens	CTCCTCAGCCGCTGCACGT	20	65,00	59,70
SHMT1	sens	AGTGTGGATCCCAAGACTGGCAA	23	52,00	57,90
	antisens	GTGCCACAGCAACCCAGCAAT	22	59,00	60,40
SHMT2	sens	CCAGCGCCTATGCTCGCCTC	20	70,00	59,80
	antisens	CCCTGACCTGGCCCTCGAA	20	70,00	59,90
GAPDH	sens	GTGAGGGTCTCTCTTCTTCT	20	55,00	62,00
	antisens	CCTGGTATGACAACGAATTT	20	40,00	56,00

Tableau 12 - Liste des amorces utilisées pour la qRT-PCR.

Le mélange réactionnel pour chaque tube de qPCR est détaillé dans le tableau 13.

Réactif	Concentration finale	Volume
Tampon PCR 10X	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 mM	1,25 µL
Mix des 4 dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,5 µL
Amorce sens (10 µM)	0,2 µM	0,5 µL
Amorce anti-sens (10 µM)	0,2 µM	0,5 µL
SYBR green 1/1000	1/50000	1 µL
Taq polymerase	1 unité	0,2 µL
Eau ultra pure	qsp 25 µL	16,55 µL

Tableau 13 - Composition du milieu réactionnel pour la qPCR.

La qPCR est réalisée à l'aide du *Rotorgene 3000* (Qiagen) selon le protocole indiqué dans le tableau 14.

Etape	Temps	Température	
Activation de l'enzyme	15 min	95 °C	} 40 cycles
Dénaturation des brins d'ADN	15 sec	94 °C	
Hybridation des amorces	30 sec	60 °C	
Elongation	30 sec	70 °C	
Elongation finale	1 min	70 °C	
Courbe de fusion	5 sec pour 1 °C	55 à 99 °C	

Tableau 14 – Les différentes étapes de la réaction de qPCR.

Pour chaque couple d'amorces utilisé, une PCR classique de mise au point des conditions optimales d'amplification est réalisée (gamme de température d'hybridation et gamme de concentration en MgCl₂). Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 2 % en présence d'un marqueur de taille « *Smart DNA Ladder* » (Invitrogen).

Pour les expériences de qRT-PCR, deux gènes de ménage (dont l'expression est en théorie constante quelque soit la lignée ou le traitement effectué) ont été choisis : la GAPDH (*Glyceraldehyde 3 phosphate DeHydrogenase*) et l'ARN 18S (*ARN ribosomal 18S*) ; la réaction de qPCR a été réalisée sur 10 ng d'ADNc.

VI.2.4. Traitement des résultats de qPCR

Un profil type d'amplification par qPCR est présenté figure 20. Il se décompose en 3 parties :

- Une première partie dans laquelle le nombre d'amplicons formés ne permet pas d'obtenir une fluorescence détectable par l'appareil (nombre de cycle < 20 et < 29 pour les échantillons A et B, respectivement)
- Une deuxième partie où la fluorescence augmente de manière exponentielle (entre les cycles 21 - 31 et 25 - 35 pour les échantillons A et B, respectivement)
- Une troisième partie de plateau correspondant à une saturation de la réaction d'amplification (nombre de cycles > 25 ou > 35 pour les échantillons A et B, respectivement).

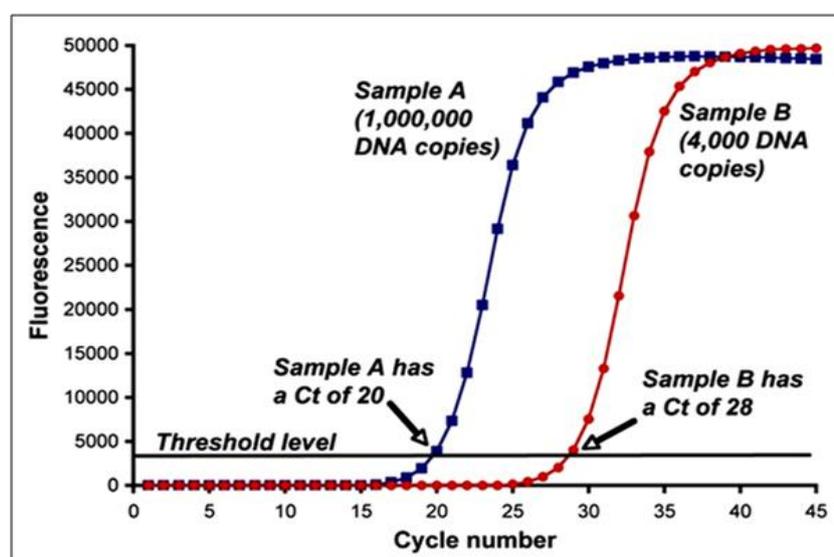


Figure 20 – exemples de profils de qRT-PCR pour la détermination du *Cycle threshold* (Ct).

Ces courbes permettent de calculer le cycle, à partir duquel, la fluorescence devient détectable (au dessus du *Threshold level*). Cette valeur seuil est appelée Ct (pour « *Cycle Threshold* »). Il est directement proportionnel à la quantité de matrice initiale. Plus il y a de matrice et plus la fluorescence sera détectable précocement. A chaque cycle de phase exponentielle la quantité de produits PCR formés est donc en théorie doublée. Un calcul en 3 étapes permet la quantification relative du niveau d'expression du gène d'intérêt par rapport à celle du gène de ménage.

Etape 1 : Normalisation par rapport au gène de ménage pour chaque échantillon :

$$\text{Ct gène d'intérêt} - \text{Ct gène de ménage} = \Delta\text{Ct}$$

Etape 2 : Variance entre 2 échantillons :

$$\Delta\text{Ct échantillon 1} - \Delta\text{Ct échantillon 2} = \Delta\Delta\text{Ct}$$

Etape 3 : Détermination de la variation du nombre de copie du gène d'intérêt entre les échantillons comparés = $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$

Ce calcul permet de connaître la variation du nombre de copie de l'ARNm d'intérêt entre les conditions comparées. Ainsi, le retard d'un seul cycle de Ct, donnant une différence de $2^1 = 2$, pour la condition siRNA ciblant l'ARNm d'intérêt démontre qu'il y avait deux fois moins d'ARNm codant la protéine d'intérêt dans l'échantillon.

Un tube supplémentaire provenant d'une réaction de transcription inverse sans enzyme permet d'évaluer le niveau de la contamination génomique. Son utilité est de contrôler que l'amplicon amplifié dans le triplicat provient bien de l'amplification d'un ARNm et non de la présence d'ADN génomique résiduel. Lors de l'étude du niveau basal de l'expression de certains gènes dans notre étape de validation in vitro (voir ci-après), nous avons considéré que le niveau d'expression ARNm était suffisant si les Ct des tubes RT+ et RT- était différent d'au moins dix cycles. Cela garanti un niveau d'expression minimum acceptable pour procéder à la stratégie d'ARN interférence.

Un exemple de résultats comparant l'expression d'EIF4A1, entre des cellules ayant reçues le siRNA contrôle et des cellules ayant reçues le siRNA anti-EIF4A1, est présenté figure 21.

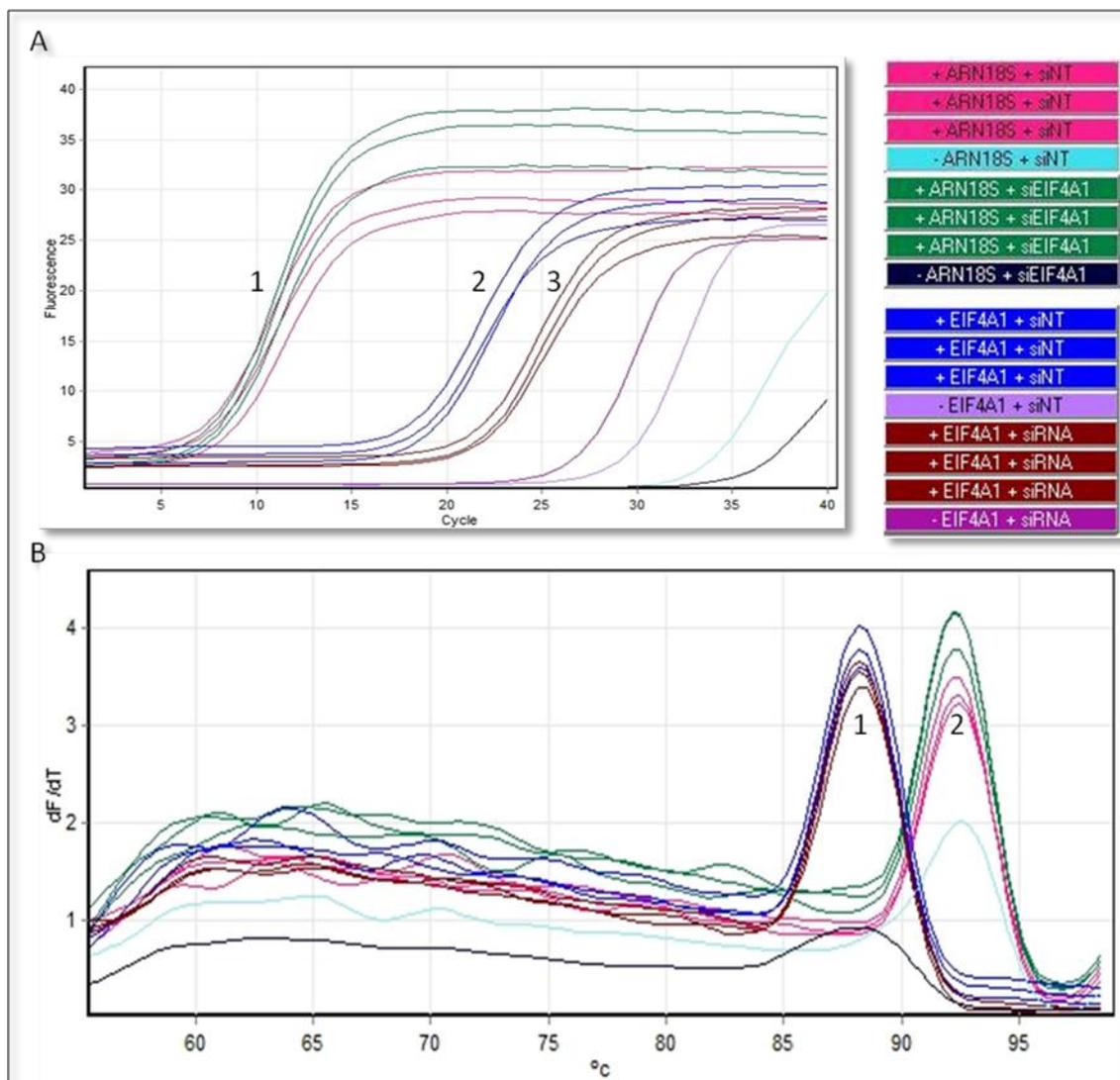


Figure 21 – Exemple de résultats de la qRT-PCR pour la comparaison du niveau d'expression de l'ARNm d'EIF4A1.

A, Courbe d'amplification des produits PCR ; **A1**, Amplification du gène de ménage ARN18S. **A2**, Amplification du gène EIF4A1 en condition contrôle ; **A3**, Amplification du gène EIF4A1 en condition siRNA anti-EIF4A1. **B**, Courbes de fusion des produits de PCR pour le gène EIF4A1 (**1**) et pour le gène ARN18S (**2**).

Le panel A montre un exemple de résultat comparant le niveau d'ARNm du gène EIF4A1 entre des cellules traitées avec un siRNA ne ciblant aucun gène (A2) et des cellules traitées avec un siRNA anti-EIF4A1 (A3). Le triplicat de la condition siRNA (3 ; Ct = 18,5 cycles) présente un retard de 3,1 cycles par rapport à la condition contrôle (2 ; Ct = 15,4 cycles),

traduisant le fait qu'il y avait $2^{3,1} = 8,5$ fois moins d'ARNm EIF4A1 dans les cellules traitées par le siRNA ciblant ce gène que dans les cellules contrôles, ce qui valide l'effet du siRNA. Cette différence n'est pas due à une erreur de charge car pour ces deux conditions, les cycles seuils de l'amplification du gène de ménage ARN18S (1 ; Ct = 6 cycles) sont identiques (A1).

Cette technique permet également de déterminer la courbe de fusion appelée « *melt* ». Elle correspond à la température à laquelle 50 % de l'ADNc est sous forme de simple brin. Ce facteur dépend de la teneur en GC et de la taille du fragment amplifié. La valeur du *melt*, déterminée par le logiciel, sera donc différente entre les différents produits PCR. Ainsi, la visualisation d'un seul pic nous assure de l'amplification d'un seul produit dans notre réaction de PCR. Le panel B de la figure 22 montre les *melt* correspondant aux conditions contrôle et siRNA anti-EIF4A1. Les profils 1 et 2 montrent les courbes de fusion spécifiques des produits de PCR correspondant à l'ARNm EIF4A1 et l'ARN18S, respectivement. Dans les 2 cas il n'y a qu'un seul pic, assurant que la réaction n'a amplifié qu'un seul amplicon.

VII. ANALYSE DE LA MÉTHYLATION DE LINE-1

De nombreuses techniques permettent d'étudier le statut de méthylation de l'ADN (Brena et al. 2006) . Nous avons choisi d'étudier la méthylation de 4 îlots CpG de la séquence répétée de LINE-1 (Long INsterspersed Element 1), reflétant le degré de méthylation global de l'ADN, par la technique originale de pyroséquençage. LINE-1 est l'élément transposable le plus actif, comptant pour environ 17 % du génome. La méthylation de son promoteur est important pour maintenir son inactivation et donc inhiber sa transposition. La variation du degré de méthylation du promoteur de LINE-1 est démontrée comme étant un évènement épigénétique commun dans les processus de cancérogenèse. Cette analyse étudie donc une région de LINE-1 qui représente un marqueur de la méthylation globale du génome (Irahara et al. 2010).

- L'étude de la méthylation comporte quatre étapes :
- Extraction de l'ADN
- Traitement de l'ADN au bisulfite de sodium

- Amplification de la matrice d'intérêt par PCR
- Détermination du degré de méthylation par pyroséquençage

Le pyroséquençage utilise une technologie de séquençage direct dans laquelle les nucléotides sont ajoutés séquentiellement. Cette technique rapide, à la fois qualitative et quantitative, permet d'étudier le pourcentage de méthylation de chaque CpG compris dans un îlot et cela sur 96 échantillons simultanément.

Cependant, il existe des limites comme la taille des fragments analysables qui ne doit pas dépasser en moyenne 60 à 120 nucléotides. Cependant, le nombre de motif CpG à étudier n'est pas limité dans le fragment analysé.

VII.1. Extraction d'ADN génomique à partir des lignées

Les ADN génomiques des lignées cellulaires sont extraits avec le kit « *DNeasy Blood and Tissues kit* » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Dix million de cellules maximum sont incubées dans une solution de lyse contenant 20 µL de protéinase K, puis l'ADN contenu dans le lysat est purifié sur une colonne de silice par des étapes successives de lavages-centrifugations et élué dans 200 µL d'eau ultra pure.

Les ADN extraits sont dosés au *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific) à 260 nm ; 1 DO à 260 nm = 50 ng/µL pour l'ADN double brin. Une lecture de l'absorbance à 280 nm et 230 nm permet de déterminer la pureté de l'ADN ; en effet le rapport de DO 260 nm / 280 nm doit normalement être compris entre 1,8 et 2,0. Un rapport plus élevé indique une contamination par des ARN ; un rapport plus faible indique une contamination par des protéines. Ce rapport permet d'estimer si les sels utilisés pour la précipitation de l'ADN ont bien été éliminés ; Il doit être supérieur à 1,7.

VII.2. Conversion au bisulfite de sodium

Le traitement au bisulfite de sodium de l'ADN entraîne la désamination des cytosines non méthylées en uraciles, comme illustré sur la figure 22.

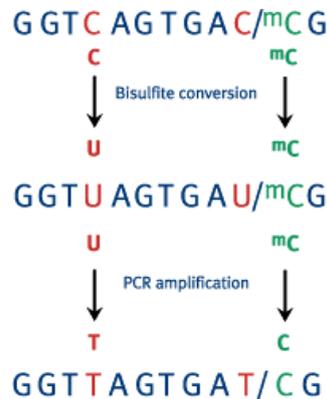


Figure 22 – Principe de la conversion au bisulfite de sodium.

Les cytosines non méthylées sont converties en uraciles puis en thymidine à la suite de la PCR. Les cytosines méthylées ne sont pas modifiées.

Après ce traitement, on obtient une séquence d'ADN modifiée dans laquelle seules les cytosines méthylées persistent alors que les cytosines non méthylées sont converties en uraciles. Cette technique permet de transformer une information épigénétique difficile à analyser en une information de type polymorphisme de base (C ou T) qui peut facilement être étudié par de nombreuses techniques, dont le pyroséquençage. Le traitement au bisulfite de sodium a été réalisé à l'aide du kit « *Epitect Bisulfite Kit* » (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur. 500 ng d'ADN sont ajoutés à une solution de bisulfite et à un tampon « *DNA protect buffer* » qui prévient la fragmentation de l'ADN généralement associé à ce traitement et accroît la dénaturation de l'ADN indispensable à la conversion des cytosines en uraciles.

Cette conversion comprend les différentes étapes décrites dans le tableau 15 et sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur.

Etape	Temps	Température
Dénaturation	5 min	95 °C
Incubation	25 min	60 °C
Dénaturation	5 min	95 °C
Incubation	85 min	60 °C
Dénaturation	5 min	95 °C
Incubation	175 min	60 °C
Conservation	24 h max	20 °C

Tableau 15 - Etapes de la conversion au bisulfite.

Une fois l'ADN converti, celui-ci est purifié sur colonne de silice par lavages successifs avant son élution par de l'eau ultra pure.

VII.3. Amplification de LINE-1 par PCR

La mise au point de la PCR a été effectuée sur différents ADN contrôles fournis par Qiagen : ADN méthylé et non méthylé traités au bisulfite par Qiagen et de l'ADN non méthylé non traité (qui sera traité au laboratoire avant la PCR). Les amorces sont fournies avec le kit « *PyroMark Q96 CpG LINE-1* ». La composition du mélange réactionnel de PCR est reportée dans le tableau 16.

Réactif	Concentration finale	Volume
Tampon PCR 10X	1X	5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	1,5 µL
Mix des 4 dNTPs (10 mM)	0,2 mM	1 µL
Amorce sens (10 µM)	0,2 µM	1 µL
Amorce anti-sens (10 µM)	0,2 µM	1 µL
Enzyme HotStart plus DNA polymerase (5U/µL)	1 unité	0,2 µL
Matrice (ADN génomique converti au bisulfite)	x ng	2 µL
Eau ultra pure	-	38,3 µL

Tableau 16 - Composition du mélange réactionnel de PCR pour l'amplification de LINE-1.

L'une des 2 amorces possède la particularité d'être couplée à une molécule de biotine, permettant sa purification lors du pyroséquençage. L'amplification est réalisée dans un

thermocycleur Veriti (Applied Biosystem). L'efficacité et la spécificité de la PCR est contrôlée par une migration des produits de la réaction sur gel d'électrophorèse à 2 %.

VII.4. Pyroséquençage

Les produits PCR, déposés dans une plaque de 96 puits, sont mis au contact d'une solution contenant des billes de Streptavidine, fixant les molécules de biotine. Cette fixation se fait par une agitation de 5 min à 1300 rpm. Les produits de PCR sont ensuite retenus par des filtres couplés à un système d'aspiration sous vide afin de retenir seulement les produits de PCR ayant fixé la Streptavidine. Ils sont ensuite plongés successivement dans des bacs contenant de l'éthanol à 70 %, une solution de dénaturation puis une solution de lavage. Ces étapes permettent de dénaturer les amplicons afin de ne garder que le simple brin couplé à la biotine/streptavidine.

La fixation de la streptavidine aux amplicons (1) et la purification du brin biotinylé (2) sont présentés sur la figure 23.

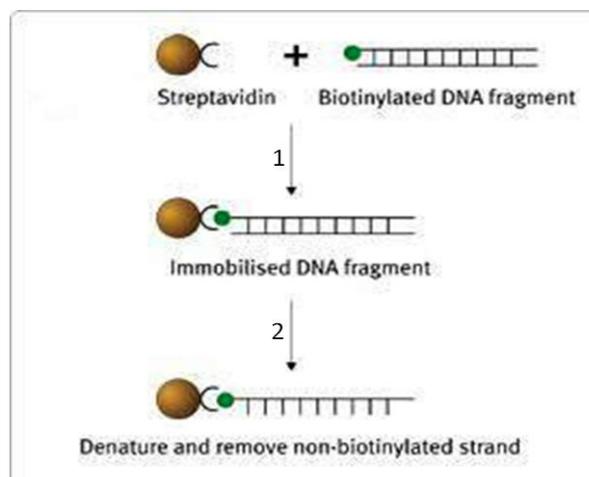


Figure 23 - Purification du brin biotinylé avant séquençage.

1, Fixation des billes de streptavidine aux amplicons biotinylés. **2,** Dénaturation des amplicons biotinylés en simple brin.

L'arrêt de l'aspiration sous vide permet de relâcher les amplicons, par une agitation manuelle, dans une plaque 96 puits contenant le primer de séquençage, fourni par le kit « PyroMark Q96 CpG LINE-1 ». Ce primer est complémentaire du brin biotinylé. Il a été choisi

de façon à s'hybrider quelques bases seulement en amont des CpG à étudier. Cette hybridation est effectuée par une incubation à 70 °C pendant 15 min.

La plaque est ensuite déposée dans l'appareil et l'analyse commence après avoir programmé la séquence des bases à injecter d'après la séquence de référence LINE-1 à laquelle la position des CPG à étudier a été renseignée. L'appareil injecte dans un premier temps le mélange d'enzymes : ADN polymérase, ATP sulfurylase, Luciférase et Apyrase ; puis leur substrat, l'Adénosine 5'phosphosulfate et la Luciférine. Les nucléotides vont ensuite être ajoutés les uns après les autres, d'après la séquence de référence. Si le nucléotide injecté est complémentaire de la séquence à analyser, l'ADN polymérase l'incorpore dans le brin en cours de synthèse. Cette incorporation libère un pyrophosphate, utilisé par l'ATP sulfurylase pour produire de l'ATP, lequel est ensuite utilisé par la luciférase pour entraîner la production d'oxyluciférase et l'émission d'un signal lumineux. Le signal lumineux est alors enregistré par un capteur, puis retranscrit sous forme de pic, l'ensemble des pics constituant un pyrogramme. L'apyrase a pour fonction de dégrader les nucléotides en excès ou non incorporés si le nucléotide attendu ne correspond pas à celui injecté.

La hauteur d'un pic est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés pour chaque base injectée. L'ensemble de ces étapes sont représentées dans le panel A de la figure 24.

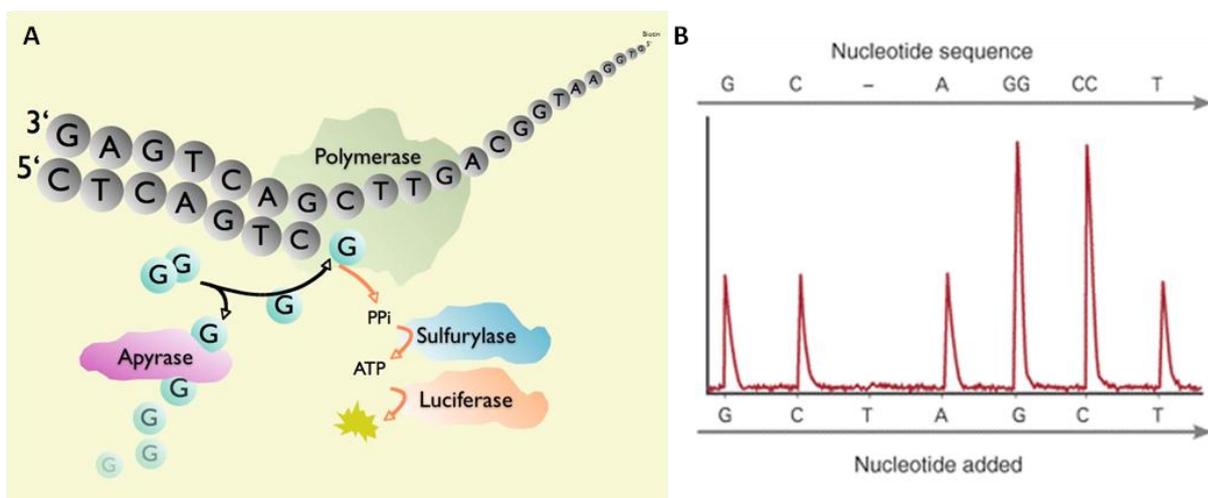


Figure 24 - Principe du pyroséquençage et exemple de pyrogramme.

A, exemple de la production du signal lumineux suite à l'incorporation d'un nucléotide G. **B**, Exemple de pics formés suite à l'injection d'une séquence GCTAGCT en fonction d'une séquence de référence GCAGGCCT.

Le panel B de la figure 24 montre le résultat d'un pyrogramme dans lequel une séquence GCTAGCT est ajoutée séquentiellement à une matrice à étudier dont la séquence est GCAGGCCT. L'incorporation d'une seule base produit une intensité lumineuse équivalente à un simple pic. L'incorporation d'une base, présente deux fois consécutivement sur la séquence de référence, résultera en l'incorporation de deux bases consécutivement sur la matrice néo-formée, et donc en la production d'une intensité lumineuse double. L'injection d'une base non complémentaire de la séquence de référence ne produira pas de pic car le nucléotide ne sera pas incorporé à la matrice néo-formée.

Les bases ne variant pas dans la séquence à étudier sont considérés par le logiciel comme des pics de référence, dont il se servira afin de déduire les intensités des pics correspondant aux positions à étudier.

VII.5. Analyse des résultats

Une fois les injections terminées, les résultats sont analysés par le logiciel « Pyro Q-CpG ».

L'intensité des pics de références de la séquence est comparée à celle des pics correspondant au polymorphisme étudié. Si la totalité du signal est obtenue lors de l'incorporation de la base C, alors cela signifie que le degré de méthylation est de 100 % car les cytosines ont été protégées de la conversion au bisulfite par les groupements CH₃.

Un exemple montrant une différence de degré de méthylation pour le troisième CpG de l'îlot LINE-1 étudié, pour les lignées DU145 et LNCaP, est présenté figure 25. Le logiciel calcule, dans la zone grisée correspondant au CpG à étudier, le ratio des intensités du pic C par rapport à l'intensité totale (pics C et T). Par ce procédé, il en déduit le degré de méthylation, qui est égal au pourcentage du pic correspondant à la base C, car il représente les cytosines méthylées qui n'ont pas été converties en uraciles lors de la conversion au bisulfite.

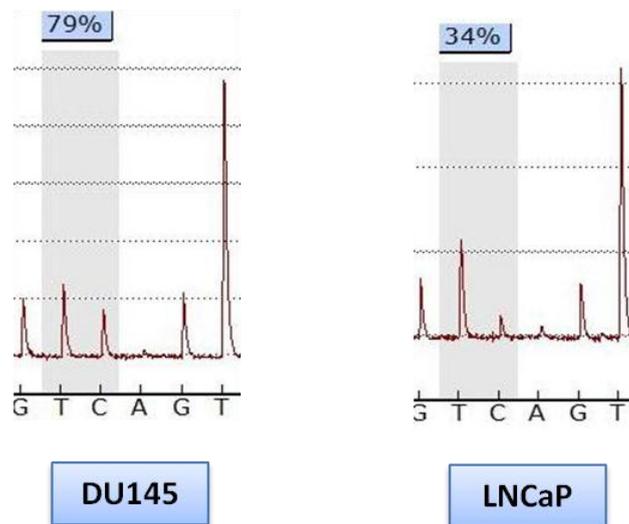


Figure 25 - Exemple de méthylation d'un CpG LINE-1 dans les lignées DU145 et LNCaP.

Le degré de méthylation de 79 % et 34 % (deux pics de la zone grisée), représentent le pourcentage de bases méthylées (ratio de l'intensité pour le pic C par rapport à l'intensité des deux pics C et T).

Des contrôles de méthylation sont aussi utilisés. Nous disposons en effet d'ADN 100 % méthylé et d'ADN 0 % méthylé. Les séquences dont on étudie le degré de méthylation sont couramment classées selon les trois degrés de méthylation suivants :

- Hyperméthylé (> 66 %)
- Hémiméthylé (entre 33 et 66 %)
- Hypométhylé (< 33 %).

Afin de pouvoir, par la suite visualiser dans quelle groupe se trouve nos échantillons, nous avons procédé à un mélange des ADN méthylé et non méthylé. Cela nous a permis de produire un ADN possédant un mélange dont le taux de méthylation global est de 66 % (obtenu en mélangeant les ADN selon un ratio 2/3 d'ADN méthylé et 1/3 d'ADN non méthylé) et un ADN dont le taux de méthylation global est de 33 % (obtenu en mélangeant les ADN selon un ratio 1/3 d'ADN méthylé et 2/3 d'ADN non méthylé).

Un exemple de méthylation obtenu avec ces mélanges d'ADN est présenté figure 26.

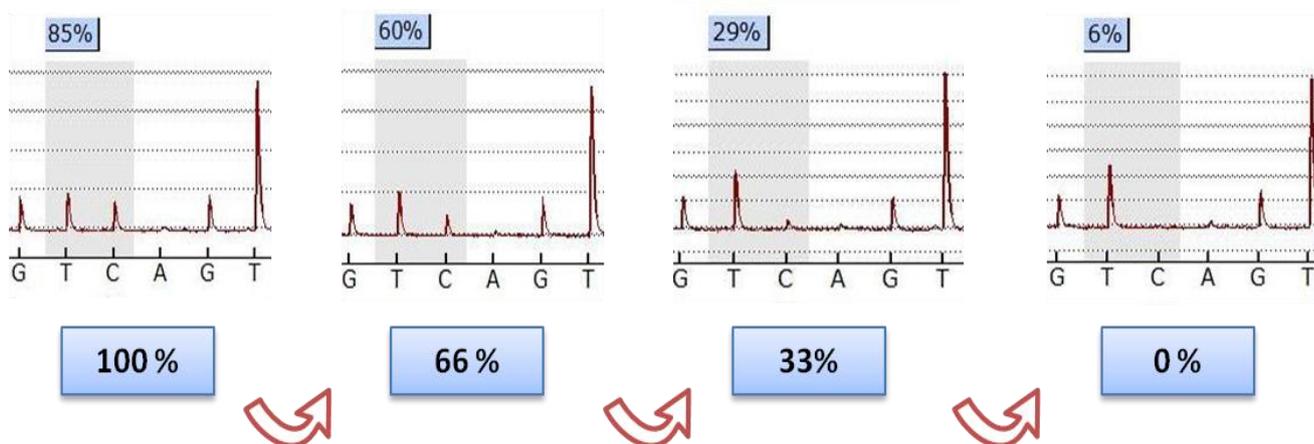


Figure 26 – Mesure du taux de méthylation de LINE-1 pour les ADN contrôles (méthylation de 100 %, 66 %, 33 % et 0 %).

RÉSULTATS – PARTIE 1

Sommaire

I. APPROCHE IN SILICO	131
I.1. Extraction des données de sensibilité des lignées cellulaires du panel	131
I.2. Voies cellulaires représentées dans la signature de True	133
I.3. Extraction des données d'expression de chaque gène dans les 59 lignées du panel	134
I.4. Regroupement des données d'expression et de sensibilité pour chaque gène	134
I.5. Elimination des puces de « mauvaise » qualité	135
I.3. Evaluation de la reproductibilité des données d'expression	138
I.4. Recherche de corrélations entre expression d'un gène et sensibilité à une drogue	140
I.6. Récapitulatif des résultats de corrélations obtenus.....	142
I.7. La signature spécifique des platines.....	149
II. VALIDATION FONCTIONNELLE IN VITRO	151
II.1. Caractérisation des lignées.....	151
II.2. Résultats préliminaires des tests de clonogénicité sur le gène SHMT2	152
II.4. Résultats des tests de cytotoxicité	154
II.5. Validation de la diminution d'expression des gènes par qRT-PCR.....	165

I. APPROCHE *IN SILICO*

I.1. Extraction des données de sensibilité des lignées cellulaires du panel

Nous avons extrait de la banque de données du DTP, pour les 59 lignées du panel, les IC₅₀ de 152 agents antiprolifératifs, représentant plusieurs classes de molécules (tableau 17).

Mécanisme d'action *	Agent antiprolifératif	Numéro NSC	Moyenne -logIC ₅₀	Mécanisme d'action *	Agent antiprolifératif	Numéro NSC	Moyenne -logIC ₅₀
AA A2-A7	Mitomycin	26980	6,11	Db	N,N-dibenzyl-daunorubicin	268242	4,83
	Porfiro mycin	56410	5,43		Pyrazolo acridine	366140	6,56
	Carmustine	409962	4,15	Di	5-6-dihydro-5-azacytidine	264880	4,63
	Chlorozotocin	178248	3,21		É]-2'-deoxythioguanosine	71851	3,80
	Clomesone	338947	3,72		Azacytidine	102816	6,11
	Irofulven	683863	6,54	É]-2'-deoxythioguanosine	71261	5,94	
	Lomustine	683863	4,35	Thioguanine	752	5,91	
	Mitozolamide	79037	3,93	Dr	Guanazole	1895	2,23
	PCNU	353451	3,68		Hydroxyurea	32065	3,14
	Semustine	95466	4,37		Pyrazoloimidazole	51143	2,59
Trabectedin	648766	8,71	Aphidicolin-glycinate	303812	5,02		
AA A6	Asaley	167780	5,30	Ds	Cyclo cytidine	145668	4,73
	Busulfan	750	3,22		Cytarabine	63878	4,82
	Carboplatin	241240	3,88		Flouridine	27640	6,39
	Chlorambucil	3088	4,22		Fluorouracil	19893	4,63
	Cisplatin	19875	5,38		Ftorafur	148958	2,67
	Cyclo disone	348948	4,41	Gemcitabine	613327	6,63	
	Diamino cyclohexylplatine	271674	5,51	Thiopurine	755	5,31	
	Dianhydro galactitol	132313	4,33	Rs	Acivicin	163501	5,50
	Diaziridinylbenzoquinone	182986	5,50		Lawsonine	126771	4,97
	Fluorodopan	73754	3,46		Brequinar	368390	5,80
Hepsulfam	329680	3,67	L-alanosine		153353	5,06	
Iproplatin	256927	4,45	N-phosphonoacetyl-L-aspartate		224131	3,35	
Mechlorethamine	762	5,52	Pyrazofurine	143095	5,26		
Melphalan	8806	4,56	Aminopterin	132483	6,18		
Oxaliplatin	266046	5,56	Aminopterin derivative	134033	6,60		
Piperazine mustard	344007	3,97	Aminopterin derivative	184692	6,67		
Piperazine diolone	135758	6,11	An antifol	623017	7,01		
pipobroman	25154	4,16	An antifol	633713	8,17		
Spiromustine	172112	3,82	Df	Baker's antifolate	139105	6,24	
Teroxirone	296934	4,90		Methotrexate	740	6,94	
Tetraplatin	363812	5,91		Methotrexate-derivative	174121	8,05	
Thiotepa	6396	4,09		Trimetrexate	352122	8,58	
Triethylenemelamine	9706	5,20		Raltitrexed	639186	5,14	
Uracil mustard	34462	4,56	Pemetrexed	698037	5,00		
Yoshi 864	102627	2,90	Colchicine	757	7,26		
T1	Camptothecin	94600	7,40	Colchicine-derivative	33410	7,58	
	Camptothecin, 7Cl	249910	7,42	Dolastatine 10	376128	9,53	
	Camptothecin, 9MeO	176323	7,10	Halichondrin B	609395	8,93	
	Camptothecin, 9-NH2 RS	629971	7,36	Maytensine	153858	8,23	
	Camptothecin, 9NH2 (S)	603071	7,43	Trityl-cysteine	83265	6,01	
	Camptothecin, 10 OH	107124	7,51	Vinblastine	49842	9,04	
	Camptothecin, 11formyl	606172	5,69	Vincristine	67574	6,82	
	Camptothecin, 11HOMe	606173	5,43	Paclitaxel	125973	7,35	
	Camptothecin, 20 ester	606497	6,51	Taxol analogue	600222	5,65	
	Camptothecin, 20 ester	606985	7,42	Taxol analogue	656178	5,66	
Camptothecin, 20 ester	610456	6,84	Taxol analogue	658831	5,43		
Camptothecin, 20 ester	618939	7,19	Taxol analogue	661746	6,86		
Irinotecan	616348	4,88	Taxol analogue	664402	6,85		
SN38	673596	7,33	Taxol analogue	664404	7,80		
Topotecan	609699	7,24	Taxol analogue	666608	7,00		
Rebeccamycin	359079	6,68	Taxol analogue	671867	7,59		
6 N-Diethylaminoethyl	640199	7,29	Taxol analogue	671870	6,11		
BM Y 27557, BM S-181176	655649	7,69	Taxol analogue	673187	6,43		
Amonafide	308847	5,49	Taxol analogue	673188	7,30		
Amsacrine	249992	6,32	Docetaxel	628503	7,95		
Anthrapyrazole derivative	355644	6,68	P90	Geldanamycin	330500	6,26	
Bisantrene	337766	6,76		Thiosemicarbazone	95678	5,79	
Daunorubicin	82151	7,10	Uk	Thiosemicarbazone	107392	5,01	
Daunorubicinol	180510	5,96		Inosine-glycodialdehyde	118994	3,54	
Deoxydoxorubicin	267469	7,34	Pi	L-asparaginase	109229	0,57	
Doxorubicin	123127	6,84					7,95
Ellipticine	71795	6,12	mTi	Rapamycin (sirolimus)	226080	8,09	
Etoposide	141540	5,36					6,81
Idarubicin	256439	7,42		Rapamycin analog	606698	6,66	
Iodo doxorubicin	378901	5,44		Rapamycin analog	606699	6,47	
Menogaril	269148	6,07		temsirolimus	683864	7,99	
9-Methoxyellipticine	69187	7,19					6,83
Mitoxantrone	301739	7,20		ITK	Erlo tinib	718781	5,23
NM H-ellipticine	264137	5,06			Dasatinib	732517	6,45
Piroxantrone	349174	5,83			Imatinib	716051	4,82
Teniposide	122819	6,35			Lapatinib	727989	5,49
Zorubicine	164011	6,59	Nilotinib		-	5,53	
Aclarubicine	208734	8,42	Gefitinib		715055	5,45	
Db	Cyano-doxorubicin	357704	10,29	Sunitinib	736511	5,71	
	Hycanthone	142982	5,10	Sorafenib	724772	5,73	
	Morpholino-doxorubicin	354646	7,73				

Tableau 17 - Liste des 152 agents antiprolifératifs qui ont été retenus pour l'étude *in silico*.

Les agents sont classés selon leur mécanisme d'action. Pour chaque agent, une moyenne des sensibilités a été calculée à partir des 59 valeurs de $-\log IC_{50}$.

* AA A2-A7 : A2, A7, agents alkylants sur l'azote N-2 et N-7 de la guanine, respectivement ; AA A6 : agent alkylant sur l'Oxygène en position 6 de la guanine ; T1 : inhibiteur d'ADN topoisomérase 1 ; T2 : inhibiteur d'ADN topoisomérase 2 ; Db : liaison à l'ADN ; Di : agent s'incorporant dans l'ADN en cours de réplication ; Dr : inhibiteur de la ribonucléotide réductase ; Ds : inhibiteur de la synthèse d'ADN ; Rs : inhibiteur de la synthèse d'ARN ; Df : antifolate ; Tu : agent anti-mitotique ; P90 : inhibiteur Hsp 90 ; Pi : inhibiteur de la synthèse protéique ; mTi : inhibiteur de mTor ; ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase ; Uk : inconnu.

Les IC₅₀ ont été moyennées sur les 59 lignées du NCI. Elles permettent de représenter la sensibilité globale des lignées à un agent antiprolifératif et de visualiser les agents les plus efficaces. Une différence d'une unité en termes de $-\log IC_{50}$ correspond à une différence de 10 fois en termes de sensibilité à l'agent anticancéreux.

I.2. Voies cellulaires représentées dans la signature de True

Nous nous sommes intéressés aux voies cellulaires dans lesquelles étaient impliqués les 86 gènes différentiellement exprimés entre haut grade et bas grade. Le tableau 18 classe les 86 gènes de la signature de True d'après les processus cellulaires dans lesquels ils jouent un rôle.

Voie cellulaire	Nombre de gènes	Répartition en %
Métabolisme	36	41,9
Transduction du signal	11	12,8
Prolifération - Différenciation - Apoptose	7	8,1
Régulation de la transcription	7	8,1
Structure - Adhérence - Mobilité	6	7
Traduction - Synthèse protéique	6	7
Transport	6	7
Autre / Inconnu	7	8,1
Total	86	100

Tableau 18 – Répartition des gènes de la signature parmi les voies cellulaires dans lesquelles ils interviennent, d'après le système de classification utilisé dans l'étude de True.

Presque la moitié des gènes jouent un rôle dans le métabolisme au sens large incluant le métabolisme énergétique, des sucres, des lipides et des protéines. Une tendance semble se

dégager selon laquelle le métabolisme serait grandement remanié dans les cancers de la prostate de haut grade.

Quatre gènes sont venus enrichir le panel de la signature de True, d'après des recherches bibliographiques suggérant leur implication dans la cancérogenèse : FEN1 (*flap structure-specific endonuclease 1*) (Yang et al. 2009), ERBB2 (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) (El Sheikh et al. 2004; Cai et al. 2009; Pignon et al. 2009), TOP2A (*Topo-isomerase 2 α*) (Murphy et al. 2007) et DAB2IP (*DAB2 interacting protein*) (Duggan et al. 2007; Kong et al. 2010; Xie et al. 2010). ERBB2 et TOP2A faisait partie des gènes étudiés sur la puce de True. Nous les avons quand même intégrés à l'étude *in silico* malgré le fait qu'ils ne soient pas trouvés différentiellement exprimés entre les différents grades de Gleason dans cette étude.

I.3. Extraction des données d'expression de chaque gène dans les 59 lignées du panel

Une puce Affymetrix permet d'évaluer le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes. Lors de l'analyse *microarray*, les ARN totaux d'une lignée cellulaire sont hybridés sur une puce Affymetrix U95 ou U133. L'analyse de 59 puces (correspondant à une série de données) est donc nécessaire pour l'étude de l'expression des gènes dans toutes les lignées du panel. Chaque série contiendra donc, pour chaque gène, 59 valeurs d'expression regroupées dans un seul fichier annoté. Il existe au minimum une série de données par gène, mais il arrive que plusieurs séries de données soient disponibles, jusqu'à une cinquantaine lorsque le gène est très connu.

Nous avons donc extrait tous les jeux de données d'expression disponibles pour chacun des 86 gènes. En moyenne, un gène possédait six jeux de données concernant son niveau d'expression dans les 59 lignées cellulaires cancéreuses du panel, c'est-à-dire six expériences de *microarray* dans lesquelles une sonde d'ADNc du gène étudié était présente sur les puces.

I.4. Regroupement des données d'expression et de sensibilité pour chaque gène

Les lignées ont été classées dans un fichier Excel par ordre alphabétique pour des raisons pratiques, et les jeux de données d'expression insérées côte à côte ainsi que les données de sensibilité des lignées aux 152 agents. Comme nous étudions ces gènes individuellement, nous avons créé un fichier pour chacun des 86 gènes.

La figure 27 montre un exemple de fichier contenant les données d'expressions extraites pour le gène PSMB1 ainsi que les données de sensibilité aux 152 agents du panel.

Données d'expression					-log IC50 152 agents					
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	PSMB1	GC33446	GC85499	GC182009	GC191982		26980	56410	409962	178248
2		U95 Lavedan	U95 Kaldjian	U133 Kaldjian	U133 Kaldjian		mitomycin	porfirimycin	carmustine	chlorozotocin
3		D00761	D00761	NM_002793	W86293					
4	786-0	1255,6342	3031,4	2135,8	2234,41		6,394	5,067	4,374	4,247
5	A498	1060,8229	1759,9	1002,71	1244,99		6,146	5,2	3,993	2,95
6	A549/ATCC	1090,2363	1694,2	933,7	1176,31		6,781	6,311	3,986	3,123
7	ACHN	945,0428	1710,1	1294,78	1352,5		6,83	6,42	4,081	3,461
8	BT-549	995,4152	2170,9	969,5	1428,16		5,758	4,915	4,101	3,302
9	CAKI-1	961,0298	1468,7	830,69	970,33		6,572	6,023	4,143	3,098
10	CCRF-CEM	1556,604	2368,8	1577,08	1866,45		6,64	6,003	4,729	3,459
11	COLO 205	1689,9494	1649,5	1162,28	1203,62		5,991	5,653	4,141	2,903
12	DU-145	843,4306	2346,8	1586,44	1666,4		6,8	6,549	3,772	3,257
13	EKVX	1287,5483	2115,4	1482,2	1554,92		5,335	4,91	3,92	2,903
53	SN12C	981,2456	1973,5	1489,3	1753,28		6,543	6,107	4,12	3,045
54	SNB-19	1573,0213	3002,9	1774,36	1790,45		6,529	5,629	4,165	3,506
55	SNB-75	1418,6792	1512	1066,41	1144,01		6,349	5,96	4,282	3,581
56	SR	1335,1196	2095,5	973,54	1141,69		6,915	6,388	4,854	4,104
57	SW-620	1354,4928	2240,9	1585,43	1396,55		6,314	5,727	4,282	3,08
58	T-47D	997,5998	1762	986,13	1363,94		5,694	5,036	3,959	3,168
59	TK-10	1689,3038	2105,7	996,72	1599,18		5,313	4,789	4,031	2,903
60	U251	1741,5487	2325,9	1800,94	2056		6,451	5,925	4,283	3,746
61	UACC-257	623,2396	1481,9	916,6	1047,47		5,918	5,082	4,122	2,98
62	UACC-62	1292,9568	2326,7	1428,49	1744,12		6,882	6,332	4,623	4,328
63	UO-31	1454,2809	2111,1	1558,55	1601,7		5,729	4,857	4,008	2,921

59 lignées cancéreuses

Niveau d'expression

Figure 27 - Exemple d'un fichier Excel regroupant les 4 jeux de données d'expression disponibles pour le gène PSMB1 dans les 59 lignées cellulaires du panel et les données de sensibilité aux 152 agents testés.

Cellules **B2 à E2**, type de puce Affymetrix utilisée ; Cellules **A4 à A63**, 59 lignées cellulaires ; Cellules **B4 à E63**, valeurs d'expression ; Cellules **G2 à J2**, agents anticancéreux du panel ; Cellules **G4 à J63**, sensibilité des lignées à l'agent.

Cette figure montre que quatre expériences de *microarray*, réalisées sur deux puces U95 (colonne B et C) et deux puces U133 (colonne D et E), sont disponibles pour l'étude du niveau d'expression du gène PSMB1 dans les 59 lignées du panel (lignes 4 à 63). Les colonnes G à J montrent les données de sensibilité des lignées aux quatre premiers agents parmi les 152 retenus pour l'analyse.

1.5. Elimination des puces de « mauvaise » qualité

Dans la mesure où les résultats obtenus par *microarray* sont très dépendants des différentes étapes de réalisation de la puce (dépôt des spots, extraction des ARNs, étape d'hybridation, élimination du bruit de fond, normalisation, etc...), il est impératif d'avoir à disposition des

outils permettant de vérifier la « qualité » de ces données. Cela permet d'assurer la cohérence des données extraites de cette base qui conditionne l'interprétation des corrélations obtenues par notre analyse *in silico*.

Pour cela, nous avons eu recours à des tests regroupés sous le package *Bioconductor* appelé *arrayQualityMetrics* (Kauffmann *et al.* 2010). En collaboration avec le Dr A. Kauffmann nous avons utilisé ce package pour (1) analyser la qualité des données d'expression au sein d'une même puce, et (2) comparer l'homogénéité de la distribution des intensités d'expression entre les différentes puces du même set. L'ensemble de ces tests, réalisés automatiquement à partir des données brutes ou normalisées des puces, fournit une représentation graphique des résultats permettant de visualiser « l'écartement » d'une (ou plusieurs) puce(s) par rapport à l'ensemble des puces de la même série. Ceci permet d'exclure les puces dites *outliers* pour lesquelles un problème potentiel existe : dépôt des spots non homogène lors de la fabrication de la puce, hybridation non-homogène sur la puce (liée à la présence de bulles d'air par exemple), bruit de fond trop important, etc... La figure 28 montre trois représentations graphiques obtenues avec le package *arrayQualityMetrics* : Le *MA-plot* (Fig. 28A) qui permet de visualiser la dispersion des intensités des spots au sein d'une même puce en référence à une valeur fictive correspondant à la médiane de chaque spot sur l'ensemble des autres puces du même set. L'absence de problème au niveau d'une puce se traduit par une répartition de la majorité des valeurs de M autour de 0. Un décalage vers des faibles valeurs de A indique une hétérogénéité dans le bruit de fond de la puce, et vers des fortes valeurs de A un problème dans la saturation du signal. Le *density plot*, et la représentation *HeatMap* permettent de contrôler les différences entre puces du même set. Le *density plot* présente les distributions des intensités des spots pour chaque puce du set (Fig. 28B). Dans l'exemple qui est présenté on peut voir que le profil de distribution d'une puce (courbe pointillée verte) parmi les 33 puces du set s'écarte de l'ensemble des autres profils. Le même type d'information peut être obtenu avec la représentation *HeatMap* (Fig. 28C) qui permet de *clusteriser* les puces en fonction des « distances » entre intensité de spots lorsque les puces sont comparées deux à deux. Un carré bleu sur la représentation *HeatMap* (= distance nulle) correspond à deux puces identiques (première diagonale). Plus la couleur est décalée vers le jaune, plus cela traduit une différence entre ces deux puces. Ainsi, la puce correspondant aux deux colonnes jaunes s'écarte de l'ensemble des autres puces du set et sera considérée comme *outlier*.

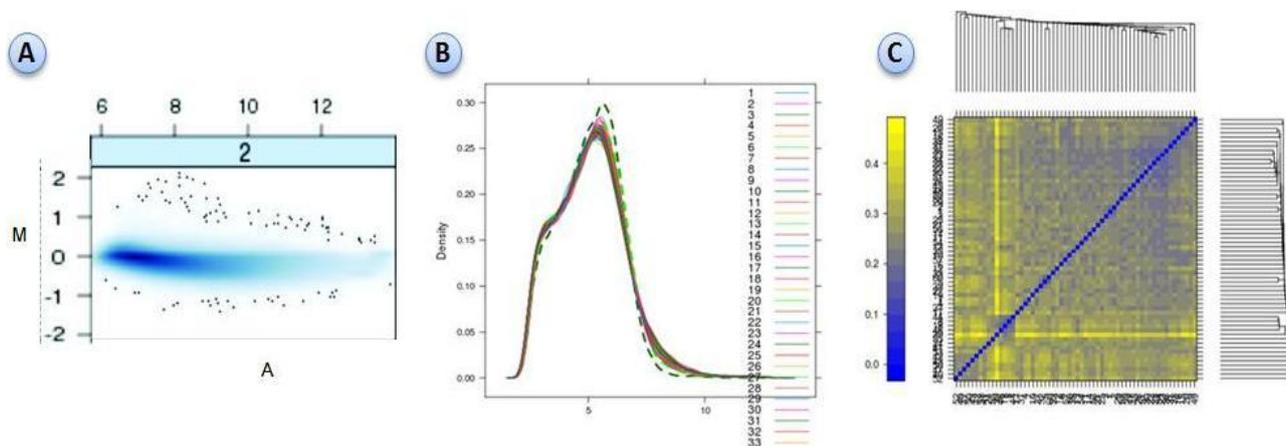


Figure 28 – Résultats des tests qualité utilisant le package *arraQualityMetrics* pour l'identification des outliers.

A, Ma-plot permettant de visualiser la dispersion des intensités des spots au sein d'une même puce. **B**, density plot présentant les distributions des intensités des spots pour chaque puce du set. **C**, HeatMap permettant de clusteriser les puces en fonction des « distances » entre intensité de spots lorsque les puces sont comparées deux à deux.

Ces tests ont été réalisés pour l'ensemble des données d'expression que nous avons récupérées pour les 86 gènes de l'étude de True *et al.* Généralement, il faut que deux tests du package *arrayQualityMetrics* identifient une puce comme *outlier* pour pouvoir éliminer les données correspondantes (Kauffmann and Huber 2010). Le tableau 19 récapitule les différentes expériences de *microarray* (correspondant chacune à une lignée particulière dans la série de données) que nous avons exclues de notre analyse *in silico*.

Type de puce Affymetrix	Données identifiées comme outliers correspondant aux lignées cellulaires suivantes
U95-A	RPMI8226 - MCF7 - M14
U95-B	MCF7
U95-C	HOP92 - DU145
U95-D	SKOV3 - UAC62
U95-E	H322M - H460 - UAC62
U133-A	K562 - MCF7
U133-B	HS 578T

Tableau 19 - Liste des lignées cellulaires qui n'ont pas été pris en compte, en fonction du type de puce Affymetrix utilisées.

I.3. Evaluation de la reproductibilité des données d'expression

Comme nous l'avons évoqué précédemment, plusieurs séries de données d'expression peuvent être disponibles pour un même gène (jusqu'à une cinquantaine). En raison de différences dans le type de puce, d'expérimentateur et de l'état des lignées cellulaires au moment de l'étude, les données issues de *microarray*, malgré le fait qu'elles soient de bonne qualité, ne sont pas toujours reproductibles. Pour ne retenir que les séries de données pour lesquelles les valeurs d'expression pour le gène considéré sont homogènes, nous avons comparé ces séries de données une à une en effectuant un test de corrélation de Pearson. Ce test permet de calculer un coefficient r compris entre 0 et 1, pour lequel zéro souligne deux séries de données non corrélées et 1 indique une corrélation parfaite entre deux séries de données. Nous avons choisi de ne retenir que les expériences de *microarray* pour lesquelles un coefficient de corrélation $r \geq 0,5$ est retrouvé lorsqu'on les compare deux à deux, ce qui correspond à une valeur de $p < 0,0001$. La figure 29 illustre le test de concordance entre les 5 séries de données d'expression disponibles pour le gène DAD1.

		Données d'expression					-log IC50 152 agents			
		A	B	C	D	E	G	H	I	J
59 lignées cancéreuses	1	DAD1	GC9978	GC28824	GC85631	GC180925	GC180926	26980	56410	40962
	2		Botstein	U95 Lavedan	U95 Kaldjian	U133 Kaldjian	U133 Kaldjian	mitomycine	porfiromycine	carmustine
	3		<u>A046832</u>	<u>D15057</u>	<u>D15057</u>	<u>NM_001344</u>	<u>NM_001344</u>			
	4	786-0	0,1818	907,2336	533,2	986,33	2791,38	6,394	5,067	4,374
	5	A498	0,2253	945,6239	570,1	949,47	2440,11	6,146	5,2	3,993
	6	A549/ATCC	0,2201	974,5246	620,3	996,39	2601,07	6,781	6,311	3,986
	7	ACHN	0,1461	826,876	454,6	748,37	1348,01	6,83	6,42	4,081
Niveau d'expression	59	TK-10	0,1553	849,3131	453,7	523,26	1193,63	5,313	4,789	4,031
	60	U251	-0,0362	900,1603	546,1	598,27	1952,76	6,451	5,925	4,283
	61	UACC-257	0,1399	966,2934	515,3	934,9	2695,36	5,918	5,082	4,122
	62	UACC-62	0,4082	1346,135	708,1	1135,7	3620,45	6,882	6,332	4,623
	63	UD-31	0,0828	653,4725	446,3	545,53	1475,75	5,729	4,957	4,008
	64									
	65			0,73	0,78	0,80	0,72	-0,211	-0,268	-0,256
	66				0,79	0,77	0,71	-0,123	-0,131	-0,090
	67					0,87	0,88	-0,127	-0,109	-0,187
	68						0,92	0,016	-0,028	-0,200
	69							-0,030	-0,050	-0,106
70										
71		Botstein	U95 Lavedan	U95 Kaldjian	U133 Kaldjian	U133 Kaldjian	mitomycine	porfiromycine	carmustine	
72										

1

Test Pearson B vs C Test Pearson D vs E

Figure 29 – Exemple de résultats de tests de corrélation entre les différentes séries de données d'expression disponibles pour le gène DAD1.

Colonne A, 59 lignées cellulaires du panel ; Cellules B à F, séries de données d'expression ; Cellules B2 à F2, type de puce Affymetrix utilisée ; Colonnes H à J, sensibilité des lignées à l'agent considéré (H2 à J2) ; Cellule C65, Coefficient de Pearson correspondant au résultat de la comparaison entre les données d'expression des séries B et C ; Cellule E67, Coefficient de Pearson correspondant au

résultat entre les données d'expression des séries D et E ; Les carrés bleus correspondent à un coefficient de corrélation $\geq 0,5$.

Les données d'expression de DAD1 représentent une situation optimale, dans laquelle toutes les séries de données sont corrélées entre elles (Fig. 29). En réalité, Deux autres cas de figure existent (Figure 30).

A

62	UACC-62	1528,7861	350,6598	948,448	48,3	-1,6	333,4	608,7	885,7	653,85	546,13	489,15
63	UO-31	1291,433	380,3874	651,4224	106,2	53,9	278,8	383,8	720,2	586,2	157,14	313
64												
65			0,91	0,94	0,29	0,32	0,89	0,91	0,90	0,83	0,78	0,85
66				0,97	0,37	0,32	0,84	0,87	0,85	0,80	0,67	0,80
67					0,32	0,30	0,87	0,91	0,88	0,82	0,75	0,85
68						0,38	0,37	0,32	0,41	0,31	0,14	0,39
69							0,31	0,29	0,36	0,28	0,19	0,29
70								0,97	0,90	0,87	0,80	0,93
71									0,91	0,87	0,86	0,94
72										0,90	0,70	0,87
73											0,72	0,88
74												0,84
75												

B

60	U251	0,017	107,3425	7,1614	9,3995	5	70,5	2,5	13,59
61	UACC-257	0,4594	174,8456	8,134	6,8218	-1,8	92,5	4,7	9,91
62	UACC-62	-0,2007	166,683	7,1012	26,1931	-9,8	90,8	3,7	14,4
63	UO-31	-0,2757	135,9599	16,0088	8,3951	-4,8	95,3	-4	13,89
64									
65			0,00	-0,17	-0,11	0,19	-0,34	0,26	0,20
66				0,16	0,23	-0,04	0,27	0,14	0,06
67					0,00	0,06	0,16	-0,01	-0,07
68						-0,08	-0,08	-0,04	0,08
69							-0,43	-0,20	-0,01
70								0,05	0,04
71									-0,19

Figure 30 – Analyse de corrélation inter-séries, exemples de deux gènes.

A, Cas pour lequel une minorité d'expériences ne sont pas corrélées à la majorité des autres expériences. **B**, Cas pour lequel il n'existe aucune corrélation entre les différentes séries de données.

Le cas le plus fréquent est celui dans lequel une minorité de série de données n'est pas corrélée avec la majorité des autres expériences. Ces séries sont tout simplement exclues de l'analyse *in silico* (Fig. 30A). Le troisième cas, beaucoup plus rare, correspond à l'absence totale de corrélation entre les différentes séries de données recueillies (Fig. 30B). Dans ce dernier cas, il a été impossible d'inclure les gènes correspondants dans notre étude. Les gènes concernés sont HSD17B3, HACE1, FTH1, MYBPC1 et CD63. Cette discordance peut être

expliquée, entre autre, par un mauvais choix des séquences des sondes utilisées pour l'hybridation.

I.4. Recherche de corrélations entre expression d'un gène et sensibilité à une drogue

Une fois ces différentes étapes de « nettoyage » des données extraites de la base, nous avons recherché des corrélations entre le niveau d'expression des 86 gènes et la sensibilité des cellules aux 152 agents antiprolifératifs du panel. Nous avons pour cela calculé, pour chaque gène et pour chaque série de données, 152 coefficients de corrélation de Pearson. Ce calcul a été répété pour l'ensemble des 506 séries de données de *microarray* qui ont été retenues au final. Nous avons considéré comme significatif un coefficient de corrélation de Pearson (r) inférieur à -0,2 (corrélation négative) ou supérieur à 0,2 (corrélation positive) ce qui correspond à une valeur de $p < 0,05$ (pour les 58 degrés de liberté). Il existe donc trois cas de figures:

- Absence de corrélation : le r calculé est proche de zéro. Cela signifie qu'il n'existe pas de lien significatif entre le niveau d'expression du gène et la sensibilité à l'agent testé.
- Corrélation négative : le r calculé est compris entre -0,2 et -1, ce qui signifie que plus le gène est exprimé plus les cellules sont résistantes à l'agent considéré
- Corrélation positive : le r calculé est compris entre 0,2 et 1, ce qui signifie que plus le gène est exprimé plus les cellules sont sensibles à l'agent considéré.

L'exemple de la figure 31 montre deux types de résultats obtenus pour le gène DAD1. Un agent pour lequel les cinq coefficients de corrélations calculés sont proches de zéro, signifiant que l'expression de DAD1 n'est pas corrélée à la sensibilité à ce dérivé du taxol (Fig. 31, panel 2). En revanche les résultats obtenus pour le docétaxel montrent une corrélation significative avec cinq coefficients de corrélations calculés nettement inférieurs à -0,2, indiquant que plus DAD1 est exprimé plus les cellules sont résistantes au docétaxel.

Le problème se pose lorsque les coefficients de corrélations calculés se répartissent autour des valeurs seuils de +0,2 ou -0,2 comme dans l'exemple de la figure 31, panel 3. Dans un tel cas, nous avons choisi, de manière purement arbitraire de ne considérer une corrélation que si au moins la moitié des coefficients de corrélation calculés étaient inférieurs à -0,2 ou

supérieur à + 0,2. Dans le cas de la figure 31, panel 3, nous avons considéré que l'expression du gène DAD1 était corrélée à la sensibilité au brequinar mais pas à celle du chlorambucil.

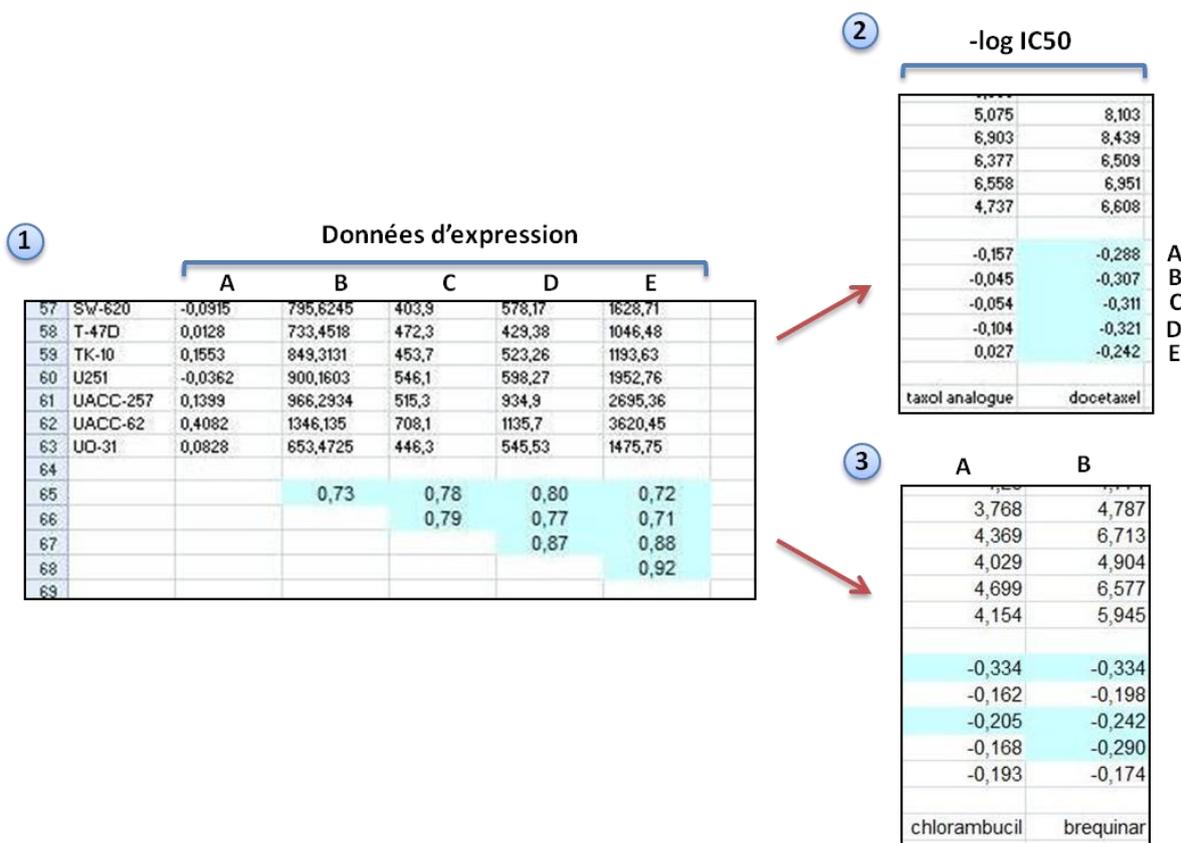


Figure 31 - Exemple de calculs de coefficient de corrélation de Pearson pour le gène DAD1.

Panel 1, colonnes A à E, séries de données d'expression. **Panel 2**, cellules A à E, coefficients de corrélation de Pearson entre les séries de données d'expression de la colonne A, B, C, D et E du panel 1 et la sensibilité au docétaxel, respectivement. **Panel 3**, colonne A et B, coefficients de corrélation de Pearson pour le chlorambucil et le brequinar, respectivement.

D'un point de vue graphique, ces corrélations de Pearson peuvent être visualisées plus facilement sur les nuages de points qui positionnent chaque lignée en fonction du niveau d'expression du gène considéré (en abscisse) et de la sensibilité de la lignée à la drogue d'intérêt exprimée en $-\log$ de l' IC_{50} (en ordonnée) (Fig. 32). La forme du nuage de points est caractéristique de la relation qui peut exister entre les deux variables. Une absence de corrélation se traduit donc par un nuage de points très dispersé (Fig. 32B). En revanche lorsqu'un nuage de point peut être ajusté correctement à une droite linéaire, il est possible

de quantifier l'intensité de la relation entre les deux variables par le calcul du coefficient de Pearson (plus il se rapproche de -1 ou de 1 et plus la relation est forte) ; le signe de ce coefficient (assimilable à la pente de la droite d'ajustement), indiquant le sens de la corrélation. Deux exemples de corrélations significatives sont visualisées sur les deux nuages de points des figures 32A et 32C.

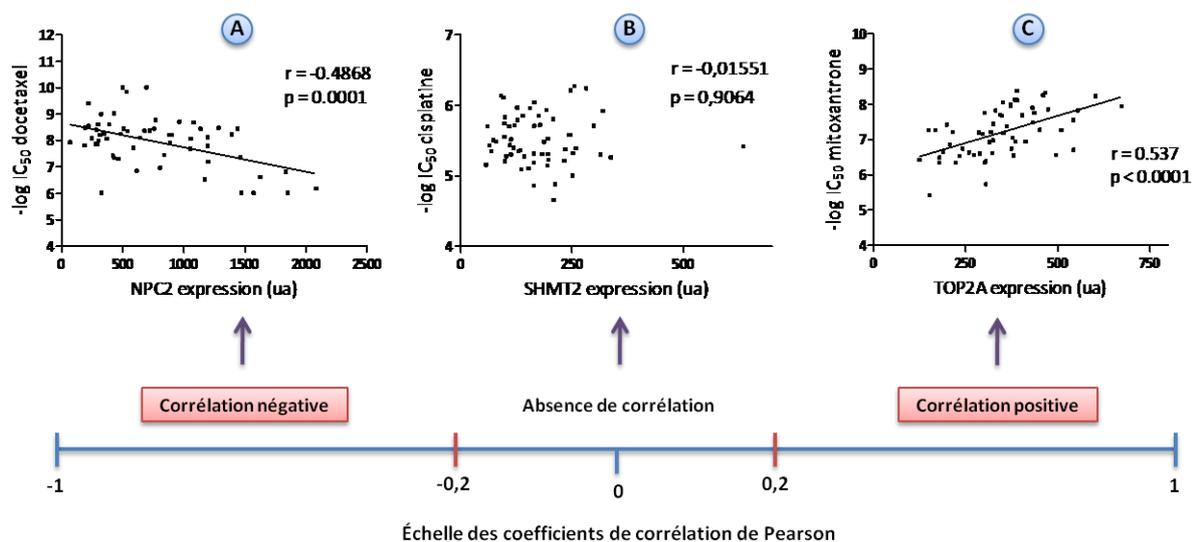


Figure 32 - Représentation graphique des différents types de résultats des tests de corrélations de Pearson obtenus.

Un coefficient de Pearson inférieur à -0,2 ou supérieur à +0,2 est considéré comme significatif, la surexpression du gène étant soit corrélée à une plus grande résistance à l'agent testé (A), soit corrélée à une plus grande sensibilité (C). Un coefficient compris entre -0,2 et 0,2 correspond à une absence de corrélation significative (B).

Pour le gène NPC2 la corrélation négative indique que plus le gène est exprimé plus les cellules sont résistantes au docétaxel (plus la valeur de $-\log IC_{50}$ est faible) (Fig. 32A). A l'inverse la corrélation positive pour le gène TOP2A (Fig. 32C) montre qu'une expression élevée de ce gène est corrélée à une plus forte sensibilité à la mitoxantrone (ce qui est une bonne illustration de la validité de l'approche).

I.6. Récapitulatif des résultats de corrélations obtenus

Le tableau 20 récapitule les résultats de l'approche *in silico*, dans laquelle un coefficient de corrélation de Pearson a été calculé entre chaque expérience d'expression pour chaque

gène et la sensibilité aux 152 agents antiprolifératifs. Les résultats sont classés selon les agents, appartenant aux différents mécanismes d'action, d'après le nombre de couples gène / agent identifiés.

Mécanisme d'action	Nombre d'agent	Nombre de gènes corrélés	Nombre de couples gène / agent	Nbre de couples identifiés / nbre d'agent	Nbre de couples identifiés / nbre de gènes impliqués
AAA7	25	19	102 *	4,1	5,4 ***
T2	20	17	54	2,7	3,2
ITK	8	26	38	4,8 **	1,5 ***
Df	10	14	35	3,5	2,5
Rs	6	16	28	4,7	1,8
AA A2-A6	11	12	33	3,0	2,8
T1	15	7	23	1,5	3,3
TU	23	10	19*	0,8 **	1,9
Ds	8	9	17	2,1	1,9
Di	5	8	13	2,6	1,6
Db	5	5	7	1,4	1,4
Uk	3	6	6	2,0	1,0
Dr	3	2	4	1,3	2,0
mTi	8	2	2	0,3	1,0
P90	1	1	1	1,0	1,0
Pi	1	0	0	0,0	0,0
Total	152	154	382		
Moyenne				2,2	2,0

Tableau 20 - Récapitulatif des couples gène / agent identifiés par l'analyse *in silico* ($p < 0,05$).

Le tableau 20 donne une première idée chiffrée sur les résultats de l'approche *in silico*. Les résultats sont classés par catégorie d'agents selon leurs mécanismes d'action. Le nombre de corrélations dépend directement du seuil de significativité. Il est donc important de choisir ce seuil de manière à ce que la chance de se tromper soit faible mais de ne pas trop réduire ce risque, ce qui aurait pour conséquence de diminuer fortement le nombre de corrélations à étudier par la suite. Au seuil de $p < 0,05$ que nous nous sommes fixé, notre approche a permis d'identifier 382 corrélations significatives entre le niveau d'expression d'un gène et la sensibilité à un agent. Ce nombre est réduit à un tiers (116 corrélations) lorsque on se fixe un seuil de $p < 0,01$ correspondant à un coefficient de Pearson $< -0,3$ ou $> + 0,3$.

Globalement, plus il y a d'agents dans une catégorie, plus on trouve de corrélations. Néanmoins quelques exceptions sont notées avec les poisons des microtubules (TU) pour lequel seulement 19 corrélations sont retrouvées (Tableau 20 *). A l'inverse on retrouve une proportion très importante de corrélation pour le groupe des ITK qui possèdent seulement 8 représentants (Tableau 20 **). Cela traduit très probablement le fait que le mécanisme d'action de certains agents n'est pas spécifique d'un gène en particulier mais semble plutôt

impliquer de multiples voies alors que d'autres agents ont un mécanisme d'action plus ciblé faisant probablement intervenir un nombre plus restreint de gènes, ce que nous avons tenté de «visualiser » dans les deux dernières colonnes du tableau 20. Dans le groupe des ITK, par exemple, on retrouve 38 corrélations avec 26 gènes, ce qui donne un rapport de 1,5 (Tableau 20 ***) signifiant que les mécanismes d'action des agents de cette catégorie font probablement intervenir des gènes différents en fonction de l'agent considéré. A l'inverse, dans le groupe des agents alkylants AA A7, nous avons identifié 102 corrélations mais pour seulement 19 gènes différents, donnant un rapport de 5,4 (Tableau 20 ***) suggérant cette fois que les gènes impliqués sont communs aux mécanismes d'action de plusieurs agents.

Le tableau 21 présente la liste détaillée des gènes et des agents cytotoxiques concernés par les corrélations obtenues. Pour chaque agent, les gènes sont classés par ordre alphabétique. Cela permet de visualiser les gènes redondants dans une classe d'agent.

Mécanisme d'action	Agent antiprolifératif	Numéro NSC	Gènes dont le niveau d'expression est corrélé avec la sensibilité à l'agent testé
AA A2-A6	Mitomycin	26980	HMGB1, PRDX5
	Porfiromycin	56410	HMGB1, PRDX5
	Carmustine	409962	EIF4A1, FTH1, HIRIP3, HMGB1, LTBR, NPC2, PRDX5
	Chlorozotocin	178248	FLJ35093, FTH1, PRDX5
	Clomesone	338947	PRDX5
	Irofulven	683863	ATP5G3, HIRIP3, NEDD5, RHOT2
	Lomustine	683863	EIF4A1, FTH1, RHOT2
	Mitozolamide	79037	HMGB1, PRDX5
	PONU	353451	FTH1, LTBR, PRDX5
	Semustine	95466	FTH1, ERBB2, HMGB1, PRDX5
Trabectadin	648766	HMGB1, NEDD5	
AA A7	Asaley	167780	FTH1, HMGB1, PCCB
	Busulfan	750	EIF4A1, HMGB1
	Carboplatin	241240	AZGP1, HMGB1, PRDX5, RAB6A, TMPRSS2
	Chlorambucil	3088	FLJ35093, FTH1, HMGB1, PRDX5
	Cisplatin	119875	AZGP1, HMGB1, PRDX5, RAB6A, TMPRSS2
	Cyclophosphamide	348948	HMGB1, PRDX5
	Diaminocyclohexylplatine II	271674	FLJ35093, HMGB1, PCCB, SHMT2
	Dianhydrogalactitol	132313	EIF4A1, HMGB1, FLJ35093
	Diaziridinylbenzoquinone	182986	HMGB1, NPC2
	Fluorodopan	73754	CPE, EIF4A1, HIRIP3, HMGB1, FTH1
	Hepsulfam	329680	FLJ35093, HMGB1
	Iproplatin	256927	ATP5G3, CD59, CPE, HIRIP3, HMGB1, JUN, RHOT2
	Mechlorethamine	762	CD59, CPE, FLJ35093, HIRIP3, HMGB1
	Melphalan	8806	EIF4A1, FLJ35093, HIRIP3, HMGB1
	Oxaliplatin	266046	ATP5G3, CD59, CDKN2C, DPM1, EIF4A1, FLJ35093, HMGB1, JUN, PCCB, RHOT2, RPL13, SHMT2
	Piperazine mustard	344007	FLJ35093, HMGB1, PRDX5, RAB6A
	Piperazine dione	135758	FLJ35093, HMGB1
	pipobroman	25154	EIF4A1, HMGB1, HIRIP3
	Spiromustine	172112	CPE, FTH1, HMGB1
	Teroxirone	296934	EIF4A1, FLJ35093, HIRIP3, HMGB1, PRDX5
Tetraplatin	363812	ATP5G3, CD59, EIF4A1, FLJ35093, HMGB1, JUN, PCCB, RPL13, SHMT2	
Thiotepa	6396	FLJ35093, HMGB1, PRDX5	
Triethylenemelamine	9706	FLJ35093, HMGB1, PRDX5	
Uracil mustard	34462	FLJ35093, FTH1, HMGB1, PRDX5	
Yoshi 864	102627	FLJ35093, HMGB1	
T1	Camptothecin	94600	FLJ35093
	Camptothecin, 7Cl	249910	FLJ35093
	Camptothecin, 9MeO	176323	DAB2IP
	Camptothecin, 9-NH2 RS	629971	FLJ35093
	Camptothecin, 9NH2 (S)	603071	FLJ35093
	Camptothecin, 10 OH	107124	VBP1
	Camptothecin, 11formyl	606172	EIF4A1, FLJ35093, HIRIP3, LTBR
	Camptothecin, 11HOMe	606173	EIF4A1, HIRIP3, LTBR, VBP1
	Camptothecin, 20 ester	606497	FLJ35093
	Irinotecan	616348	FLJ35093
	SN38	673596	VBP1
	Topotecan	609699	FLJ35093
	Rebeccamycin	359079	EIF4A1, HIRIP3, VBP1
	6 N-Diethylaminoethyl BM Y 27557, BMS-181176	640199 655649	CD59, VBP1 -
T2	Amonafide	308847	FLJ35093, PRPS1, RPL13, SHMT2
	Amsacrine	249992	FLJ35093, PRPS1, TOP2A
	Anthrapyrazole derivative	355644	PRPS1, TOP2A
	Bisantrene	337766	SEC14L1
	Daunorubicin	82151	NPC2, VBP1
	Daunorubicinol	180510	FTH1, PRPS1, LTBR,
	Deoxydoxorubicin	267469	RPL13, SEC14L1
	Doxorubicin	123127	VBP1
	Ellipticine	71795	C20orf45, CD59, NEDD5, PRKAR1A
	Etoposide	141540	EIF4A1, PRPS1
	Idarubicin	256439	CD59, FLJ35093, HIRIP3, TOP2A
	Iodo-doxorubicin	378901	-
	Menogaril	269148	FLJ35093, TOP2A
	9-Methoxyellipticine	69187	C20orf45, CD59, DNCL1, HIRIP3, HSPC152, NEDD5, NPC2, PRKAR1A, PSAP, RPL13
	Mitoxantrone	301739	PRPS1, TOP2A, VBP1
	NMH-ellipticine	264137	LTBR, TOP2A
Piroxantrone	349174	PRPS1, TOP2A, VBP1	
Teniposide	122819	FLJ35093, TOP2A	
Zorubicine	164011	-	
Aclarubicine	208734	C20orf45, SHMT2	
Db	Cyano-doxorubicin	357704	NDUFB3
	Hycanthone	142982	-
	Morpholino-doxorubicin	354646	NDUFB3

Tableau 21 - Résultats détaillés des corrélations gène/agent antiprolifératif identifiés par l'approche *in silico* – partie 1.

Les gènes sont classés par ordre alphabétique et les agents sont classés par catégorie de mécanisme d'action.

Mécanisme d'action	Agent antiprolifératif	Numéro NSC	Gènes dont le niveau d'expression est corrélé avec la sensibilité à l'agent testé
Db	N,N-dibenzyl-daunorubicin	268242	EIF4A1, HIRIP3, RPL13, SHMT2
	Pyrazoloacridine	366140	HIRIP3
Di	5-6-dihydro-5-azacytidine	264880	SEC14L1
	É\`-2'-deoxythioguanosine	71851	ATP5B, CPE, FLJ35093, HIRIP3, NEDD5, PC4
	Azacytidine	102816	NEDD5, SHMT2
	Thioguanine	752	CPE, FLJ35093, NEDD5, PC4
Dr	Guanazole	1895	FLJ35093
	Hydroxyurea	32065	FLJ35093, RPL13
	Pyrazoloimidazole	51143	RPL13
Ds	Aphidicolin-glycinate	303812	FLJ35093
	Cycloctidine	145668	EIF4A1, FLJ35093, RPL13
	Cytarabine	63878	EIF4A1, FLJ35093, RPL13
	Floxuridine	27640	NPC2
	Fluorouracil	18893	ATP5G3, C20orf45, CD59, FLJ35093
	Ftorafur	148958	SEPHS2
	Gemcitabine	613327	FLJ35093, RPL13
	Thiopurine	755	NEDD5, PC4
Rs	Acivicin	163501	ATP5B, FLJ35093, NPC2, JUN
	Lawsonia	126771	ATP5B, ATP5G3, HIRIP3, PSMB1, SHMT2
	Brequinar	368390	ATP5G3, CD59, HIRIP3, NPC2, SHMT2
	L-alanosine	153353	DAD1, EIF4A1
	N-phosphonoacetyl-L-	224131	ATP5G3, EIF4A1
	Pyrazofurine	143095	CD59, FLJ35093, FTH1, HIRIP3, HSPC152, NPC2, PC4, PRKAR1A, PSAP, PSMB1, RPL13
Df	Aminoptérine	132483	ATP5B, EIF4A1, NPC2, RPL13
	Aminoptérine derivative	134033	EIF4A1
	Aminoptérine derivative	184692	ATP5B, EIF4A1
	An antifol	623017	CD59, FLJ35093, JUN, NPC2, RPL13
	Baker's antifolate	139105	ATP5B, ATP5G3, EIF4A1, JUN, NPC2
	Methotrexate	740	EIF4A1, FLJ35093, HIRIP3, NPC2
	Methotrexate-derivative	174121	C20orf45, FLJ35093, HIRIP3, NPC2, PCCB, PSAP, PSMB1, RHOT2, RPL13
	Trimetrexate	352122	FLJ35093, NPC2
	Raltitrexed	639186	-
	Pemetrexed	698037	CD59, EIF4A1, NPC2
	TU	Colchicine	757
Colchicine-derivative		33410	-
Dolastatine 10		376128	C20orf45
Halichondrin B		609395	NEDD5
Maytensine		153858	-
Trityl-cysteine		83265	NPC2, SEC14L1
Vinblastine		49842	SEC14L1
Vincristine		67574	-
Paclitaxel		125973	C14orf87, NPC2, SEC14L1
Taxol analogue		600222	ATP5G3, C14orf87, DNCL1, JUN, NPC2, RAB6A, SEC14L1, SERP1
Docetaxel		628503	C14orf87, NPC2, RAB6A
P90	Geldanamycin	330500	SLMO2
Uk	Thiosemicarbazone	107392	DAB2IP
	Inosine-glycolaldehyde	118994	CD59, HIRIP3, JUN, SEPHS2, SERP1
Pi	L-asparaginase	109229	-
mTi	Rapamycine (sirolimus)	226080	DPP4, JUN
	Rapamycine analog	606698	-
	Rapamycine analog	606699	-
	temsirolimus	683864	-
ITK	Erlotinib	718781	AIDA, FEN1, HSD17B4
	Dasatinib	732517	AIDA, ATP5B, ATP5G3, ATP6V1F, EIF4A1, HMGB1, JUN, PCCB, SPC12
	Imatinib	716051	ATP5G3, FEN1
	Lapatinib	727989	DPP4, ERBB2, HIC1, PRDX5, RHOA, VBP1
	Nilotinib	-	ATP5G3, ATP6V1F, DAD1, JUN, PCCB, PSMB1, SEPHS2
	Gefitinib	715055	FEN1, LTBR, PRDX5, VBP1
	Sunitinib	736511	ATP5B, ATP5G3, HMGB1, PGK1, SLMO2, TMPRSS2
	Sorafenib	724772	HSD17B4

Tableau 22 – Suite du tableau 21

Dans le tableau 23, les agents pour lesquels nous avons identifié des corrélations sont classés selon les gènes impliqués, ceux-ci étant regroupés par voie cellulaire dans laquelle ils jouent un rôle.

Voie cellulaire	Nom du gène	Agents pour lesquels le niveau d'expression du gène module la sensibilité
Métabo - sucre	PGK1	ITK , Sunitinib.
	PRPS1	T2 , Amonafide-Amsacrine-Anthrapyrazole derivative-Idarubicin-Daunorubicinol-Etoposide-Mitoxantrone-Piroxantrone.
	DPM1	AA A7 , Oxaliplatin.
Métabo - énergie	ATP5B	Di , 5'-deoxythioguanosine; Rs , Acivicin-Lawsone; Df , Aminoptérine-Aminoptérine derivative-Baker's antifolate; ITK , Dasatinib-Sunitinib.
	ATP5G3	AA A2-A6 , Irofulven AA A7 , Iproplatin-Oxaliplatin-Tetraplatin; Ds , Fluorouracil; Rs , Lawsone-Brequinar-N-phosphonoacetyl-L-aspartate; Df , Baker's antifolate; TU , Taxol analogue; ITK , Dasatinib-Imatinib-Nilotinib-Sunitinib.
	NDUF3	Db , Cyano doxorubicin-Morpholino doxorubicin.
	ATP6V1F	ITK , Dasatinib-Nilotinib.
	PRDX5	AA A2-A6 , Mitomycin-Porfiromycin-Carmustine-Chlorozotocin-Clomesone-Mitozolamide-PCNU-Semustin; AA A7 , Carboplatin-Chlorambucil-Cisplatin-Cyclodisone-Piperazine-mustard-Teroxisone-Thiotepa-Triethylenemelamine-Uracil-mustard; ITK , Lapatinib-Gefitinib.
Métabo - lipides	HSD17B4	ITK , Erlotinib-Sorafenib.
	NPC2	AA A2-A6 , Carmustine; AA A7 , Mechlorethamine; T2 , Daunorubicin-9Methoxyellipticine; Ds , Floxuridine; Rs , Acivicin-Brequinar-Pyrazofurine; Df , Aminoptérine-An antifol-Baker's antifolate-Methotrexate-Methotrexate-derivative-Trimetrexate-Pemetrexed; TU , Trityl-cystéine-Paclitaxel-Taxol analogue-Docetaxel.
	PSAP	T2 , 9-Methoxyellipticine; Rs , Pyrazofurine; Df , Methotrexate-derivative.
Métabo - protéines	SHMT2	AA A7 , Diaminocyclohexylplatine II-Oxaliplatin-Tetraplatin; T2 , Amonafide-Aclarubicine; Db , N,N-dibenzyl-daunorubicin; Di , Azacytidine; Rs , Lawsone-Brequinar.
	TMPRSS2	AA A7 , Carboplatin-Cisplatin; ITK , Sunitinib.
	SPC12	ITK , Dasatinib.
	PSMB1	Rs , Lawsone-Pyrazofurine; Df , Methotrexate derivative; ITK , Nilotinib.
	PCCB	AA A7 , Asaley-Diaminocyclohexylplatine II-Oxaliplatin-Tetraplatin; Df , Methotrexate derivative; ITK , Dasatinib-Nilotinib.
	SEPHS2	Ds , Ftorafur; Uk , Inosine glycodialdehyde, ITK , Nilotinib.
	CPE	AA A7 , Fluorodopan-Iproplatin-Mechlorethamine-Spiromustine; Di , 5'-deoxythioguanosine-Thioguanine.
	DPP4	mTi , Rapamycine (sirolimus); ITK , Lapatinib.
Prolif - Diff - Apoptose	CDKN2C	AA A7 , Oxaliplatin.
	FTH1	AA A2-A6 , Carmustine-Chlorozotocin-Lomustine-PCNU-Semustin; AA A7 , Asaley-Chlorambucil-Fluorodopan-Spiromustine-Uracil-mustard; T2 , Daunorubicinol; Rs , Pyrazofurine.
	DAD1	ITK , Nilotinib; Rs , Brequinar
	NEDD5	AA A2-A6 , Irofulven-Trabectedin; T2 , Ellipticine-9Methoxyellipticine; Di , 5'-deoxythioguanosine-Azacytidine-Thioguanine; Ds , Thiopurine; TU , Halichondrin B.
	LTBR	AA A2-A6 , Carmustine-PCNU; T1 , Camptothecin, 11 formyl-Camptothecin, 11HOME; T2 , Daunorubicinol-NMHellipticine; ITK , Gefitinib.
	AZGP1	AA A7 , Carboplatin-Cisplatin.

Tableau 23 - Liste des gènes dont le niveau d'expression est retrouvé corrélé à la sensibilité de l'agent considéré par l'approche in silico – partie 1.

Les agents sont classés selon leur mécanisme d'action.

Voie cellulaire	Nom du gène	Agents pour lesquels le niveau d'expression du gène module la sensibilité
Transduction du signal	RAB6A	AA A7 , Carboplatin-Cisplatine-Piperazine mustard; TU , Taxol analogue-Docetaxel.
	RHOT2	AA A2-A6 , Irofulven-Lomustine; AA A7 , Iproplatin-Oxaliplatin; Df , Methotrexate derivative.
	RHOA	ITK , Lapatinib.
	PRKAR1A	T2 , Ellipticine-9-Methoxyellipticine; Rs , Pyrazofurine.
	JUN	AA A7 , Iproplatin-Oxaliplatin-Tetraplatin; Rs , Acivicin; Df , An antifol-Baker's antifolate; TU , Taxol analogue; Uk , Inosine glycodialdehyde; mTi , Rapamycin (sirolimus).
	CD59	AA A7 , Iproplatin-Mechlorethamine-Oxaliplatin-Tetraplatin; T1 , 6 N-Diethylaminoethyl; T2 , Ellipticine-Idarubicin-9Methoxyellipticine; Ds , Fluorouracil; Rs , Brequinar-Pyrazofurine; Df , An antifol-Premetrexed; Uk , Inosine glycodialdehyde.
Struture - Adésion - Mobilité	DNCL1	T2 , 9-Methoxyellipticine; TU , Taxol analogue.
Régulation de la transcription	HIRIP3	AA A2-A6 , Irofulven; AA A7 , Asaley-Fluorodopan-Iproplatin-Mechlorethamine-Melphalan-Pipobroman-Teroxirone; T1 , Camptothecin, 11 formyl-Camptothecin, 11HOME-Rebeccamycin; T2 , Idarubicin-9Methoxyellipticine; Db , N,N-dibenzyl-daunorubicin-Py; Di , £\2'-deoxythioguanosine; Rs , Lawsone-Brequinar-Pyrazofurine; Df , Methotrexate-derivative; Uk Inosine-glycodialdehyde.
	PC4	Di , £\2'-deoxythioguanosine-Thioguanine; Ds , Thiopurine; Rs , Pyrazofurine.
	HMGB1	AA A2-A6 , Mitomycin-Porfiromycin- Carmustine- Mitozolamide-Semustine-Trabectadin; AA A7 , Asaley-Busulfan-Carboplatin-Chlorambucil-Cisplatine-Cyclodisone-Diaminocyclohexylplatine II-Dianhidrogalactitol-Diaziridinylbenzoquinone-Fluorodopan-Hepsulfam-Iproplatin-Mechlorethamine-Melphalan-Oxaliplatin-Piperazine mustard-Piperazine dione-pipobroman-Spiromustine-Teroxirone-Tetraplatin-Thiotepa-Triethylenemelamine-Uracil mustard-Yoshi 864; ITK , Dasatinib-Sunitinib.
Traduction - Synthèse protéique	SERP1	TU , Taxol analogue; Uk , Inosine-glycodialdehyde.
	EIF4A1	AA A2-A6 , Carmustine-Lomustine; AA A7 , Busulfan-Dianhidrogalactitol-Fluorodopan-Melphalan-Oxaliplatin-Pipobroman-Tetraplatin; T1 , Camptothecin, 11 formyl-Camptothecin, 11HOME-Rebeccamycin; T2 , Etoposide; Db , N,N-dibenzyl-daunorubicin; Ds , Cycloctidine-Cytarabine; Rs , L-alanosine-N-phosphonoacetyl-L-; Df , Aminoptérine-Aminoptérine derivative-Baker's antifolate-Pemetrexed; ITK , Dasatinib.
	VBP1	T1 , Camptothecin, 10 OH-Camptothecin, 11HOME-SN38-Rebeccamycin-6 N-Diethylaminoethyl; T2 , Daunorubicin-Doxorubicin-Mitoxantrone-Piroxantrone; ITK , Lapatinib-Gefitinib.
	RPL13	AA A7 , Oxaliplatin-Tetraplatin; T2 , Amonafide-Deoxydoxorubicin-9Methoxyellipticine; Db , N,N-dibenzyl-daunorubicin; Dr , Hydroxyurea-Pyrazoloimidazole; Ds , Cycloctidine-Cytarabine-Gemcitabine; Rs , Pyrazofurine; Df , Aminoptérine-An antifol-Methotrexate-derivative.
Transport	SEC14L1	T2 , Bisantrene-Deoxydoxorubicin; Di , 5-6-dihydro-5-azacytidine; TU , Trityl-cysteine-Vinblastine-Paclitaxel-Taxol analogue.
Autre - Inconnus	FLJ12806 AIDA	ITK , Erlotinib-Dasatinib.
	FLJ35093	AA A2-A6 , Chlorozotocin; AA A7 , Chlorambucil-Diaminocyclohexylplatine II-Dianhidrogalactitol-Hepsulfam-Melphalan-Oxaliplatin-Piperazine mustard-Piperazine dione-Teroxirone-Tetraplatin-Thiotepa-Triethylenemelamine-Uracil mustard-Yoshi 864; T1 , Camptothecin-Camptothecin, 7Cl-Camptothecin, 9-NH2 RS-Camptothecin, 9NH2 (S)-Camptothecin, 11 formyl-Camptothecin, 20 ester-Irinotecan-Topotecan; T2 , Amonafide-Amsacrine-Idarubicin-Menogaril-Teniposide; Di , £\2'-deoxythioguanosine-Thioguanine; Dr , Guanazole-Hydroxyurea; Ds , Aphidicolin-glycinate-Cycloctidine-Cytarabine-Fluorouracil-Gemcitabine; Rs , Acivicin-Pyrazofurine; Df , An antifol-Methotrexate-Methotrexate derivative-Trimetrexate.
	HSPC152	T2 , 9-Methoxyellipticine; Rs , Pyrazofurine.
	C20orf45	T2 , Ellipticine-9Methoxyellipticine-Aclarubicine; Ds , Fluorouracil; Df , Methotrexate derivative;
	SLMO2	TU , Dolastatine 10; P90 , Geldanamycin; ITK , Sunitinib.
	C14orf87	TU , Paclitaxel-Taxol analogue-Docetaxel.
	ERBB2	AA A2-A6 , Semustine; ITK , Lapatinib.
	DAB2IP	T1 , Camptothecin, 9MeO; Uk , Thiosemicarbazone.
	TOP2A	T2 , Amsacrine-Anthrapyrazole derivative-Idarubicin-Menogaril-Mitoxantrone-NMH-ellipticine-Piroxantrone-Teniposide.
	FEN1	ITK , Erlotinib-Imatinib-Gefitinib.

Tableau 24 - Suite du tableau 23.

Ces tableaux permettent de mieux se rendre compte de la nature des corrélations obtenues. Comme nous l'avons évoqué précédemment, on retrouve des gènes dont l'expression est corrélée avec un ou deux agents antiprolifératifs (cas de *PGK1*, *DPM1*, *NDUFB3*, *ATP6V1F*, *HSD17B4*, *SPC12*, *DPP4*, *CDKN2C*, *DAD1*, *AZGP1*, *RHOA*, *DNCL1*, *SERP1*, *FLJ12806*, *HSPC152*, *ERBB2*, *DAB2IP* et *FEN1*). Pour ce qui concernent les autres gènes, on peut distinguer deux groupes : ceux dont les corrélations n'impliquent qu'une seule classe d'agent et ceux impliquant plusieurs classes d'agents antiprolifératifs. Les gènes n'impliquant qu'une seule classe d'agents sont rares et comprennent seulement les gènes *PRPS1* et *TOP2A*, dont le niveau d'expression n'est corrélé qu'avec la sensibilité aux inhibiteurs des ADN topoisomérase 2. Cela n'est pas étonnant pour le gène *TOP2A* car il est la cible privilégiée de ce type d'agent. Dans le deuxième groupe on trouve les gènes *ATP5B*, *SHMT2*, *PSMB1*, *PCCB*, *SEPHS2*, *CPE*, *FTH1*, *NEDD5*, *LTBR*, *RAB6A*, *RHOT2*, *PRKAR1A*, *JUN*, *PC4*, *HMGB1*, *VBP1*, *SEC14L1*, et *C20orf45* qui sont corrélés avec plusieurs agents anticancéreux appartenant à plusieurs classes de mécanisme d'action, et les gènes *ATP5G3*, *PRDX5*, *NPC2*, *CD59*, *HIRIP3*, *EIF4A1*, *RPL13*, et *FLJ35093* pour qui les corrélations impliquent un très grand nombre d'agents soulignant une certaine « aspécificité » des voies dans lesquelles ils jouent un rôle.

De façon surprenante, les inhibiteurs de tyrosine-kinase est la seule classe d'agent à présenter des corrélations avec les gènes *ATP5B*, *ATP5G3* et *ATP6V1F*, codant tous les trois des sous-unités de l'ATP synthase.

1.7. La signature spécifique des platines

Etant donné le grand nombre de corrélations identifiées par l'approche *in silico*, il est évident qu'un choix s'imposait quand à la sélection des corrélations à valider dans l'étape de confirmation *in vitro*. Ce choix s'est porté, assez naturellement, sur des agents dont l'utilisation clinique est déjà approuvée pour d'autres indications, ce qui rend plus facile leur éventuelle utilisation comme alternative thérapeutique aux taxanes. Nous nous sommes intéressés en priorité aux dérivés du platine en remarquant une certaine « sélectivité » dans les corrélations obtenues (Tableau 25). En effet, 4 gènes sont uniquement corrélés avec le cisplatine et le carboplatine alors que d'autres sont corrélés uniquement avec l'ipropatine (5 gènes), l'oxaliplatine (12 gènes) et le tétraplatine (9 gènes). Entre ces deux groupes, aucun gène n'est retrouvé en commun à l'exception du gène *HMGB1*, dont le niveau d'expression est corrélé avec la sensibilité des cinq dérivés du platine (Tableau 25).

Gène	Nom complet	Carboplatine *	Cisplatine *	Iproplatine	Oxaliplatine**	Tétraplatine**
PRDX5	Peroxiredoxin 5	X	X			
RAB6A	RAB6A, member RAS oncogene family	X	X			
TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2	X	X			
AZGP1	Alpha-2 glycoprotein 1 zinc	X	X			
HIRIP3	HIRA interacting protein 3			X		
CPE	Carboxypeptidase E			X		
RHOT2	Ras homolog gene family member T2				X	
DPM1	Dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1 catalytic subunit				X	
CDKN2C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C				X	
CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein			X	X	X
ATP5G3	ATP synthase H+ transporting mitochondrial F0 complex subunit c isoform 3			X	X	X
JUN	V-jun sarcoma virus 17 oncogen homolog			X	X	X
RPL13	Ribosomal protein L13				X	X
FLJ35093	"FAM73A" family with sequence similarity 73, member A				X	X
PCCB	Propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide				X	X
SHMT2	Serine HydroxyMethyl Transferase 2				X	X
EIF4A1	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1				X	X
HMGB1	High-mobility group box 1	X	X	X	X	X

Tableau 25 - Liste des gènes corrélés avec les dérivés des sels de platine.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le cisplatine et le carboplatine sont des platines dits « classiques », alors que le tétraplatine et l'oxaliplatine font partie de la nouvelle génération des DACH-platines. L'oxaliplatine possède un radical oxalate qui est en fait un double groupement acide carboxylique qui n'est pas présent sur le tétraplatine. L'iproplatine est un dérivé de structure intermédiaire qui n'a pas fait l'objet d'études cliniques poussées. Cette spécificité de signature est d'autant plus intéressante que le spectre d'activité des platines classiques et des DACH-platines est différent aussi bien en termes d'efficacité de liaison à l'ADN qu'en termes de mécanisme de reconnaissance de ces liaisons par les systèmes de réparations de l'ADN (Burchenal *et al.* 1980; Micetich *et al.* 1985; Jennerwein *et al.* 1989), ces propriétés étant vraisemblablement liées à la nature chimique de ces dérivés.

Nous avons donc décidé de valider au niveau fonctionnel les résultats *in silico* obtenus pour 9 des 11 gènes dont l'expression était spécifiquement corrélée à la sensibilité à l'oxaliplatine (au seuil considéré). Nous avons exclu de l'étude le gène *ATP5G3* très peu étudié chez l'homme ainsi que le gène inconnu *FLJ35093* faisant simplement référence à un cadre ouvert de lecture (*orf*). Nous avons également exclu le gène *HMGB1* de l'analyse étant donné que son expression est corrélée à l'ensemble des dérivés du platine.

II. VALIDATION FONCTIONNELLE IN VITRO

II.1. Caractérisation des lignées

Afin de valider fonctionnellement les corrélations identifiées par l'approche *in silico*, nous avons utilisé des lignées cellulaires d'origine prostatiques, décrites précédemment. Nous avons choisi des lignées cancéreuses qui soient le « plus représentatives possibles » d'un cancer de la prostate de haut grade. Les lignées DU145 et LNCaP, d'origine métastatique, sont des lignées très utilisées pour l'étude de ce type de cancers. Elles sont de surcroît, très bien caractérisées au niveau génétique et représentent donc un excellent modèle d'étude. La lignée BPH, issue de l'immortalisation de cellules provenant d'une hyperplasie bénigne de la prostate, constitue la lignée contrôle non cancéreuse pour nos expériences. Afin de s'assurer que ces lignées cancéreuses possèdent un profil d'expression génique relativement similaire à celui des cellules de cancers de la prostate de haut grade tel qu'il a été déterminé par l'étude de True *et al.*, nous avons comparé le niveau d'expression basal des 9 gènes dans les lignées DU145 et LNCaP par rapport à la lignée contrôle BPH. Les résultats sont présentés figure 33.

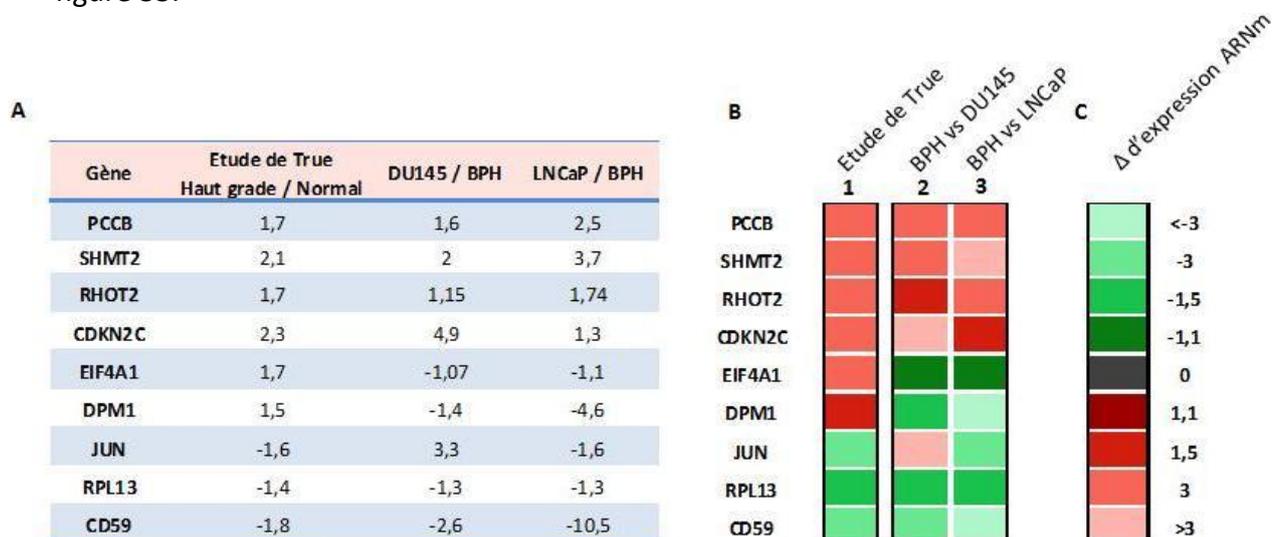


Figure 33 – (A) Mesure des profils d'expression des 9 gènes corrélés à l'oxaliplatine dans les lignées DU145 et LNCaP par rapport à la lignée BPH et (B) comparaison de ces profils avec le profil d'expression des mêmes gènes de l'étude de True *et al.* par le code couleur utilisé dans les expériences de *microarray* (C).

La figure 33A présente pour chacun des 9 gènes, la comparaison entre le niveau d'expression basale du gène dans le tissu « normal » et le niveau d'expression du gène dans le tissu

« tumoral » sachant que pour les lignées DU145 et LNCaP, nous avons pris la lignée BPH comme « tissu normal » de référence. Les résultats sont exprimés en variation du niveau d'expression de l'ARNm déterminé par qRT-PCR (ou *fold change*). La figure 33B est une représentation visuelle, empruntant les codes couleurs utilisés dans les études *microarray*, des résultats présentés dans le panel A. Globalement, les résultats montrent de façon satisfaisante, que le profil d'expression de ces gènes dans les lignées est similaire à celui retrouvé dans les tumeurs de hauts grades utilisés dans l'étude de True *et al.* les seules différences notoires concernant les gènes *EIF4A1* et *DPM1*, différences pouvant être liées au choix de la lignée BPH comme « contrôle ».

Nous avons donc décidé de passer à l'étape de validation fonctionnelle pour ces 9 gènes dans ces trois lignées en testant, pour chacune, l'effet de la répression de ces gènes sur la sensibilité à l'oxaliplatine et au cisplatine (utilisé comme contrôle négatif de validation).

II.2. Résultats préliminaires des tests de clonogénicité sur le gène SHMT2

Initialement, nous avons décidé d'utiliser le test de clonogénicité pour vérifier l'effet de la répression des gènes sur la sensibilité à l'oxaliplatine et au cisplatine et de contrôler l'efficacité des ARN interférents au niveau protéique par *Western blotting*. Nous avons rapidement obtenus des résultats concluants pour le gène *SHMT2* (Fig. 34). Ces résultats proviennent de deux expériences indépendantes (chaque concentration étant testée en triplicate). Les IC_{50} ont été déterminées par extrapolation des courbes de cytotoxicité et exprimées sous forme de ratio ΔIC_{50} (= IC_{50} de la lignée transfectée par les siRNA *SHMT2*/ IC_{50} de la lignée transfectée par le si RNA contrôle) (Tableau 26).

Les Western blot confirment que dans chaque cas, la transfection des cellules par le siRNA *SHMT2* ai bien entraîné une réduction significative du niveau de protéine cible par rapport aux cellules transfectées par le siRNA contrôle (entre 60 et 80 % de réduction) (Fig. 34).

Les résultats de clonogénie obtenus pour le gène *SHMT2* sont présentés figure 34.

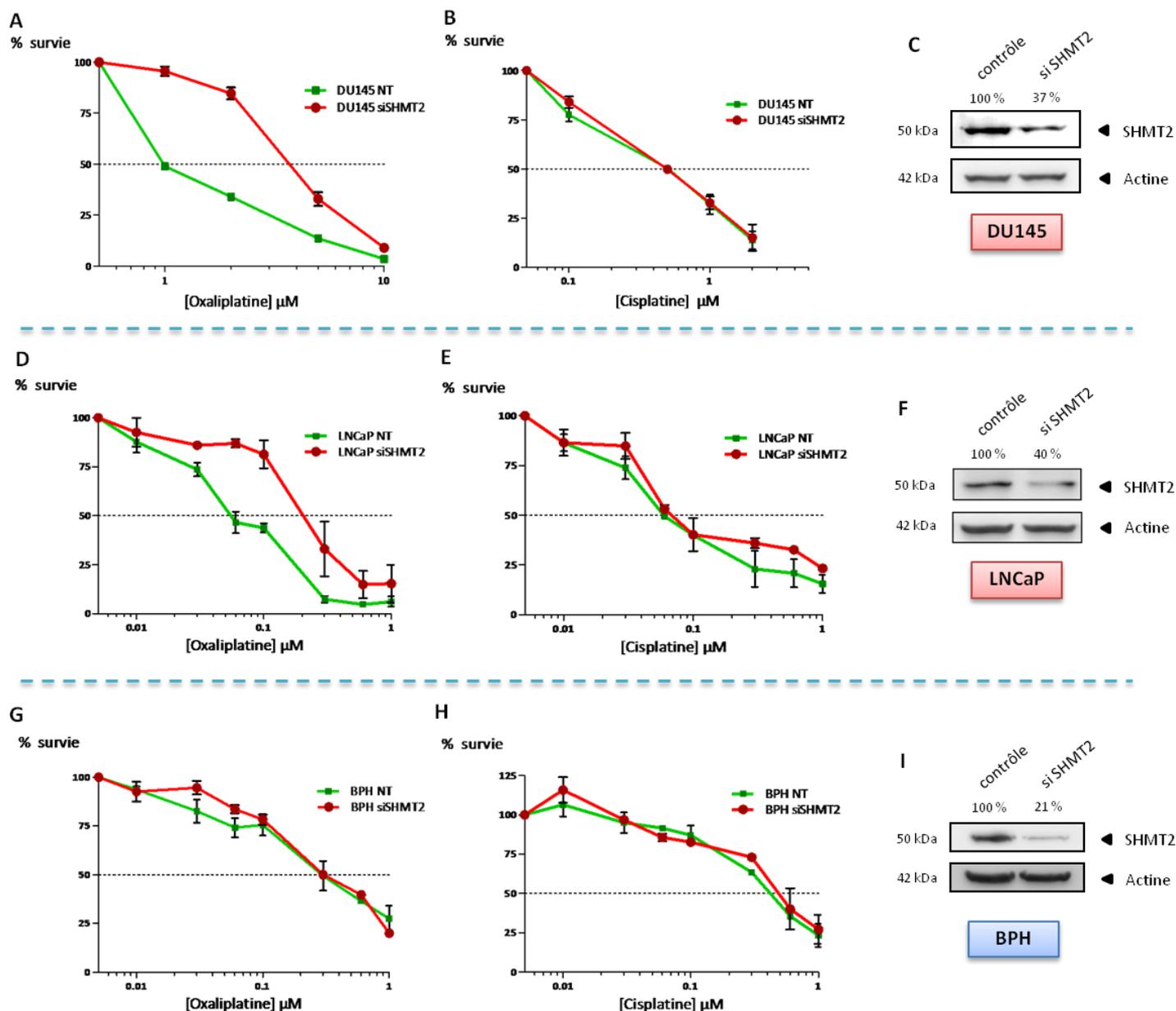


Figure 34 - Impact de la sous-expression du gène *SHMT2* sur la sensibilité aux platines dans les 3 lignées.

A-D-G, résultats des tests de clonogénicité sur les lignées DU145, LNCaP et BPH, traitées à l'oxaliplatine ou au cisplatine (*B-E-H*). *C-F-I*, Western blots de contrôle de la réduction du niveau d'expression du gène *SHMT2* dans les lignées DU145, LNCaP et BPH, respectivement.

Au niveau fonctionnel, la diminution du niveau de *SHMT2* confère donc aux cellules DU145 et LNCaP une résistance à l'oxaliplatine (Fig. 34A et D). Ces résultats vont dans le sens indiqué par l'analyse *in silico*, qui montrait qu'une forte expression du gène était corrélée à

une sensibilité à l'oxaliplatine. L'analyse *in silico* n'avait pas révélé de corrélation pour le cisplatine ce qui est également confirmé par le fait que le siRNA anti-SHMT2 n'a pas d'effet sur la sensibilité au cisplatine (Fig. 34B et E). De plus, la diminution de l'expression de SHMT2 n'a aucun effet sur la sensibilité de la lignée BPH aux deux dérivés du platine (figure 34G et H) montrant que l'influence du gène *SHMT2* sur la sensibilité à l'oxaliplatine n'est observée que dans un contexte « tumoral ».

Lignée cellulaire	ΔIC_{50}	
	Oxaliplatine	Cisplatine
DU145	3,8	1
LNCaP	3,7	1,17
BPH	1,02	1,15

Tableau 26 - Rapport des sensibilités aux platines dans les 3 lignées.

Chaque valeur correspond au ratio de l' IC_{50} de la condition siRNA sur la condition contrôle.

Cette première étape nous a conforté en termes de rationnel de l'approche choisie, mais a souligné la difficulté de pouvoir utiliser les tests de clonogénicité et de *Western blotting* pour confirmer l'effet des siRNAs dans la suite de nos validations fonctionnelles. Compte tenu du nombre de gènes à étudier dans les trois lignées pour les deux dérivés de platine et surtout du fait que pour certains gènes les anticorps choisis ne donnaient pas de résultats satisfaisants dans les premiers tests, nous avons décidé d'opter pour le test de cytotoxicité en microplaques pour évaluer les effets des siRNAs sur la sensibilité aux dérivés de platine, et de vérifier l'effet des siRNA sur le niveau d'expression des gènes par la technique de qRT-PCR en temps réel. A cette occasion, nous avons également étudié le gène *SHMT2*, le test de cytotoxicité utilisé n'étudiant pas les mêmes paramètres cellulaires que le test de clonogénicité.

II.4. Résultats des tests de cytotoxicité

Chaque test de cytotoxicité a été réalisé au moins deux fois. Les figures 35 à 40 présentent un exemple des résultats de la modulation de la sensibilité à l'oxaliplatine et au cisplatine, obtenus pour les 3 lignées cellulaires, lorsque le niveau d'expression des 9 gènes est diminué.

II.4.1. Résultats de la lignée DU145

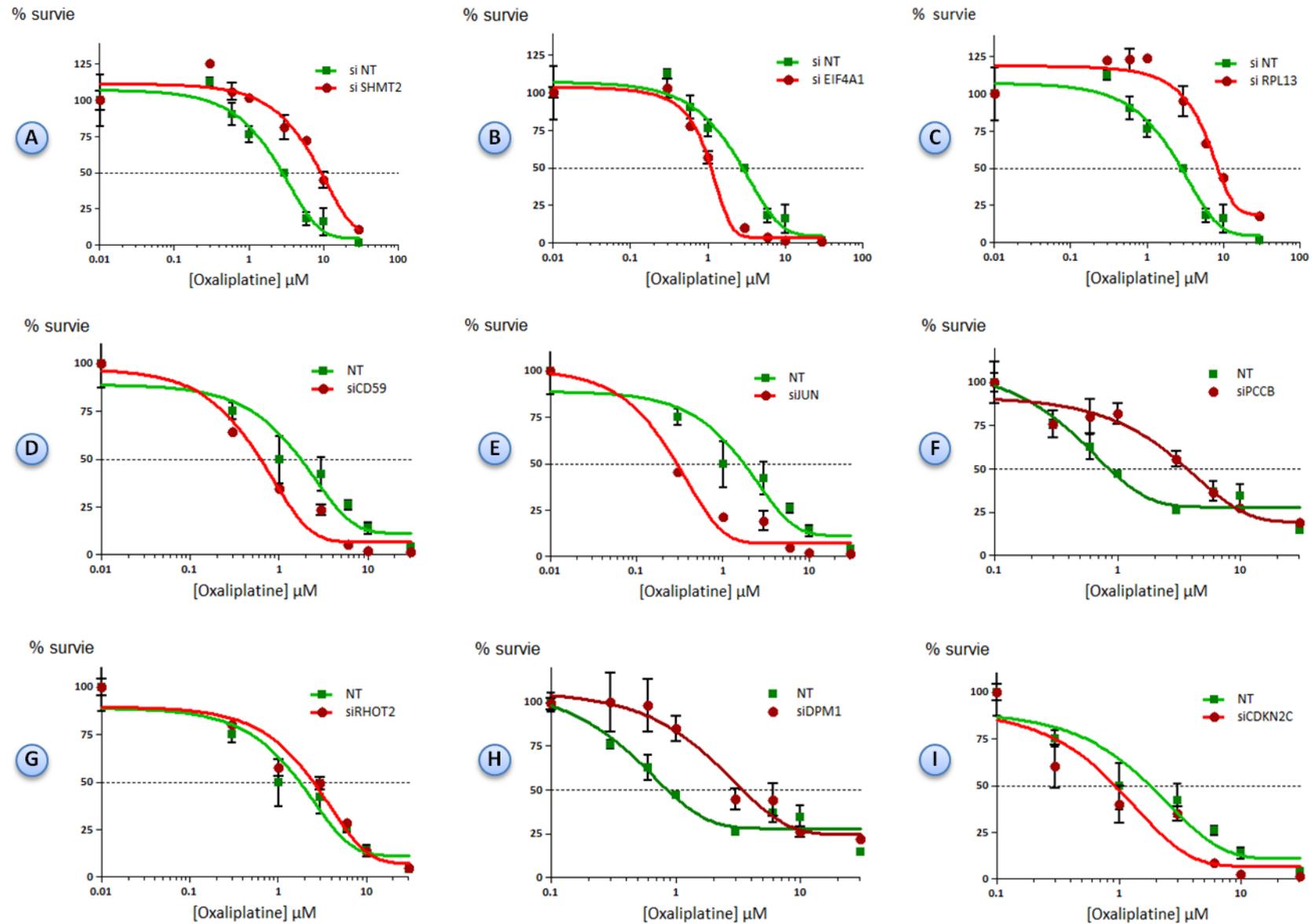


Figure 35 - Effet de la sous-expression des gènes *SHMT2*, *EIF4A1*, *RPL13*, *CD59*, *JUN*, *PCCB*, *RHOT2*, *DPM1* et *CDKN2C* (A à I) sur la sensibilité de la lignée DU145 à l'oxaliplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.

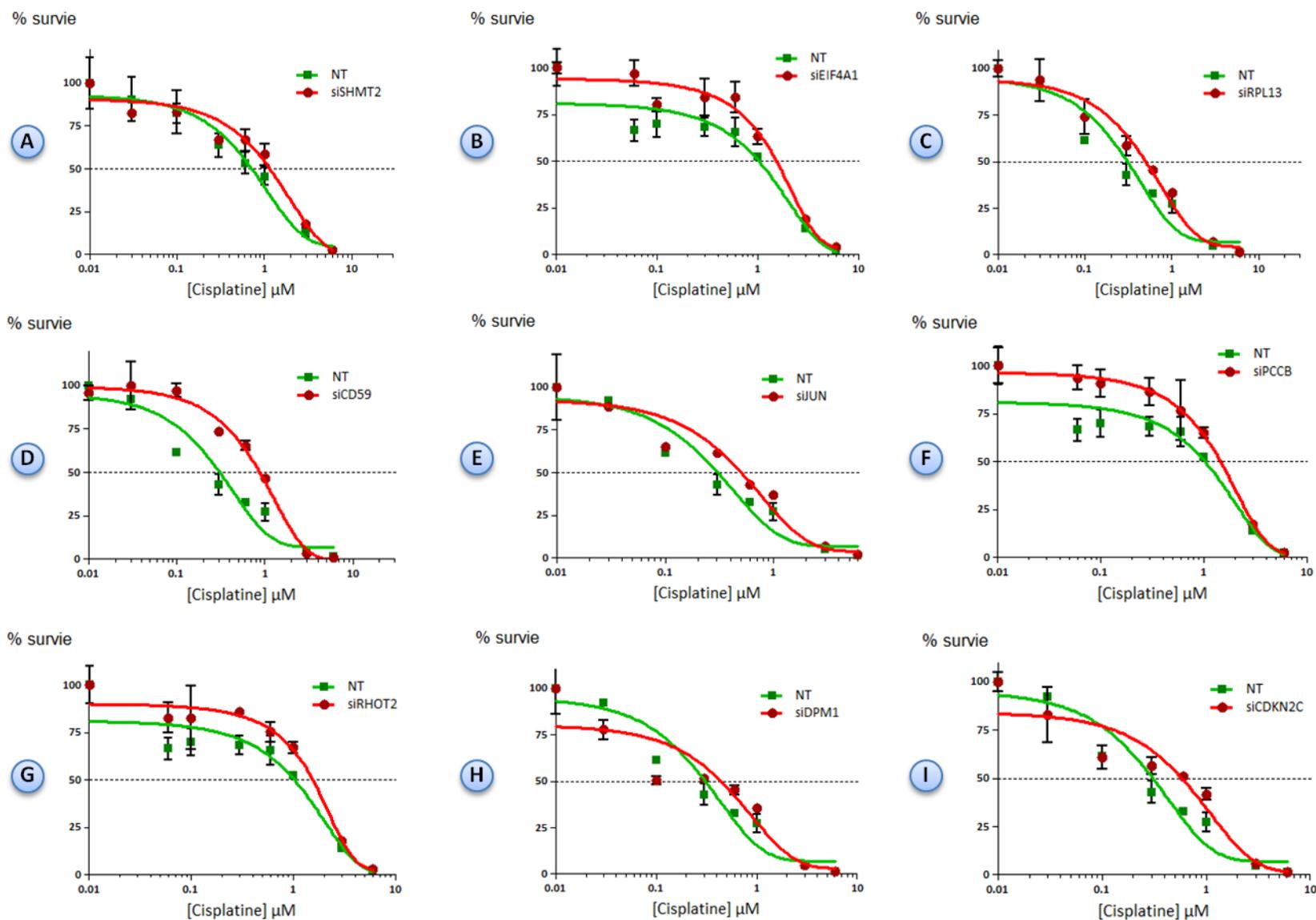


Figure 36 - Effet de la sous-expression des gènes *SHMT2*, *EIF4A1*, *RPL13*, *CD59*, *JUN*, *PCCB*, *RHOT2*, *DPM1* et *CDKN2C* (A à I) sur la sensibilité de la lignée DU145 au cisplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.

II.4.2. Résultats de la lignée LNCaP

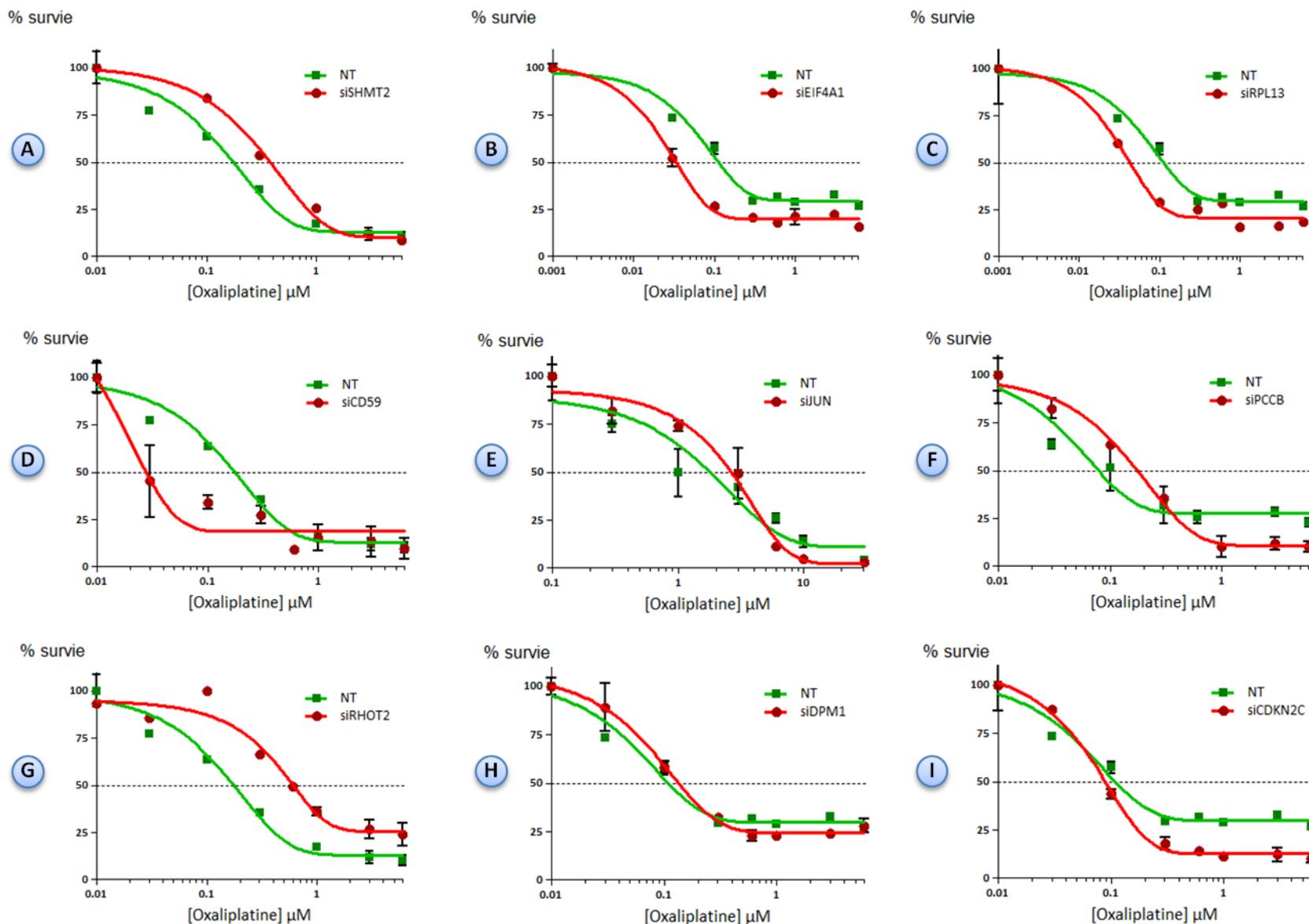


Figure 37 - Effet de la sous-expression des gènes *SHMT2*, *EIF4A1*, *RPL13*, *CD59*, *JUN*, *PCCB*, *RHOT2*, *DPM1* et *CDKN2C* (A à I) sur la sensibilité de la lignée LNCaP à l'oxaliplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.

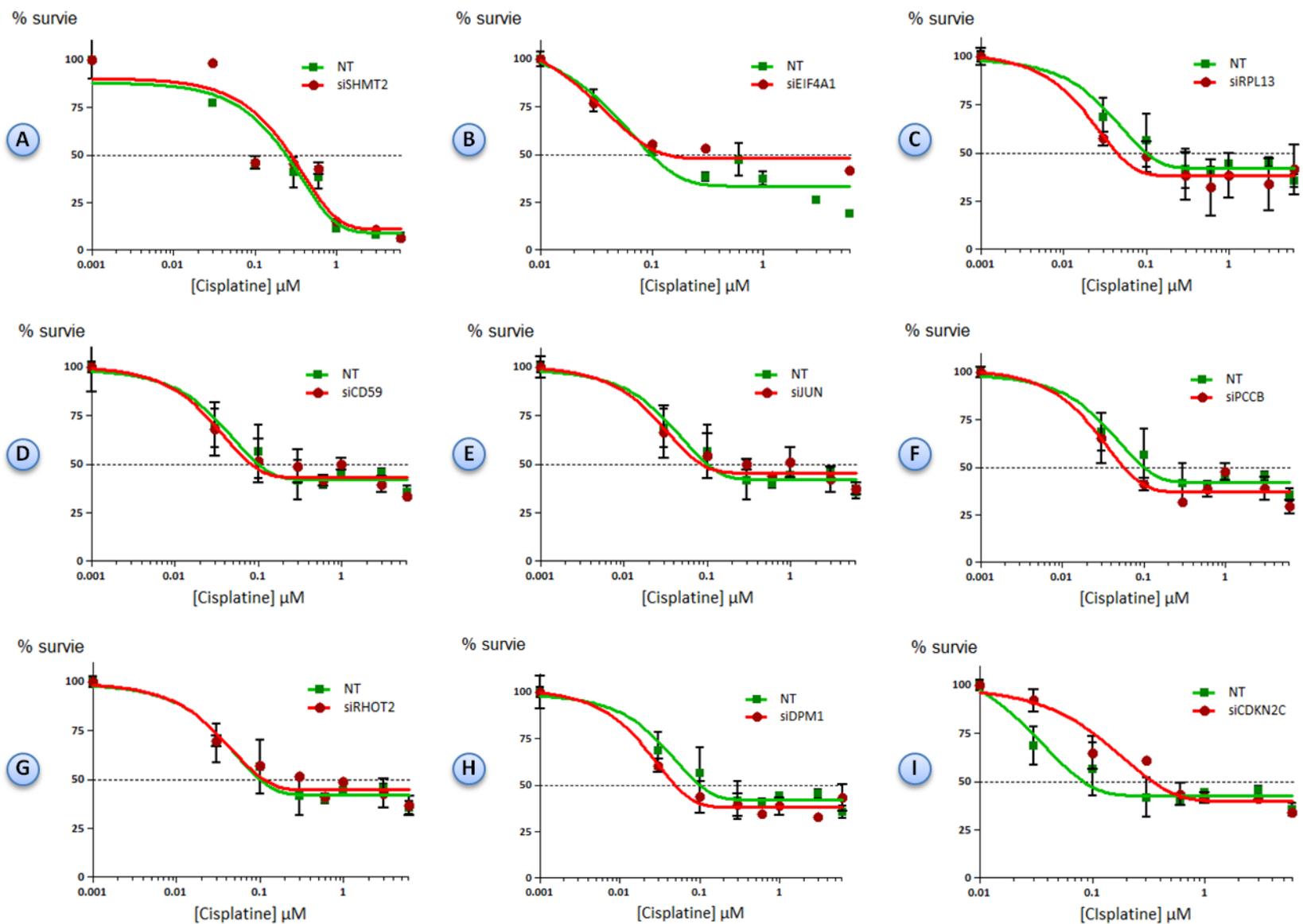


Figure 38 - Effet de la sous-expression des gènes *SHMT2*, *EIF4A1*, *RPL13*, *CD59*, *JUN*, *PCCB*, *RHOT2*, *DPM1* et *CDKN2C* (A à I) sur la sensibilité de la lignée LNCaP au cisplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.

II.4.3. Résultats de la lignée BPH

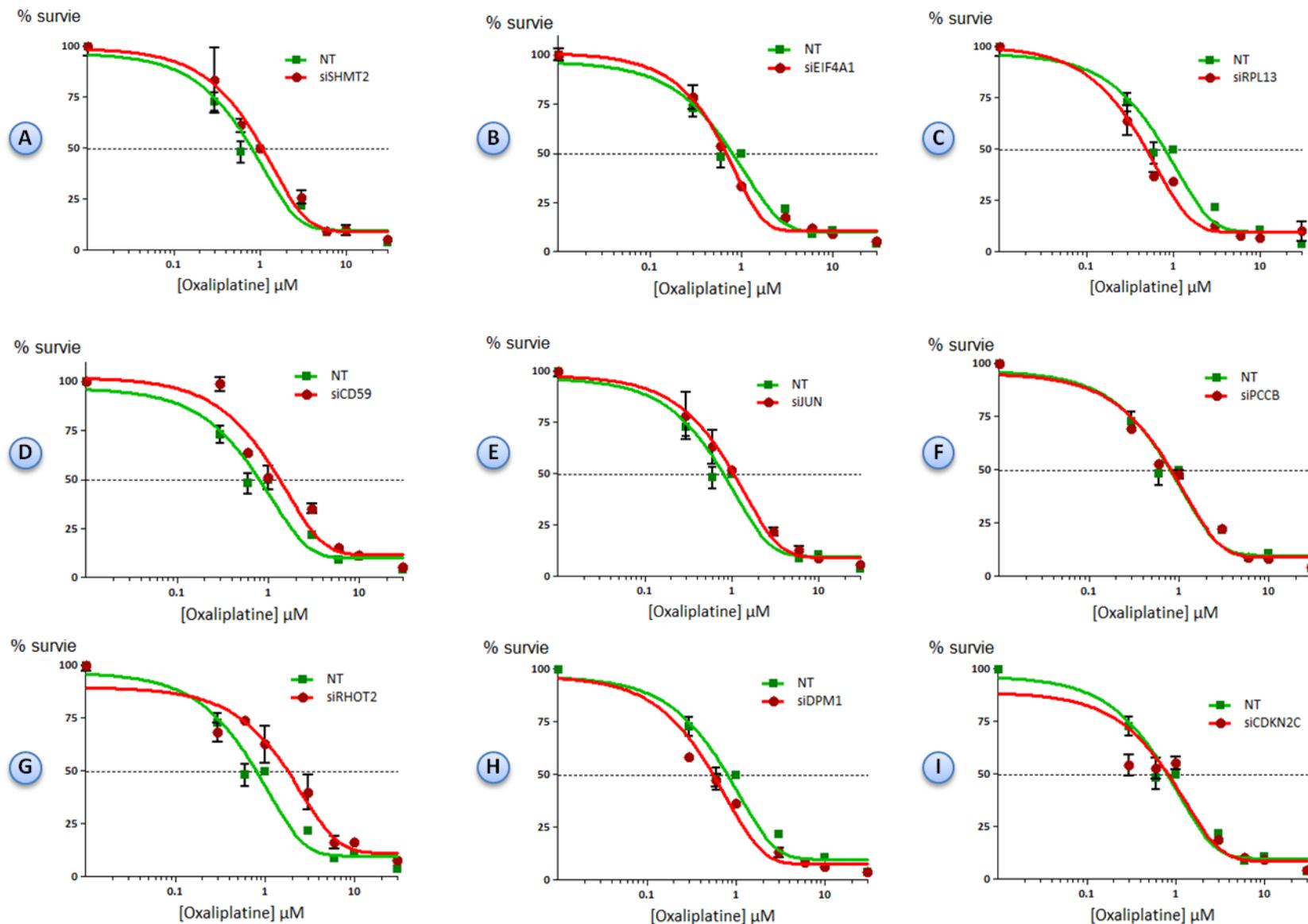


Figure 39 - Effet de la sous-expression des gènes *SHMT2*, *EIF4A1*, *RPL13*, *CD59*, *JUN*, *PCCB*, *RHOT2*, *DPM1* et *CDKN2C* (A à I) sur la sensibilité de la lignée BPH à l'oxaliplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.

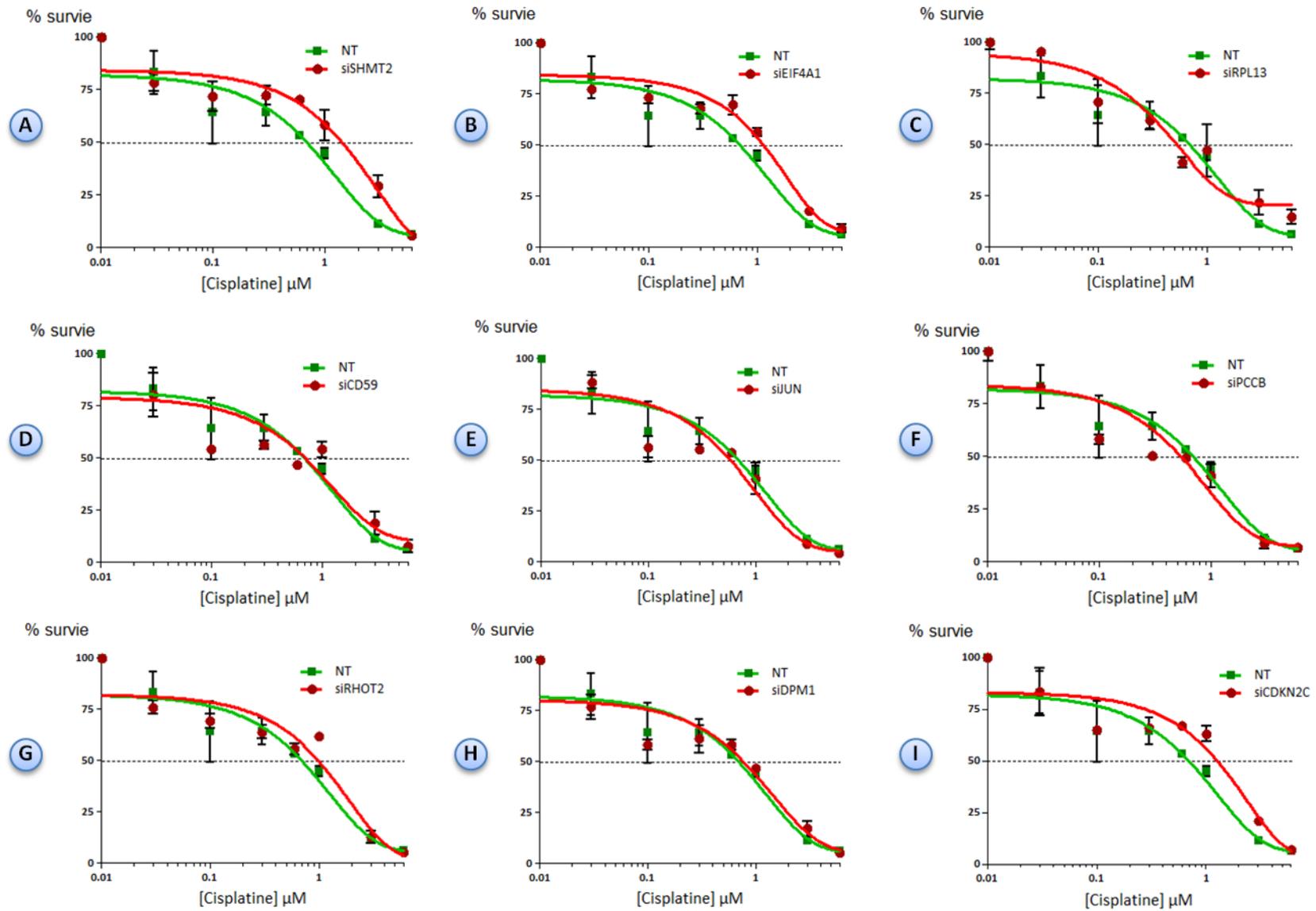


Figure 40 - Effet de la sous-expression des gènes *SHMT2*, *EIF4A1*, *RPL13*, *CD59*, *JUN*, *PCCB*, *RHOT2*, *DPM1* et *CDKN2C* (A à I) sur la sensibilité de la lignée BPH au cisplatine. Chaque point correspond au pourcentage de survie en fonction de la concentration en drogue.

Le tableau 27 présente l'intégralité des résultats obtenus par les tests de cytotoxicité.

Gène	Traitement	Corrélation <i>in silico</i>	Moyenne $\frac{IC_{50} \text{ siRNA ciblant}}{IC_{50} \text{ siRNA contrôle}}$					
			BPH		DU145		LNCaP	
			Moy.	± SD	Moy.	± SD	Moy.	± SD
SHMT2	Oxaliplatine	positive	1,18	0,14	3,36 *	0,67	2,98 *	1,03
	Cisplatine	NS	0,91	0,64	2,39 *	1,29	1,30	0,21
EIF4A1	Oxaliplatine	positive	0,84	0,11	0,32 *	0,14	0,22 *	0,01
	Cisplatine	NS	0,96	0,58	2,19 *	0,60	1,00	0,71
RPL13	Oxaliplatine	positive	1,09	0,48	2,08 *	1,22	0,41 *	0,05
	Cisplatine	NS	1,48	1,15	1,29	0,42	0,51	0,06
CD59	Oxaliplatine	négative	1,38	0,38	0,37 *	0,03	0,24 *	0,11
	Cisplatine	NS	0,97	0,40	1,93	0,69	0,65	0,24
JUN	Oxaliplatine	négative	0,86	0,41	0,44 *	0,22	1,13	0,70
	Cisplatine	NS	0,75	0,13	1,66	0,01	0,84	0,00
PCCB	Oxaliplatine	positive	1,14	0,25	2,90 *	1,54	2,62 *	1,63
	Cisplatine	NS	0,99	0,57	1,20	0,28	0,57	0,01
RHOT2	Oxaliplatine	positive	1,66	0,66	0,91	0,43	3,27 *	2,19
	Cisplatine	NS	1,29	0,30	1,67	0,19	1,35	0,35
DPM1	Oxaliplatine	positive	0,79	0,06	3,32 *	0,53	1,16	0,34
	Cisplatine	NS	1,02	0,44	1,79	0,36	0,51	0,01
CDKN2C	Oxaliplatine	négative	0,93	0,14	0,43 *	0,03	1,34	0,41
	Cisplatine	NS	1,34	0,43	1,51	0,41	3,18 *	0,59

Tableau 27 - Résultats des tests de cytotoxicité montrant la modulation de la sensibilité aux platines dans les 3 lignées cellulaires, par la diminution du niveau d'expression de chacun des 9 gènes.

Chaque valeur du tableau correspond au ratio entre les IC_{50} obtenues pour les cellules transfectées par le siRNA ciblant le gène d'intérêt et les IC_{50} obtenues pour les cellules transfectées par le siRNA contrôle (moyenne \pm SD d'au moins 2 expériences indépendantes). Un rapport > 2 ou $< 0,5$ (*) indique que la diminution du niveau d'expression du gène rend les cellules deux fois plus résistantes ou deux fois plus sensibles à la drogue, respectivement et représente le seuil de significativité que nous nous sommes fixés.

Pour chaque expérience, nous avons calculé le rapport entre l' IC_{50} du dérivé de platine obtenue dans les cellules transfectées par le siRNA ciblant le gène d'intérêt et l' IC_{50} obtenue dans la condition contrôle. Un rapport > 1 indique un décalage de la courbe de cytotoxicité vers la droite qui correspond à une plus grande résistance des cellules à la drogue lorsque le niveau d'expression du gène est diminué. A l'inverse, un chiffre < 1 indique que la diminution du niveau d'expression du gène sensibilise les cellules à la drogue. Nous avons considéré comme significatif un changement de sensibilité correspondant à un rapport supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 (variation d'un facteur 2) (Tableau 27, *).

Pour la lignée DU145, la diminution du niveau d'expression de 8 gènes est associée à une différence significative en termes de sensibilité à l'oxaliplatine, démontrant qu'il existe bien un lien fonctionnel entre leur niveau d'expression et la sensibilité à ce dérivé du platine. Le gène *EIF4A1* montre une relation inverse à celle prédite par l'analyse *in silico*. De plus, le niveau d'expression des gènes *SHMT2* et *EIF4A1* semble également moduler la sensibilité au cisplatine, ce qui n'était pas attendu d'après les résultats de l'approche *in silico*.

Pour ce qui concerne la lignée LNCaP, l'expression de 6 gènes, parmi les 9, semble être fonctionnellement reliée à la sensibilité à l'oxaliplatine. Les gènes *EIF4A1* et *RPL13* montrent une relation inverse à celle prédite par l'analyse *in silico*. De plus, le niveau d'expression du gène *CDKN2C* semble également moduler la sensibilité au cisplatine, ce qui n'était pas attendu d'après les résultats de l'approche *in silico*.

De manière intéressante, la diminution du niveau d'expression des 9 gènes n'entraîne aucun changement de sensibilité de la lignée BPH à l'oxaliplatine ou au cisplatine. Ce sont des résultats qui ne vont pas dans le sens de ce que l'on attendait mais qui reflètent probablement la nécessité d'un contexte « tumoral » pour que le lien entre expression des gènes et sensibilité aux drogues puisse être observé.

Les figures 41 et 42 présentent une comparaison des résultats obtenus entre lignées cancéreuses prostatiques DU145 et LNCaP et lignée « normale » BPH, un test de Student ayant été utilisé pour déterminer si les différences observées étaient statistiquement significatives et à quel seuil.

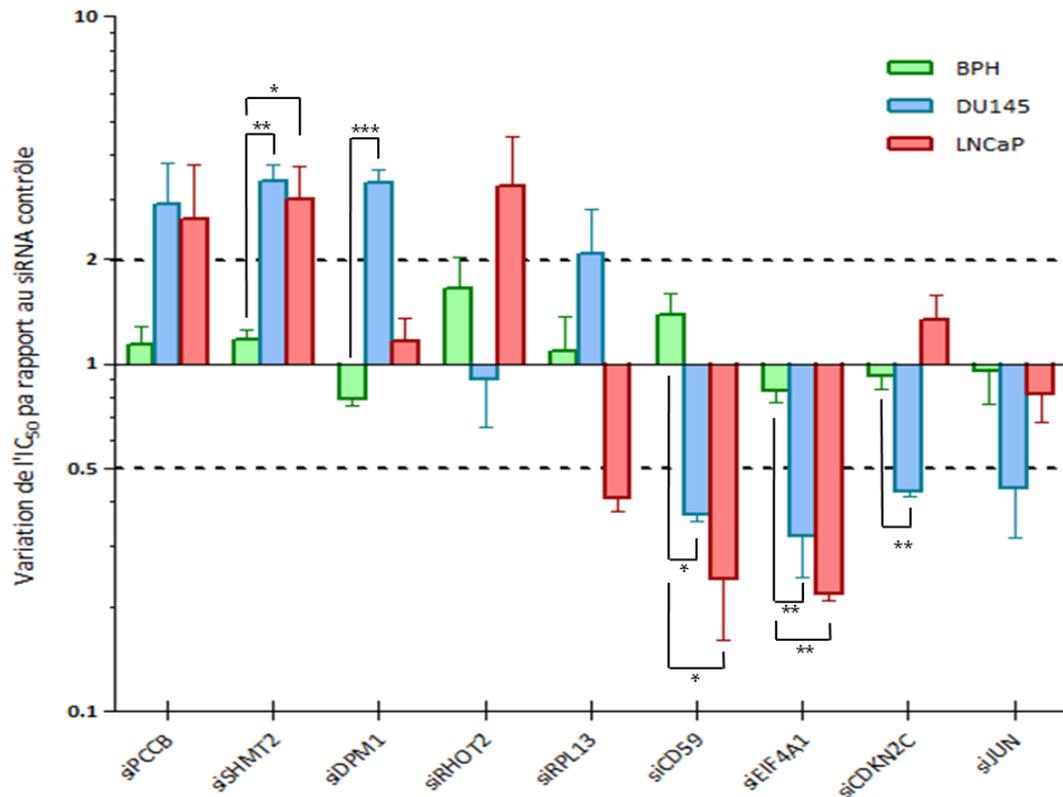


Figure 41 – Représentation graphique correspondant aux résultats présentés dans le tableau 26 pour l'oxaliplatine.

(*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Cette représentation montre bien que la diminution du niveau d'expression de 8 gènes sur 9 et de 6 gènes sur 9 pour les lignées DU145 et LNCaP, respectivement, module bien la sensibilité de ces deux lignées à l'oxaliplatine. Pour quatre gènes (*PCCB*, *SHMT2*, *CD59* et *EIF4A1*), la modulation de la sensibilité à l'oxaliplatine est reproductible dans les deux lignées cancéreuses. Pour les gènes *DPM1*, *RHOT2*, *CDKN2C* et *JUN*, une différence significative est mise en évidence dans au moins une des deux lignées, le seul gène ayant fourni des résultats contradictoires étant le gène *RPL13* dont la diminution d'expression conduit à une résistance ou une sensibilité à l'oxaliplatine selon la lignée considérée. Les mêmes analyses réalisées pour le cisplatine ne montrent aucune différence entre lignées DU145 ou LNCaP et lignée BPH, hormis le seul gène *CDKN2C* dont l'expression module la sensibilité au cisplatine uniquement dans la lignée LNCaP. Il existe donc globalement une spécificité de signature vis-à-vis de l'oxaliplatine.

Ces résultats permettent donc pour la première fois, d'identifier et de valider au niveau fonctionnel une signature de 8 gènes dont l'expression pourrait être utilisée pour prédire la réponse à l'oxaliplatine dans des lignées cancéreuses de prostate. L'identification de cette signature fournit également la preuve de concept qu'il est possible par une telle approche d'identifier des drogues qui puissent être proposées en alternative aux taxanes pour le traitement des cancers de prostate de haut grade, objectif que nous étions fixés pour cette thèse.

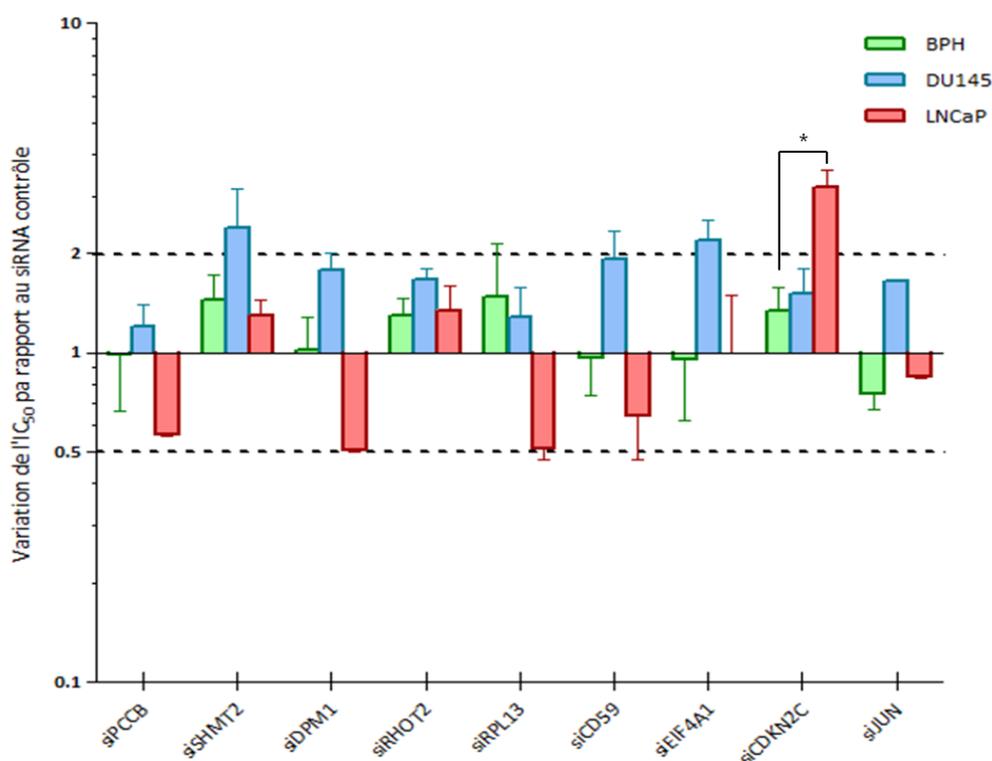


Figure 42 - Représentation graphique correspondant aux résultats présentés dans le tableau 26 pour le cisplatine.

(*) $p < 0,05$.

Cette représentation démontre qu'il n'est pas possible d'établir une signature de réponse au cisplatine, malgré le fait que quelques différences de sensibilité à la drogue semblent à la limite de la significativité. Cependant, les tests de Student n'ont validé qu'une seule de ces différences lorsqu'on les compare à la lignée non cancéreuse, à savoir que la diminution du niveau d'expression du gène *CDKN2C* apporte une résistance des LNCaP au cisplatine (p -value $< 0,05$), les expériences de cytotoxicité ayant montré, de surcroît, une bonne reproductibilité.

Dans nos modèles de lignées cellulaires de cancer de la prostate, nous avons confirmé la plupart des prédictions de l'approche *in silico*, ce qui permet de valider l'existence d'une signature de réponse à l'oxaliplatine, d'après le niveau d'expression de 8 gènes.

II.5. Validation de la diminution d'expression des gènes par qRT-PCR

Pour chaque expérience de cytotoxicité, nous avons donc mesuré la diminution de la quantité d'ARNm des gènes et comparé à celui de la condition contrôle, afin de vérifier que les différences observées étaient bien liées à une réduction du niveau d'expression des gènes étudiés (figure 43).

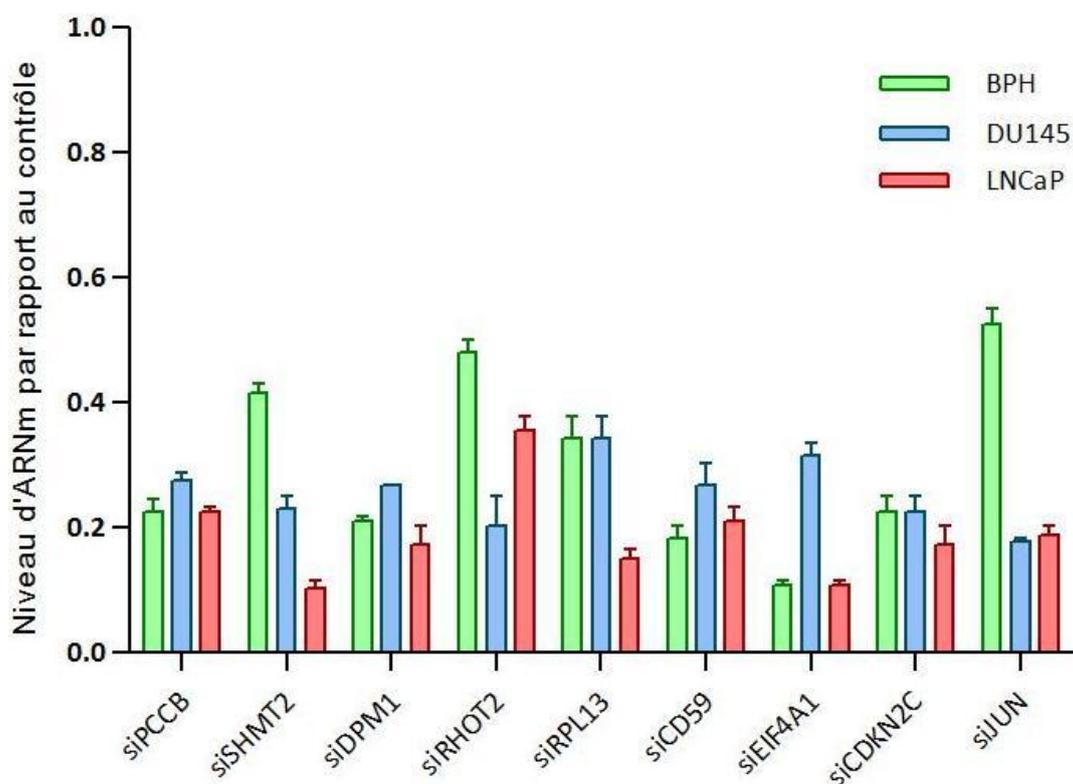


Figure 43 - Vérification de la diminution de l'expression des gènes par qRT-PCR.

Le contrôle du niveau de répression des gènes a été mesuré 48 h après la transfection des cellules avec les siRNA. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD des rapports entre le niveau d'expression dans la condition siRNA ciblant le gène d'intérêt sur la condition siRNA contrôle de chaque expérience.

La diminution du niveau d'expression est de plus de 50 % pour la totalité des gènes, à l'exception du siRNA anti-JUN qui a montré une efficacité moindre dans la lignée BPH. Cette

mesure du niveau d'expression par qRT-PCR nous permet de valider les résultats des tests de cytotoxicité.

RÉSULTATS - PARTIE 2

Sommaire

I. ÉTUDE DU MODÈLE CHO 51-11 MUTÉ POUR SHMT2	169
II. ÉTUDE DE L'ISOFORME SHMT1	173
III. ALTÉRATION DU POOL GLYCINE-SÉRINE ET SENSIBILITÉ À L'OXALIPLATINE	174
IV. DEGRÉ DE MÉTHYLATION ET SENSIBILITÉ À L'OXALIPLATINE	176

Comme nous l'avons souligné précédemment, la signature d'expression que nous avons identifiée semble spécifique de l'oxaliplatine. Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons voulu étudier plus en amont cette spécificité sur le plan mécanistique en nous intéressant plus particulièrement à certains gènes impliqués dans des voies importantes dérégulées dans les cancers de hauts grades, et notamment à ceux impliqués dans le métabolisme monocarboné. Nous avons donc décidé de nous focaliser dans un premier temps sur le gène *SHMT2* jouant un rôle clé dans cette voie métabolique.

I. ÉTUDE DU MODÈLE CHO 51-11 MUTÉ POUR SHMT2

Les résultats obtenus dans la première partie de notre travail montrent que la diminution de l'expression de *SHMT2* confère une résistance à l'oxaliplatine alors qu'elle n'affecte pas la sensibilité des cellules DU145 et LNCaP au cisplatine. *SHMT2* est une sérine hydroxyméthyl transférase dont le rôle est de catalyser le transfert d'un groupement méthyle d'une sérine vers le THF pour synthétiser du DMTHF (DiMéthyl-THF) et de la glycine. Nous avons dans un premier temps voulu savoir si l'activité catalytique de *SHMT2* était impliquée dans la sensibilité à l'oxaliplatine. Pour cela, nous avons utilisé des cellules de hamster chinois spécifiquement invalidées pour *SHMT2* (cellules CHO 51-11). Elles possèdent un niveau de *SHMT2* comparable aux cellules contrôles CHO K1 mais l'enzyme ne possède pas d'activité catalytique (par la présence d'une mutation inactivatrice). Nous avons comparé la sensibilité des cellules CHO 51-11 et CHO K1 à l'oxaliplatine et au cisplatine (Fig. 44).

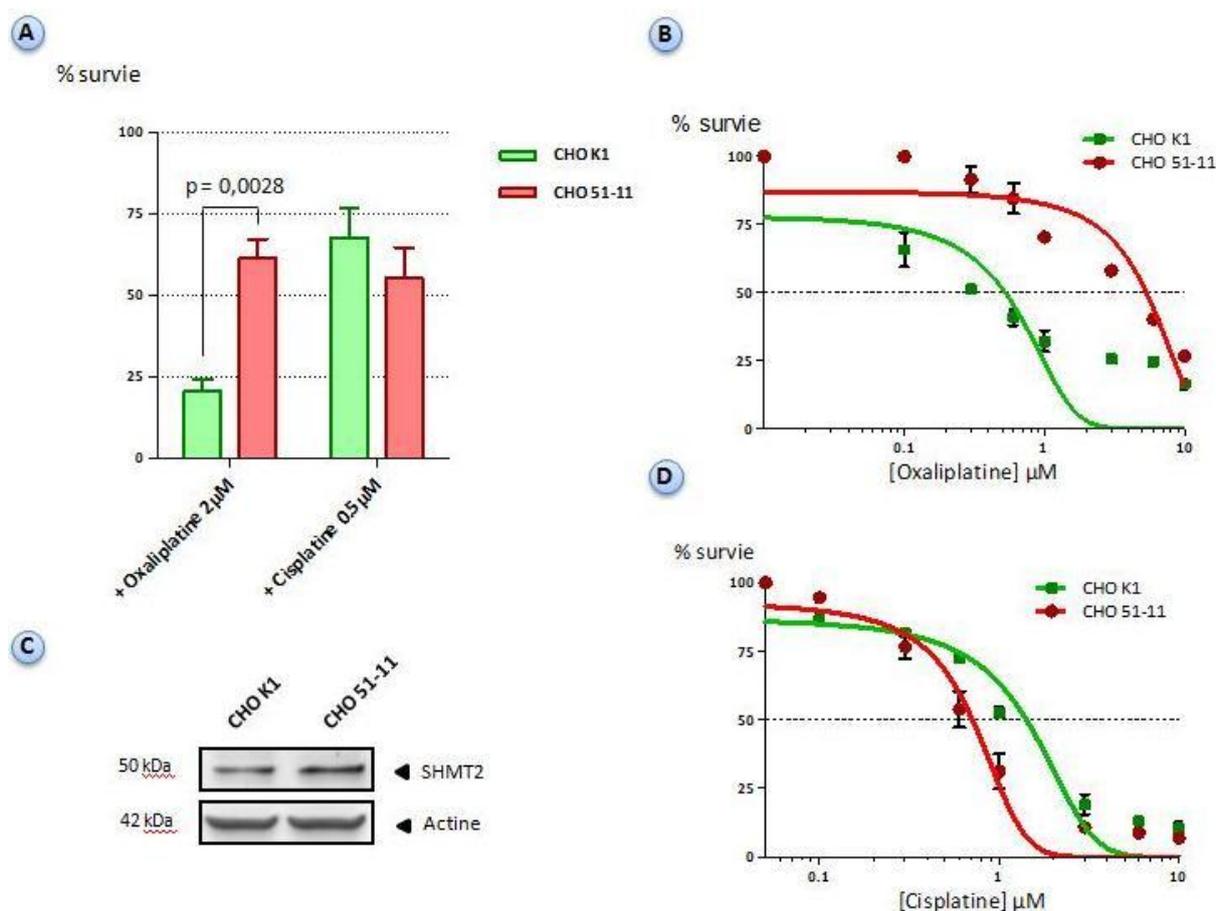


Figure 44 – Comparaison de la sensibilité des cellules CHO K1 et CHO 51-11, inactivées pour SHMT2, aux dérivés du platine.

Les cellules sont traitées en continu pendant 72 h. **A**, résultats des tests de clonogénie réalisés avec une concentration fixe d'oxaliplatine et de cisplatine. **B** et **D**, résultats des tests MTT avec l'oxaliplatine et le cisplatine, respectivement. Les résultats sont exprimés en % de survie en fonction de la concentration en drogue et représentent la moyenne \pm SD de deux expériences indépendantes réalisées en triplicate. **C**, Western-blot de contrôle du niveau de SHMT2 dans les lysats totaux des cellules CHO K1 et CHO 51-11. L'actine est utilisée comme contrôle de charge.

Les premiers résultats obtenus avec une concentration de médicament induisant environ 60 % de mort cellulaire montrent clairement que la lignée CHO 51-11 déficiente en SHMT2 est résistante à l'oxaliplatine par rapport à la lignée CHO K1. En revanche, elle est légèrement plus sensible au cisplatine. Ces résultats ont été reproduits par des tests de cytotoxicité utilisant une large gamme de concentration pour les deux drogues (Fig. 44B et D), confirmant une résistance d'un facteur 10 des cellules CHO 51-11 à l'oxaliplatine comparé aux cellules contrôles ($IC_{50} = 5,21 \mu$ M pour la lignée CHO 51-11 par rapport à $0,525 \mu$ M pour la lignée CHO K1). On retrouve également une légère sensibilité (de l'ordre de 2 fois) des cellules CHO 51-11 au cisplatine. Ces résultats confirment donc les résultats obtenus par la réduction du niveau d'expression de SHMT2 sur les lignées DU145 et LNCaP.

Ils ont également permis de conclure que c'est la diminution de l'activité de SHMT2, plutôt que son niveau d'expression, qui est responsable de la « spécificité » de réponse à l'oxaliplatine que nous avons observé.

Nous avons ensuite voulu savoir si cette « spécificité » de réponse à l'oxaliplatine était liée à la structure chimique même de ce dérivé du platine. L'oxaliplatine diffère du cisplatine par la présence du cycle DACH et du groupement oxalate. Nous avons tout d'abord testé si la partie oxalate avait un rôle à jouer, en comparant la cytotoxicité de l'oxaliplatine à celle du cisplatine en présence d'oxalate. Nous avons vérifié si l'addition d'oxalate au cisplatine pouvait conférer le même type d'effet que l'oxaliplatine (Figure 45).

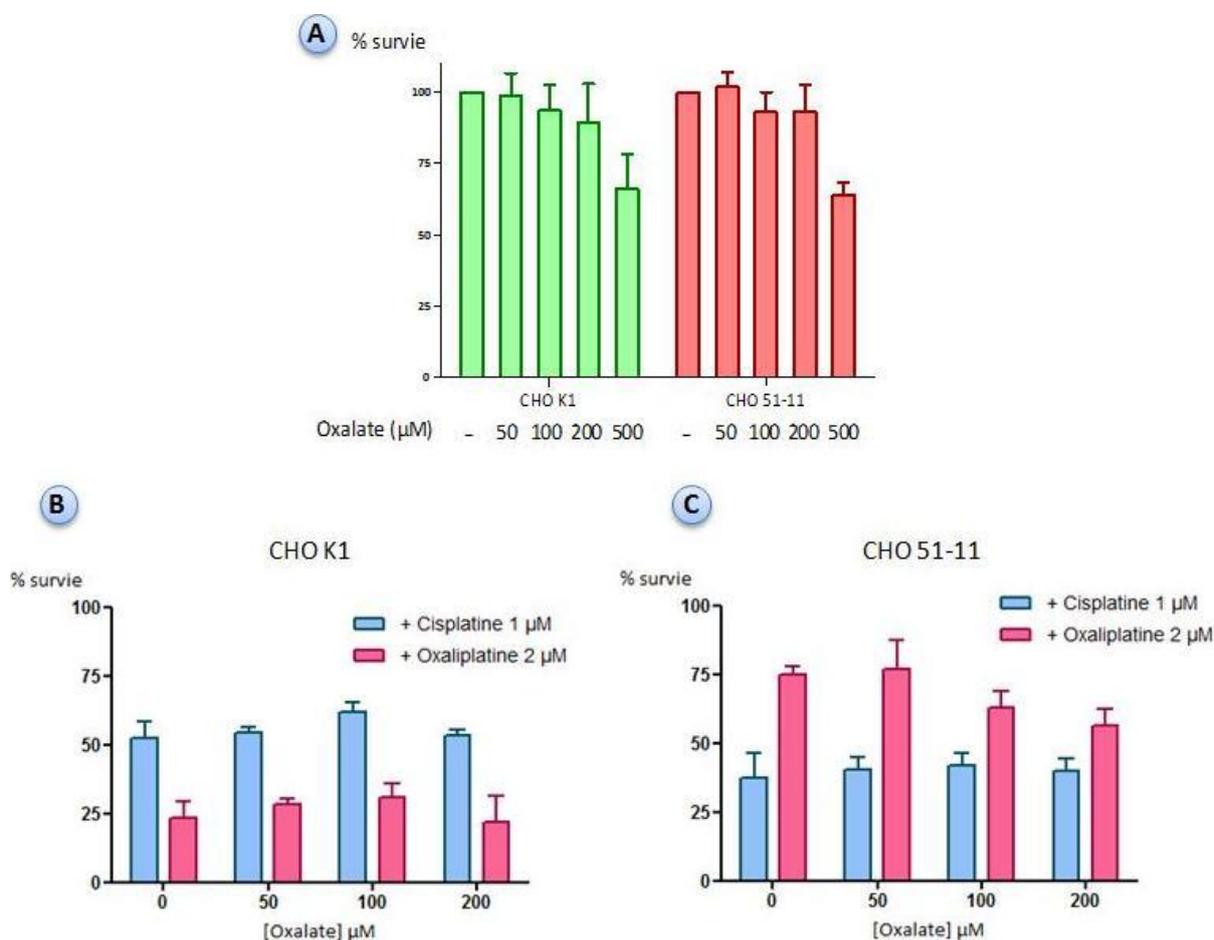


Figure 45 – Effet de l'oxalate sur la sensibilité des cellules CHO K1 et CHO 51-11 aux dérivés du platine.

Les cellules ont été cultivées 48 h dans un milieu enrichi en oxalate avant d'être traitées en continu pendant 72 h aux dérivés du platine. **A**, détermination des doses maximales d'oxalate n'induisant pas de diminution de survie. **B**, résultats des tests MTT sur les dérivés du platine en présence de concentrations croissantes en oxalate dans les lignées CHO K1 et CHO 51-11 (**C**). Les résultats sont exprimés en % de survie en fonction de la concentration en drogue et représentent la moyenne \pm SD de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Nous avons tout d'abord déterminé les concentrations optimales d'oxalate à utiliser. Les résultats montrent que la concentration maximale d'oxalate seul n'induisant pas de baisse significative de la survie des lignées CHO était de 200 μM environ (Fig. 45A). Dans ces conditions, l'apport d'oxalate ne permet pas de restaurer le différentiel de sensibilité entre les cellules CHO K1 et CHO 51-11 au cisplatine et il n'a, par ailleurs, aucune influence sur la sensibilité à l'oxaliplatine (Fig. 45B et C). Il semble donc que le groupement oxalate ne soit pas à l'origine de la spécificité de réponse à l'oxaliplatine liée au gène *SHMT2*. Nous avons donc testé si cette spécificité était liée à la partie DACH de l'oxaliplatine. Pour cela, nous avons testé l'effet du dichloro(1,2-diaminocyclohexane)-platine(II), une molécule similaire à l'oxaliplatine sans le groupement oxalate et qui forme le même type d'adduits que l'oxaliplatine (Zdraveski *et al.* 2002) (Figure 46).

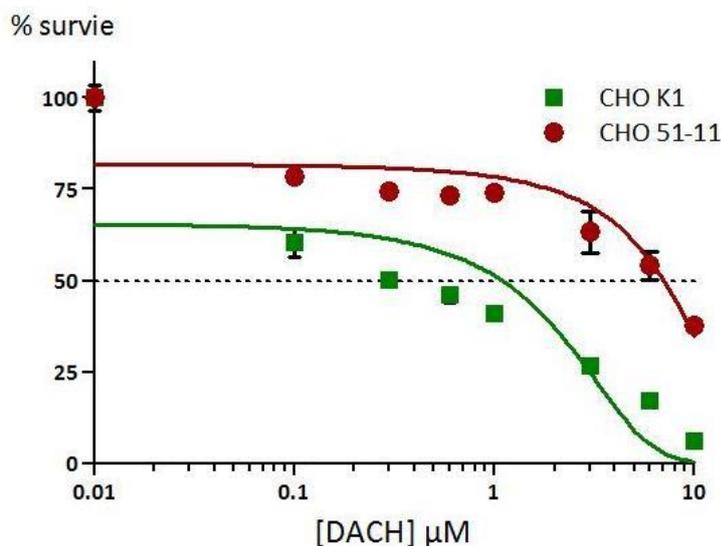


Figure 46 - Comparaison de la sensibilité des cellules CHO K1 et CHO 51-11 au dichloro(1,2-diaminocyclohexane)-platine(II).

Résultats du test MTT sur les lignées CHO K1 et CHO 51-11 traitées en continu pendant 72 h au DACH platine. Les résultats, issus d'une expérience réalisée en quadruplicat, sont exprimés en % de survie en fonction de la concentration en drogue.

Comme le montre le résultat présenté figure 46, les cellules CHO 51-11 sont plus résistantes (de l'ordre de 7 fois) au DACH platine que les cellules CHO K1, démontrant que c'est bien le groupement DACH qui est responsable de la spécificité de réponse à l'oxaliplatine.

II. ÉTUDE DE L'ISOFORME SHMT1

Nous avons démontré que l'activité de SHMT2 avait un rôle important à jouer dans la sensibilité des cellules à l'oxaliplatine. Nous avons donc voulu tester si, de manière plus large, une dérégulation du cycle glycine-sérine était également capable de moduler de manière spécifique la sensibilité des cellules à ce dérivé du platine. Nous nous sommes pour cela intéressé à SHMT1, l'autre enzyme SHMT impliquée dans ce cycle. Nous avons en premier lieu testé si la diminution de l'expression de SHMT1 était capable, comme pour SHMT2, de conférer une résistance sélective à l'oxaliplatine (figure 47).

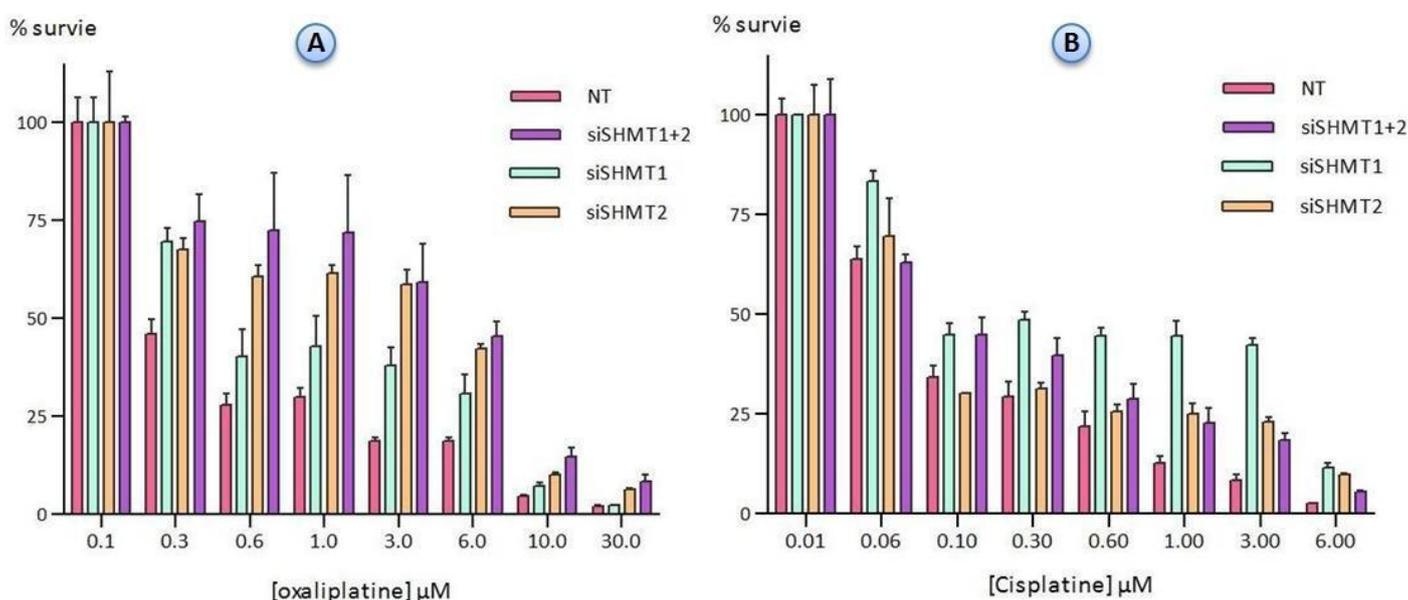


Figure 47 - Comparaison de la sensibilité de la lignée DU145 à l'oxaliplatine par la diminution du niveau d'expression de SHMT1, SHMT2 et des deux SHMT simultanément.

Les cellules ont été transfectées pendant 48 h avec les siRNA correspondants, avant d'être traitées aux dérivés du platine pendant 72 h. **A** et **B**, résultats des tests MTT après traitement par l'oxaliplatine et par le cisplatine, respectivement. Les résultats sont exprimés en % de survie en fonction de la concentration en dérivés du platine et représentent la moyenne \pm SD de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Les résultats (Fig. 47A) montrent que la transfection par un siRNA anti-SHMT1 confère une résistance des cellules DU145 à l'oxaliplatine. Cette résistance est toutefois inférieure à celle observée par les cellules transfectées par le siRNA anti-SHMT2. Par ailleurs, la résistance à

l'oxaliplatine induite par le siRNA anti-SHMT2 n'est que légèrement potentialisée par la transfection avec le siRNA anti-SHMT1 (Fig. 47A). Nous avons étudié dans les mêmes conditions l'effet de la modulation de *SHMT1* sur la sensibilité des cellules DU145 au cisplatine. Les résultats ne montrent pas de différence significative pour des doses inférieures à 0,5 μ M, une légère résistance étant observée pour des concentrations supérieures en cisplatine (Fig. 47B).

Ces résultats confirment l'importance des gènes SHMT dans la sensibilité des cellules DU145 à l'oxaliplatine mais suggèrent que ces deux gènes n'ont probablement pas le même impact, étant donné leur rôle différent dans la régulation du pool glycine-sérine.

III. ALTÉRATION DU POOL GLYCINE-SÉRINE ET SENSIBILITÉ À L'OXALIPLATINE

Après avoir étudié l'implication des deux gènes clé dans la régulation du pool glycine-sérine, nous avons voulu savoir si un déséquilibre en glycine ou en sérine pouvait avoir une répercussion sur la sensibilité des cellules à l'oxaliplatine. Nous avons donc étudié l'effet de supplémentation du milieu de culture en glycine, en sérine ou en sarcosine sur la sensibilité des cellules CHO K1 et CHO 51-11 aux deux dérivés du platine (Fig. 48). Nous avons montré précédemment que la sarcosine était « recyclée » dans la mitochondrie pour reformer de la glycine mais également que sa forte concentration déclenchait l'invasion. Des concentrations de 500 mg/L en glycine et/ou sérine et de 2,5 g/L en sarcosine ont été utilisées.

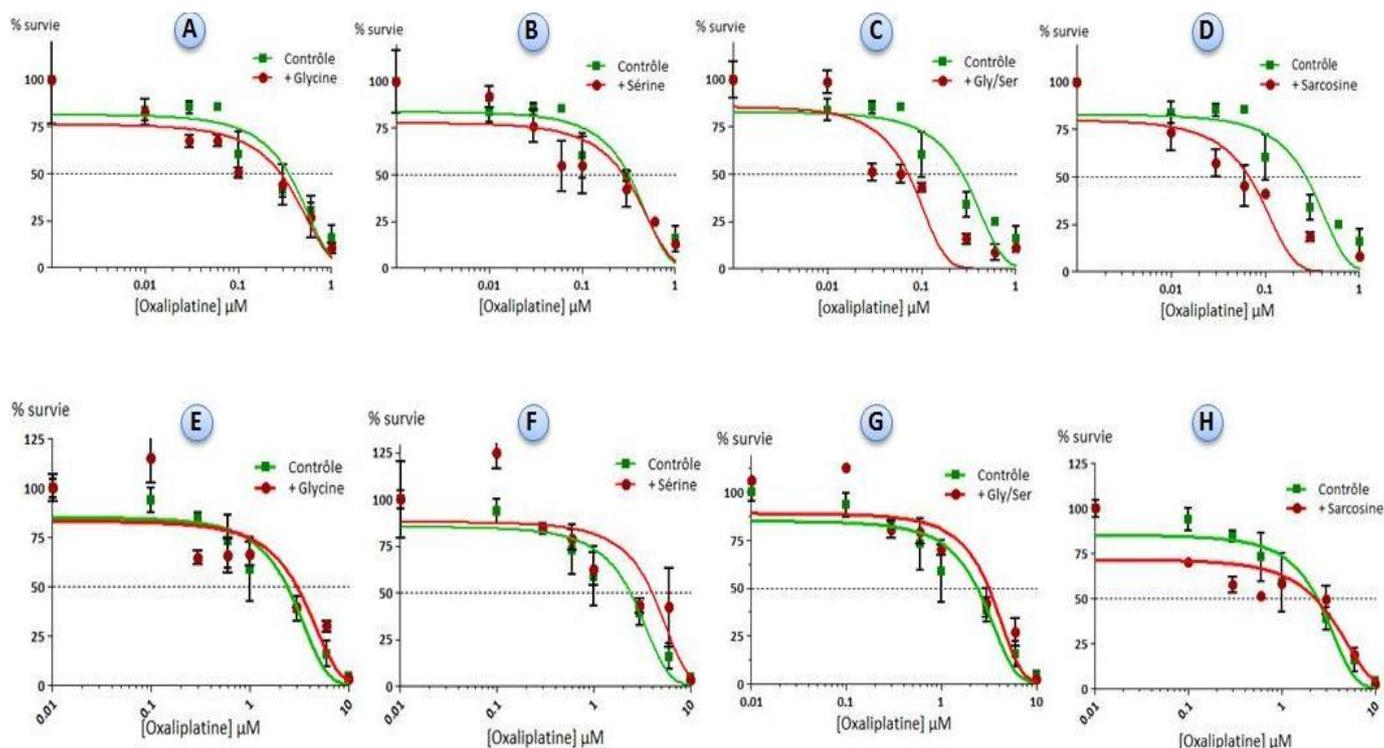


Figure 48 – Effet de l'altération de l'équilibre glycine-sérine sur la sensibilité des lignées CHO à l'oxaliplatine.

Les cellules ont été cultivées 48 h dans un milieu enrichi en glycine (A et E), en sérine (B et F), en glycine et en sérine (C et G) ou en sarcosine (D et H) avant d'être traitées pendant 72 h par l'oxaliplatine. Les résultats des tests MTT sont exprimés en % de survie en fonction de la concentration en oxaliplatine et représentent la moyenne \pm SD de deux expériences indépendantes réalisées en triplicate.

Les résultats présentés en figure 48A et B, montrent que l'apport exogène de fortes concentrations en glycine ou en sérine n'affecte pas la sensibilité des cellules CHO K1 à l'oxaliplatine. En revanche, l'apport conjoint de glycine et de sérine entraîne une sensibilisation des cellules CHO K1 à l'oxaliplatine (d'un facteur 4 environ), une différence qui n'est pas observée pour la lignée CHO 51-11 (Fig. 48G). De façon intéressante, un résultat similaire est obtenu pour un milieu enrichi en sarcosine (sensibilisation de la lignée CHO K1 à l'oxaliplatine d'un facteur 4 également). Ces résultats confirment que la dérégulation du pool de glycine et de sérine intervient dans la modulation de la sensibilité cellulaire à l'oxaliplatine. La sensibilisation observée par l'apport d'un mélange glycine-sérine ou de sarcosine est probablement à mettre en relation avec une activation du cycle ayant pour but de consommer ces acides aminés exogènes. Ce phénomène nécessite l'activité de SHMT2 puisqu'aucun effet n'est observé dans la lignée CHO 51-11 (Fig. 48E à H). Par

opposition, un blocage du cycle par la diminution du niveau d'expression des SHMT confère une résistance à l'oxaliplatine.

Les résultats sur le cisplatine n'ont montré aucune différence dans toutes les conditions testées (résultats non présentés) démontrant une fois de plus, la spécificité de ce mécanisme vis-à-vis de l'oxaliplatine.

IV. DEGRÉ DE MÉTHYLATION ET SENSIBILITÉ À L'OXALIPLATINE

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'augmentation de la concentration en différents métabolites comme la glycine ou la sarcosine témoigne de dérégulations du métabolisme qui sont associés au développement du cancer de la prostate. La dérégulation du cycle glycine-sérine peut, dans ce cadre, influencer indirectement le niveau de méthylation de l'ADN dont on sait par ailleurs qu'il modifie la sensibilité aux dérivés du platine. Nous avons donc voulu étudier si la résistance à l'oxaliplatine que nous observions en réponse à la diminution du niveau d'expression des SHMT pouvait être liée à une différence de niveau de méthylation de l'ADN.

Nous avons considéré dans un premier temps l'étude du niveau de méthylation globale de l'ADN par mesure de la méthylation de 4 CpG du gène LINE-1. La quantification du niveau de méthylation des cytosines de ces CpG est effectuée par pyroséquençage. Nous avons dans un premier temps validé la méthodologie en mesurant le niveau de méthylation de différents ADN contrôles reflétant un statut d'hyperméthylation, d'hypométhylation et deux statuts de méthylation intermédiaires (66 et 33 %, respectivement). Les résultats de la figure 49A montrent le niveau de méthylation obtenu pour ces 4 ADN témoins. Il est à noter que l'ADN non-méthylé ressort de l'analyse aux alentours de 6 % de méthylation et qu'à l'inverse, un ADN supposé 100 % méthylé ne ressort qu'à un taux de 85 % de méthylation. L'analyse du taux de méthylation de l'ADN génomique des 3 lignées prostatiques DU145, LNCaP et BPH, révèle que seule la lignée LNCaP présente un ADN faiblement méthylé (taux d'environ 33 %), alors que les lignées DU145 et BPH apparaissent comme hyperméthylées avec un niveau de méthylation de 81 et 73 %, respectivement (Fig. 49B). Il est intéressant de noter que la sensibilité de ces lignées aux dérivés du platine est inversement proportionnelle au niveau de méthylation global de leur ADN tel que nous l'avons évalué (Fig. 49C et D). De façon intéressante, cette relation est plus marquée pour l'oxaliplatine que pour le cisplatine,

puisque la lignée LNCaP est environ 13 fois plus sensible à l'oxaliplatine que la lignée DU145 alors qu'elle n'est que 4 fois plus sensible au cisplatine. De même, on note que la « faible » différence de niveau de méthylation entre la lignée BPH et la lignée DU145 (73 contre 81 %) se traduit par une assez forte différence de sensibilité à l'oxaliplatine (la lignée DU145 étant 3 fois plus résistante que la lignée BPH) alors qu'elle n'est pas accompagnée d'une différence significative de sensibilité au cisplatine. Cette donnée suggère qu'une faible différence de méthylation globale peut avoir une répercussion importante sur la sensibilité à l'oxaliplatine qu'elle n'a pas (ou beaucoup moins) sur la sensibilité au cisplatine.

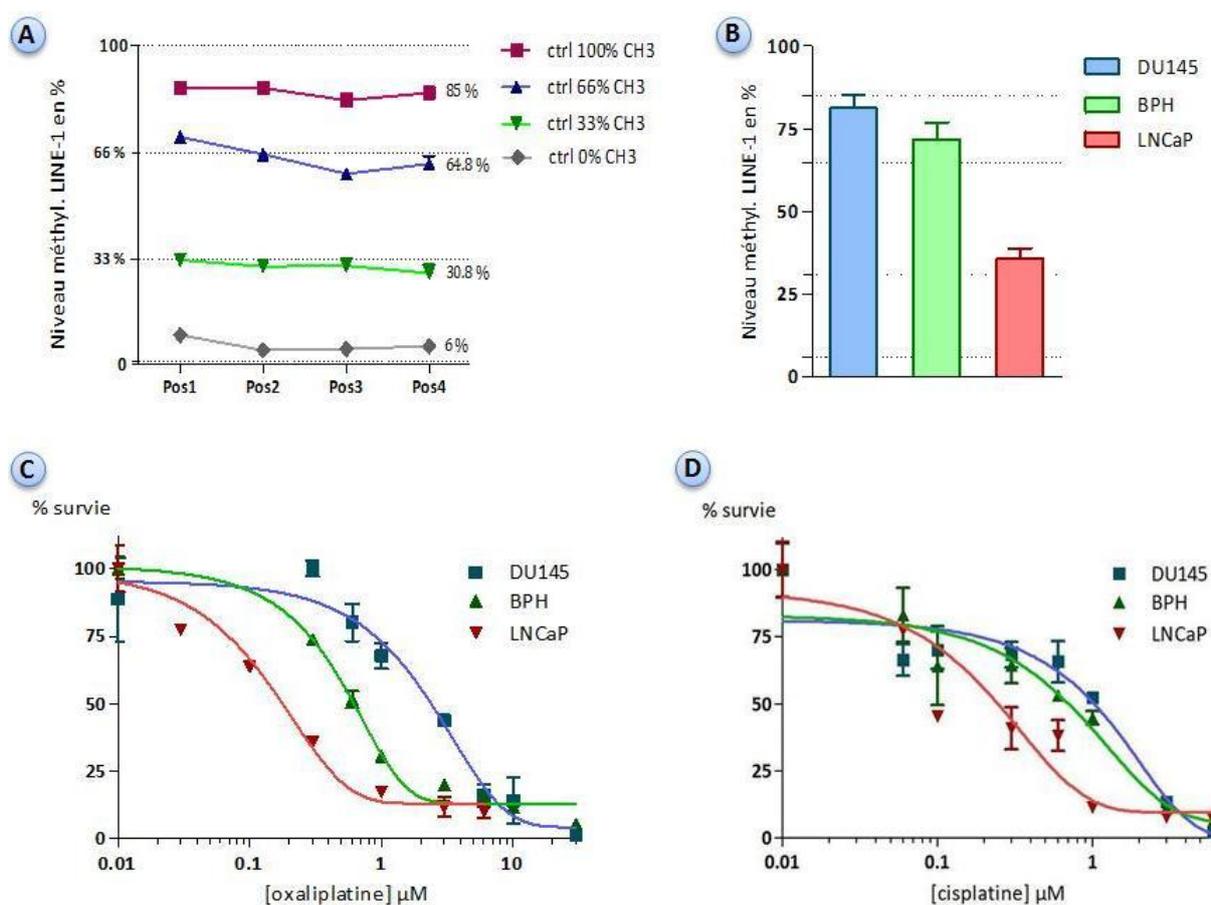


Figure 49 – Lien entre le niveau de méthylation globale des lignées et la sensibilité aux dérivés du platine.

A, mesure du niveau de méthylation globale des différents ADN contrôles par pyroséquençage. *B*, mesure du niveau de méthylation de LINE-1 dans l'ADN des différentes lignées prostatiques par pyroséquençage. *C* et *D*, résultats des tests de sensibilité des lignées prostatiques à l'oxaliplatine et au cisplatine, respectivement, après un traitement continu de 72 h. La survie cellulaire a été évaluée par un test au MTT (DU145 et BPH) ou par coloration au cristal violet (LNCaP).

Dans ce contexte nous avons donc étudié l'effet de la régulation de *SHMT2* ou de *SHMT1*, dont on sait que la diminution de leur niveau d'expression induit une résistance des cellules DU145 et LNCaP à l'oxaliplatine, sur le niveau de méthylation globale de l'ADN (Fig. 50). Les résultats montrent que leur diminution d'expression n'induit aucun changement significatif du niveau de méthylation globale de l'ADN de la lignée BPH (Fig. 50A). Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où la modulation des deux SHMT ne modifie pas la sensibilité de cette lignée à l'oxaliplatine. Le même type de résultat est obtenu dans la lignée DU145, dans laquelle on ne note pas de modification du niveau de méthylation (Fig. 50B). Cependant, il semble que pour cette lignée, le niveau de méthylation basal soit déjà au « maximum » de ce que la technique du pyroséquençage peut mesurer. Il est donc difficile, dans ces conditions expérimentales, de mettre en évidence une augmentation de méthylation que l'on s'attend à avoir en réponse à une diminution du niveau d'expression de *SHMT1* et/ou de *SHMT2*. En revanche, pour la lignée LNCaP, pour laquelle le niveau basal de méthylation global est faible (environ 33 %), on peut remarquer que la diminution d'expression de l'une ou l'autre des deux isoformes de SHMT, entraîne une augmentation du niveau global de méthylation de l'ADN, ce niveau passant à une valeur de plus de 40 %, soit une différence comparable à celle qui existe entre la lignée BPH et DU145 qui présentent une différence de sensibilité à l'oxaliplatine d'un facteur 3 (Fig. 50C).

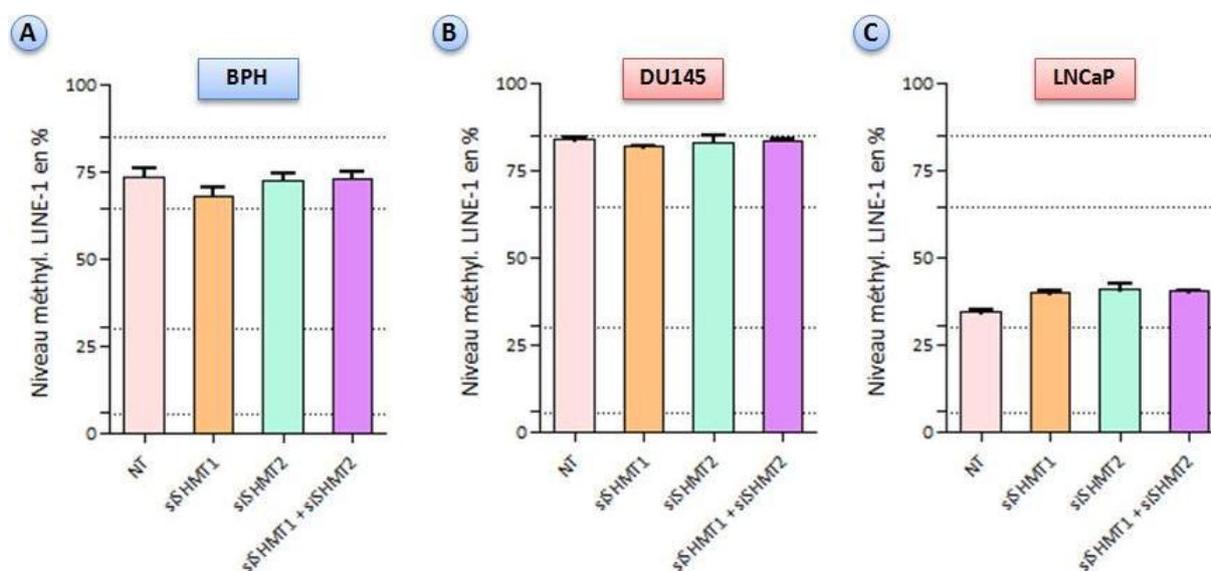


Figure 50 - Effet de la modulation du niveau d'expression des SHMT sur le niveau de méthylation globale des lignées prostatiques.

Les cellules ont été transfectées pendant 48 h avec les siRNA correspondants puis l'ADN génomique a été extrait pour analyser le taux de méthylation de LINE-1 par pyroséquençage. A, B et C, effets de la diminution du niveau d'expression des SHMT sur le taux de méthylation globale de la lignée BPH, DU145 et LNCaP, respectivement.

L'augmentation, bien que modeste, du taux de méthylation de l'ADN de la lignée LNCaP représente un résultat encourageant car nous avons montré qu'une faible différence dans le taux de méthylation globale de l'ADN pouvait avoir des répercussions importantes sur la sensibilité à l'oxaliplatine (Fig. 49).

Il nous a semblé pertinent, pour valider ces résultats, d'utiliser la stratégie inverse qui est d'induire une diminution significative du taux de méthylation globale des lignées cellulaires en utilisant un agent déméthylant et de mesurer son impact sur la sensibilité des cellules aux dérivés de platine. Pour cela, nous avons été amenés à tester différentes concentrations de 5-azacytidine (de 2 à 5 μM) afin de déterminer les conditions optimales de déméthylation pour chaque lignée cellulaire utilisée (Fig. 51).

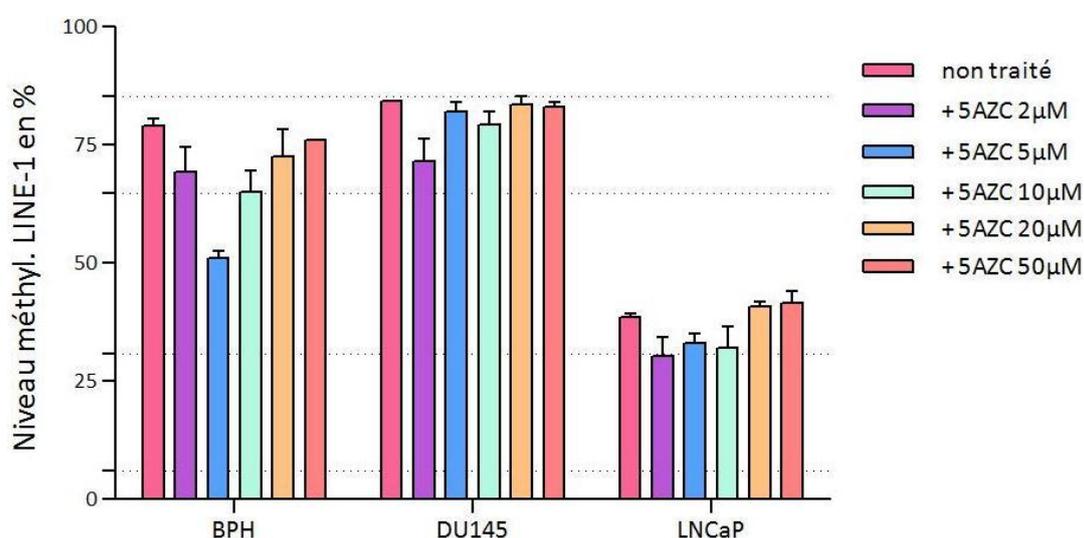


Figure 51 - Effets de la 5-azacytidine sur le niveau de méthylation global de l'ADN des lignées cellulaires prostatiques.

Les cellules ont été traitées, toutes les 24 h, par les concentrations indiquées de 5-azacytidine sur une durée totale de 72 h (lignées DU145 et BPH) ou 120 h (lignée LNCaP). L'ADN génomique a été extrait pour analyser le taux de méthylation de LINE-1 par pyroséquence.

De manière inattendue, ce sont les concentrations les plus faibles en azacytidine qui ont permis d'obtenir les meilleurs niveaux de déméthylation avec un effet maximal de 28 % pour la lignée BPH à une concentration de 5 μM de 5-azacytidine (Fig. 51). Pour les lignées DU145 et LNCaP, en revanche, nous n'avons pu réduire le niveau de méthylation que de 13 et 9 %, respectivement, avec une concentration de 5-azacytidine de 2 μM . Il nous faut donc

améliorer les conditions de déméthylation de l'ADN de ces lignées, par des temps d'incubation de 5-azacytidine plus longs, ou grâce à l'utilisation d'autres agents déméthylants, avant de pouvoir tester l'effet de cette déméthylation sur la cytotoxicité des dérivés de platine. Ce travail est toujours en cours.

DISCUSSION

Sommaire

I. APPROCHE <i>IN SILICO</i> ET VALIDATION FONCTIONNELLE	183
II. DÉRÉGULATION DU POOL GLYCINE-SÉRINE ET MÉTHYLATION	188

I. APPROCHE *IN SILICO* ET VALIDATION FONCTIONNELLE

Les cancers de la prostate de haut grade représentent une catégorie particulière de cancers dont la prise en charge actuelle reste pourtant identique à celle des autres cancers de la prostate. L'utilisation de la chimiothérapie dans cette indication date d'une dizaine d'années environ (Tannock *et al.* 1996; Kantoff *et al.* 1999; Oh and Kantoff 1999). Actuellement, les deux molécules qui sont approuvées appartiennent à la même famille chimique des taxanes : le docétaxel en première ligne (Oh and Kantoff 1999; Picus and Schultz 1999; Petrylak *et al.* 2004; Tannock *et al.* 2004) et très récemment le cabazitaxel en deuxième ligne (de Bono *et al.* 2010; Paller and Antonarakis 2011). Malheureusement, l'utilisation de ces médicaments ne permet pas d'entrevoir des régressions durables de la maladie. Etant donné l'augmentation constante du nombre de cancers de la prostate, il est donc crucial d'identifier de nouvelles alternatives thérapeutiques aux taxanes. Beaucoup d'essais ont été réalisés avec d'autres médicaments (Mike *et al.* 2006), mais les résultats obtenus sont décevants malgré quelques réponses intéressantes, probablement du fait que les populations de patients inclus dans ces essais étaient hétérogènes en ce qui concerne les caractéristiques de leurs tumeurs et en particulier le grade de Gleason.

L'objectif principal de notre travail de Thèse était de proposer une stratégie de recherche d'alternatives thérapeutiques sur une base rationnelle qui prenne en compte les caractéristiques génétiques spécifiques des tumeurs de haut grade. Nous avons donc recherché dans la littérature s'il existait des études pouvant donner accès à ce type de caractéristiques. Avant le démarrage de ce projet, la plupart des études de transcriptomique avaient identifié des signatures d'expression de gènes permettant de différencier les tissus normaux des tissus cancéreux prostatiques (Dhanasekaran *et al.* 2001; Luo *et al.* 2001; Welsh *et al.* 2001; Luo *et al.* 2002; Best *et al.* 2005). Mais seules trois études avaient spécifiquement pris en compte le grade pour tenter d'identifier des signatures d'expression permettant de distinguer les tumeurs de haut grade des tumeurs de bas grade. Les deux premières études publiées en 2002 et en 2004, avaient comparé l'expression de plus de 20000 gènes entre des tumeurs de prostate de haut grade et de bas grade en prenant en compte le score de Gleason. Elles ont permis d'identifier deux signatures de 29 et 41 gènes, respectivement, permettant de classer les tumeurs en fonction de leur score (Singh *et al.* 2002; Lapointe *et al.* 2004). L'inconvénient de ces études résidait dans le fait que

l'expression des gènes avait été mesurée à partir d'ARN extraits d'échantillons de tumeurs non micro-disséqués, aboutissant obligatoirement à l'analyse d'un mélange de plusieurs grades étant donné l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs prostatiques. Ce type d'échantillonnage rend notamment difficile l'interprétation des résultats pour les tumeurs possédant un score de Gleason de 7 (souvent très représentées) pouvant correspondre à un bas grade ou à un haut grade selon que 7 correspond à des grades 3 + 4 ou à des grades 4 + 3. De plus, l'étude d'un matériel non micro-disséqué introduit un risque de contamination non négligeable par des cellules du stroma adjacent. Or, il est maintenant bien documenté qu'au sein d'une tumeur, certains gènes du stroma environnant sont extrêmement dérégulés au niveau transcriptionnel (Cunha and Matrisian 2002). On peut citer l'exemple du gène *SPARC*, qui fait partie de la signature de Lapointe et qui est également trouvé dérégulé dans l'étude de Singh, qui est retrouvé surexprimé dans les cellules stromales de tumeurs du poumon non-à-petites cellules (Koukourakis et al. 2003), ou de tumeurs pancréatiques (Sato et al. 2003). La troisième étude plus récente a comparé l'expression de plus de 7700 gènes entre tumeurs de haut grade et de bas grade, mais en utilisant une stratégie de microdissection des échantillons tumoraux analysés avant d'en extraire les ARNs pour l'analyse *microarray*, évitant ainsi tout problème de mélange de grades et de contamination par le stroma (True *et al.* 2006). Bien que le nombre de gènes analysés dans cette étude soit bien inférieur aux deux autres études, la signature de 86 gènes obtenue permet de prédire le grade avec une fiabilité de 81% (True *et al.* 2006). Cette fiabilité passe à 84% et 90% si l'on réduit le nombre de gènes à 64 et 40, respectivement. Nous avons pour ces raisons décidé de choisir cette signature d'expression de 86 gènes comme point de départ à notre étude.

L'objectif était d'utiliser cette signature pour rechercher par une approche *in silico* originale, des corrélations entre le niveau d'expression de ces gènes et la sensibilité cellulaire à une série d'agents antiprolifératifs. Nous avons pour cela été amené à utiliser une deuxième source d'informations provenant du *Developmental Therapeutic Program* du NCI qui contient les données d'expression de milliers de gènes dans 59 lignées cancéreuses de diverses origines tissulaires et le niveau de sensibilité de ces lignées à des centaines d'agents cytotoxiques (sous forme de $-\log IC_{50}$). L'existence de ce panel (développé il y a 30 ans) a non seulement accéléré le screening d'un grand nombre de molécules actives de sources académiques et industrielles, mais a également permis de fournir de précieuses informations relatives aux mécanismes d'actions des molécules testées (Shoemaker 2006).

Le développement d'outils tels que l'algorithme COMPARE permet d'automatiser la comparaison des profils de cytotoxicité au sein de ce panel et donne des indications sur les mécanismes d'action potentiels des drogues testées (Paull *et al.* 1989). Bien que ce panel ne contienne que deux lignées cancéreuses prostatiques (les lignées DU145 et PC3), il permet aussi d'avoir accès aux niveaux d'expression de milliers de gènes dans chacune des lignées et de rechercher des corrélations entre le niveau d'expression des gènes et la sensibilité aux drogues indépendamment du tissu d'origine, ce qui peut renseigner sur l'implication éventuelle d'un ou plusieurs gènes dans le mécanisme d'action d'une drogue ou d'une famille de drogue.

Notre travail a donc consisté à « croiser » les données d'expression des 86 gènes que nous avons extraits du panel et les données de sensibilité à 152 agents antiprolifératifs représentant la majorité des classes de médicaments. Comme nous l'avons vu, ce type d'approche nécessite de contrôler la qualité des données extraites pour ne retenir que celles qui ne présentent aucun biais concernant les résultats d'expression. Nous avons éliminé 14 puces identifiées comme *outliers* pour lesquelles un problème existait : dépôt des spots non homogène lors de la fabrication de la puce, hybridation non-homogène sur la puce, bruit de fond trop important, etc. Cette approche a également nécessité un « tri » des données dans le cas où plusieurs expériences de *microarray* étaient disponibles pour un même gène. Cela nous a amené à exclure des gènes de notre analyse soit parce qu'il n'existait qu'une expérience de *microarray* pour ce gène, soit parce qu'aucune des multiples expériences n'étaient corrélées entre elles, soulignant probablement un mauvais choix des sondes d'ADNc utilisées pour l'hybridation.

Au final, l'approche in silico nous a permis de mettre en évidence 382 corrélations à un seuil de significativité de 0,05 ($r < -0,2$ ou $r > +0,2$), ce qui ne représente que 2,3 % du nombre de tests de corrélation effectués. Comme pour toute étude de ce type, le choix du seuil de significativité est critique. Il conditionne le nombre de corrélations obtenues et doit donc être suffisamment bas pour minimiser le nombre de « faux positifs », mais pas trop bas pour ne pas éliminer des corrélations potentielles. Un seuil de 0,01 ($r < -0,3$ ou $r > +0,3$), aurait conduit à une réduction de 2/3 du nombre de corrélations. Comme on pouvait s'y attendre, nous avons identifié des corrélations pour toutes les catégories d'agents antiprolifératifs étudiées. Certaines d'entre elles nous ont confortés quant au rationnel de l'approche choisie comme par exemple celle du niveau d'expression du gène *TOP2A* qui est retrouvée corrélée

avec beaucoup d'inhibiteurs d'ADN topoisomérases II (Tableau 21). Les résultats montrent également que le niveau d'expression de certains gènes se retrouve corrélé avec la sensibilité à beaucoup de catégories d'agents, suggérant que ces gènes n'ont pas de rôle spécifique dans le mécanisme d'une classe d'agents mais plutôt un rôle plus global dans la réponse cellulaire aux signaux de stress induits par ces agents (cas de *HIRIP3*, *HMGB1*, *EIF4A1*, *CD59*, *FLJ35093*, *NPC2*, *RPL13* et *ATP5G3*). A l'inverse l'expression de certains gènes (*FEN1*, *PGK1*, *DPM1*, *AIDA*, *CDKN2C*, *SPC12*, *HSD17B4*, *NDUFB3*, *ATP6V1F*, *RHOA*, *AZGP1* et *c14orf87*) a été retrouvée corrélée à la sensibilité à un seul agent ou à une seule catégorie d'agents (en particulier les ITK), suggérant dans ce cas une possible spécificité de ces gènes dans le mécanisme d'action de ces agents. Ces corrélations offrent donc la possibilité d'identifier des molécules dont le niveau de cytotoxicité est directement relié à l'expression de gènes que l'on trouve spécifiquement dérégulés dans les cancers de la prostate de haut grade.

Etant donné le grand nombre de corrélations identifiées par cette approche *in silico*, il est évident qu'un choix s'imposait pour limiter le nombre de validations fonctionnelles à réaliser. Si l'on considère que l'objectif était d'identifier des drogues utilisables en alternatives aux taxanes, il nous paraissait logique de considérer en priorité des médicaments ayant déjà obtenu leur AMM dans d'autres indications et/ou ayant déjà été testés en clinique. Nous nous sommes intéressés en priorité aux dérivés du platine. Cela était d'autant plus justifié que ces dérivés avaient déjà fait l'objet de multiples essais dans le cancer de la prostate, seuls ou en association. Hormis les essais réalisés en monothérapie avec le cisplatine ou le carboplatine dans les années 80, dont les résultats négatifs doivent être pris avec précaution étant donné l'absence de marqueurs de réponses validés à cette époque (Oh *et al.* 2007), les essais réalisés en association avec d'autres drogues ont permis d'obtenir des résultats plus intéressants pour le carboplatine ou l'oxaliplatine (Droz *et al.* 2003). L'oxaliplatine seul ou en association avec le 5-Fluorouracile a permis d'obtenir des réponses biologiques chez 14 et 19 % de patients non sélectionnés (Droz *et al.* 2003). En association avec la capécitabine, l'oxaliplatine a montré une réduction du niveau de PSA chez plus de la moitié des patients traités (Gasent Blesa *et al.* 2011). On peut formuler l'hypothèse que les réponses observées soient liées à une catégorie particulière de patients, une hypothèse qui nécessiterait de faire des essais en stratifiant sur le grade par exemple. L'autre raison qui a guidée le choix des sels de platine est que les corrélations obtenues avaient une certaine « spécificité » vis-à-vis des DACH-platines. En effet, nous avons identifié

12 gènes dont le niveau d'expression était corrélé à la sensibilité aux DACH platine (oxaliplatine et tétraplatine) mais pas aux platines dits « classiques » (carboplatine et cisplatine). Nous avons donc décidé de valider les corrélations obtenues par l'approche *in silico* pour l'oxaliplatine pour 9 des 12 gènes, trois gènes ayant été mis de côté pour des raisons diverses comme l'absence de spécificité vis-à-vis de l'oxaliplatine, ou l'absence d'anticorps disponibles. Nous avons également utilisé le cisplatine comme « contrôle négatif » pour tester la spécificité des corrélations obtenues.

La validation fonctionnelle a été réalisée dans deux lignées de cancers de prostate, l'une hormono-sensible (LNCaP), l'autre hormono-résistante (DU145). Ces deux lignées représentent les lignées de cancer de la prostate les mieux caractérisées sur le plan génétique et les plus utilisées (van Bokhoven *et al.* 2003). Nous avons de plus montré qu'elles possédaient (pour 7 des 9 gènes corrélés à l'oxaliplatine) un profil d'expression basal (mesuré par rapport aux cellules BPH « normales ») comparable à celui des tumeurs de haut grade, tel que défini dans l'étude de True *et al.* Idéalement, il aurait été nécessaire de comparer l'expression des 86 gènes dans ces deux lignées pour pouvoir le déterminer avec une plus grande fiabilité.

Même s'il existe quelques divergences par rapport à l'approche *in silico*, les résultats des tests de validation *in vitro* montrent globalement que la répression des gènes candidats induit bien une altération de la sensibilité de ces deux lignées à l'oxaliplatine mais pas au cisplatine, ce qui conforte le choix de notre stratégie de départ ainsi que l'intérêt d'utiliser le panel du NCI comme source de données. Parmi les résultats non attendus, le gène *EIF4A1* dont la répression induit bien une altération de la sensibilité des cellules à l'oxaliplatine, mais dans le sens inverse de la prédiction *in silico*. Ce résultat ne s'explique pas par un niveau d'expression basal dans les lignées DU145 et LNCaP qui ne répond pas au profil « haut grade », puisque pour le gène *DPM1*, dont le profil est identique à *EIF4A1*, la validation va dans le sens de la prédiction *in silico*. Nous avons également mis en évidence que le niveau d'expression de *SHMT2* et d'*EIF4A1* pour la lignée DU145, ainsi que le gène *CDKN2C* pour la lignée LNCaP modulait la sensibilité de ces cellules au cisplatine, ce qui n'était pas attendu. De façon intéressante, nous n'avons montré aucune modulation de la sensibilité de la lignée BPH aux dérivés du platine. Cela souligne l'importance du contexte tumoral dans cette spécificité de réponse à l'oxaliplatine.

Malgré une recherche bibliographique détaillée, il n'a pas été possible d'établir de liens mécanistiques entre les 9 gènes étudiés et un quelconque facteur pouvant expliquer leur capacité à moduler la réponse à l'oxaliplatine. Notre approche constitue donc un outil de criblage intéressant pour identifier des gènes qui n'ont, a priori, jamais été reliés au mécanisme d'action de certains médicaments, ce qui permet d'identifier de nouveaux marqueurs de réponses.

L'obtention de cette « signature » d'expression de 9 gènes représente la preuve de concept de la validité de notre approche originale. Même s'il est difficile de déterminer a priori combien de gènes sont nécessaires pour considérer qu'une « signature » de réponse est utilisable en clinique, nos résultats permettent au moins de fournir un rationnel pour envisager que l'oxaliplatine puisse être proposé en alternative aux taxanes dans les cancers de la prostate de haut grade.

Très récemment deux études, l'une sur tissus non-microdisséqués (Cuzick *et al.* 2011) et l'autre sur tissus micro-disséqués (Penney *et al.* 2011), ont également mis en évidence des signatures d'expression génique spécifiques des hauts grades de Gleason. Sur les 31 gènes du cycle cellulaire composant la première signature, 5 seulement étaient présent sur la puce utilisée dans l'étude de True *et al.* sans qu'aucun ne se retrouve dans les 86 gènes corrélés. Dans la deuxième étude, l'expression de 157 gènes est caractéristique des hauts grades (Penney *et al.* 2011). Parmi ces gènes, 41 sont présents sur la puce utilisée dans l'étude de True *et al.*, dont 4 (*AZGP1*, *DPP4*, *MYBPC1* et *SHMT2*) font partie de la signature caractéristique des hauts grades. 26 et 116 gènes des signatures de Cuzick et Penney, respectivement, n'étaient donc pas présent sur la puce utilisée dans l'étude de True. Il est évident que ces gènes doivent être pris en compte dans notre approche *in silico* afin de renforcer éventuellement notre signature.

II. DÉRÉGULATION DU POOL GLYCINE-SÉRINE ET MÉTHYLATION

Comme nous l'avons montré précédemment, la signature d'expression que nous avons identifiée semble spécifique de l'oxaliplatine. Nous avons voulu appréhender le mécanisme de cette spécificité en nous intéressant particulièrement au gène de la sérine hydroxyméthyl-transférase 2 (*SHMT2*) qui joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme monocarboné (Appling 1991; Stover *et al.* 1997; Tibbetts *et al.* 2010), une voie

cellulaire souvent dérégulée dans les cancers (Niclot *et al.* 2006; Weinstein *et al.* 2006; Kasperzyk *et al.* 2009; Bistulfi *et al.* 2010; Hazra *et al.* 2010; Levine *et al.* 2010; Mohammad *et al.* 2011). SHMT2, au même titre que son isoforme cytoplasmique SHMT1 (Garrow *et al.* 1993; Anderson *et al.* 2009), régule le pool de glycine et de sérine entre la mitochondrie et le cytoplasme. Or il a été montré que la glycine, au même titre que plusieurs autres métabolites impliqués dans cette voie, se retrouve en plus forte concentration dans les tissus cancéreux de prostate et plus particulièrement au niveau des métastases, l'apport exogène de glycine provoquant une induction du caractère invasif de cellules à la base non-invasives (Sreekumar *et al.* 2009). Le cycle glycine-sérine est par ailleurs interconnecté avec le cycle du tétrahydrofolate et le cycle de la méthionine. En effet, la sérine est le donneur de groupement monocarboné (C1) pour le THF, qui permet la synthèse des bases de l'ADN mais également la synthèse de méthionine. Le cycle de la méthionine est quant à lui impliqué dans les réactions de méthylation de plusieurs substrats, dont l'ADN, assurant la régulation épigénétique du génome.

Nous avons donc essayé de comprendre comment la répression de SHMT2, et les altérations des différentes voies qui en découle, pouvait conduire à une résistance spécifique à l'oxaliplatine. Nous avons montré que c'est l'inhibition de l'activité de SHMT2 qui était responsable de l'effet observé puisque des cellules exprimant une protéine SHMT2 ne possédant pas d'activité enzymatique (CHO 51-11) montrent également une forte résistance à l'oxaliplatine par rapport aux cellules contrôles (CHO K1) alors qu'elles sont plus sensibles au cisplatine. Ce résultat suggérait donc qu'une dérégulation du pool glycine sérine lui-même pouvait conduire à une résistance à l'oxaliplatine. Nous avons confirmé cette hypothèse en montrant que la répression de SHMT1, l'isoforme cytoplasmique de SHMT (Garrow *et al.* 1993), induisait également une résistance sélective des cellules à l'oxaliplatine. La répression de SHMT1 confère néanmoins un niveau plus faible de résistance ce qui peut être expliqué par le fait qu'un variant d'épissage de SHMT2 dans lequel l'exon 1 est manquant est capable de produire une protéine dont la présence dans le cytoplasme compense la déficience en SHMT1 (Anderson and Stover 2009). Il se peut que le niveau d'expression de SHMT1, qui n'est pas représenté sur la puce utilisée dans l'étude de True *et al.*, puisse être également utilisé pour discriminer les bas grades des hauts grades. De manière plus large, nous avons également montré qu'une perturbation du cycle glycine-sérine déclenchée par l'apport exogène de fortes concentrations en ces deux acides aminés pouvait altérer spécifiquement la sensibilité des cellules à l'oxaliplatine, suggérant au final

qu'une dérégulation globale de ce pool est responsable de la modulation de la réponse à l'oxaliplatine. Les cancers de prostate de haut grade ayant justement une dérégulation spécifique du métabolisme monocarboné sont donc plus enclins à répondre à ce type de chimiothérapie, puisqu'ils expriment, à l'état basal un niveau élevé de SHMT2 (True *et al.* 2006; Penney *et al.* 2011), et peuvent donc en théorie répondre favorablement à ce dérivé de platine.

Ces résultats confirment non seulement que l'inhibition de *SHMT2*, ou plus généralement du cycle sérine-glycine, altère spécifiquement la sensibilité cellulaire à l'oxaliplatine, mais confirment également la différence de mode d'action entre l'oxaliplatine et le cisplatine. Le fait que des lignées résistantes au cisplatine restent sensibles à l'oxaliplatine (Burchenal *et al.* 1980; Fukuda *et al.* 1995; Dunn *et al.* 1997; Chaney *et al.* 2005) suggérait déjà une telle différence de mode d'action, probablement liée à une différence des adduits formés par ces deux dérivés du platine (Chaney *et al.* 2005). Structuralement, l'oxaliplatine diffère du cisplatine par la présence d'un groupement DACH et d'un radical oxalate. Lorsqu'il est administré, l'oxaliplatine est métabolisé en DACH platine avec la libération d'une molécule d'oxalate, responsable de la neurotoxicité de l'oxaliplatine (Gamelin *et al.* 2007). Nos résultats montrent que seule la partie DACH platine est responsable de la spécificité de l'effet que nous observons, puisque l'apport exogène d'oxalate n'est pas capable de moduler la sensibilité des cellules au cisplatine alors qu'un dérivé similaire à l'oxaliplatine ne comprenant de groupement oxalate (le dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II)), possède le même profil d'activité que l'oxaliplatine dans les lignées CHO K1 et CHO 51-11 (Fig. 46).

Des études ont déjà montré que certaines protéines spécifiques du système de réparation de *MisMatch Repair* (MMR), comme hMSH2 ou MutS, se liaient avec plus d'affinité sur les adduits formés par le cisplatine que sur les adduits formés par l'oxaliplatine (Fink *et al.* 1996; Zdraveski *et al.* 2002), ce qui, au niveau cellulaire, peut se traduire par le fait qu'une déficience en MMR n'affecte que très peu la sensibilité des cellules à l'oxaliplatine alors qu'elle rend les cellules résistantes au cisplatine (Vaisman *et al.* 1998). De même, certaines protéines de reconnaissance des dommages à l'ADN comme TBP, hUBF ou HMG1 reconnaissent et se lient avec une plus forte affinité aux adduits de cisplatine qu'aux adduits d'oxaliplatine (Coin *et al.* 1998; Zhai *et al.* 1998; Wei *et al.* 2001). L'efficacité de « contournement » (*bypass*) par les polymérases translésionnelles est également différente

en fonction du type d'adduit, les adduits formés par l'oxaliplatine étant plus facilement contournés par les polymérase β et η que les adduits formés par le cisplatine (Vaisman *et al.* 2000; Vaisman *et al.* 2000; Bassett *et al.* 2003). L'ensemble de ces données suggèrent donc que l'effet de la répression de *SHMT2*, ou des facteurs clés régulant le pool glycine-sérine, sur la sensibilité cellulaire à l'oxaliplatine puisse passer par une dérégulation des systèmes de reconnaissance et/ou de contournement de lésions, spécifiquement activés par les adduits d'oxaliplatine. Pour ne citer qu'un exemple, on sait que des cellules déficientes en ADN polymérase β , enzyme clé du système de réparation par excision de base (BER), sont hypersensibles à l'oxaliplatine, alors que cette déficience n'a aucun effet sur la sensibilité au cisplatine (Yang *et al.* 2010).

Une autre possibilité est que la résistance à l'oxaliplatine des cellules dans lesquelles le niveau de *SHMT2* (et/ou de *SHMT1*) est réduit puisse provenir d'une différence de la quantité d'adduits formés. L'une des hypothèses que nous avons testées est que le niveau de méthylation de l'ADN puisse influencer le degré de platination de l'ADN par l'oxaliplatine. Cette hypothèse reposait sur les données de la littérature montrant les interrelations entre le cycle glycine-sérine, le cycle du THF et celui de la méthionine intervenant dans la régulation du niveau de méthylation de l'ADN (Batra *et al.* 2010; Liu *et al.* 2010; Tibbetts and Appling 2010). Elle était également suggérée par le fait qu'il semble possible de prédire la sensibilité des lignées cellulaires composant le panel du DTP en analysant le profil de méthylation des promoteurs de certains gènes (Shen *et al.* 2007). L'hyperméthylation (et donc le « *silencing* ») de *p73*, homologue au gène *p53*, est par exemple associée avec la sensibilité aux agents alkylants. Nous avons donc étudié en premier lieu si la résistance à l'oxaliplatine observée en réponse à la diminution du niveau d'expression des *SHMT* pouvait être reliée à une différence dans la méthylation de l'ADN. Nous avons choisi d'étudier le niveau de méthylation globale de l'ADN plutôt que le niveau de méthylation de promoteurs de certains gènes, ne sachant pas à priori quels seraient les gènes dont le niveau de méthylation serait déterminant dans l'efficacité de l'oxaliplatine. Le niveau de méthylation globale de l'ADN a été évalué par l'étude de *LINE-1*. Ce transposon est une longue séquence hautement répétée dans le génome (17 à 25 %). Quatre CpG proches dans l'élément *LINE-1* ont été considérés pour cette mesure et sont « validés » comme représentant au mieux le niveau de méthylation globale du génome. Nous avons montré des différences de méthylation globale pour les lignées prostatiques à l'état basal, la lignée DU145 étant hyperméthylée alors que la lignée LNCaP est plutôt hypométhylée. La lignée BPH est

intermédiaire et possède un niveau de méthylation proche de celui de la lignée DU145. De façon intéressante, il existe une corrélation entre ces niveaux de méthylation et la sensibilité des lignées à l'oxaliplatine, un niveau de méthylation élevé étant accompagné d'une résistance de la lignée à ce dérivé. Ces différences sont beaucoup moins prononcées concernant la sensibilité au cisplatine. Il faut également noter qu'une différence de méthylation de l'ordre de 7 % entre les lignées DU145 et BPH est associée à une forte différence de sensibilité à l'oxaliplatine (de l'ordre de 3 fois) démontrant qu'une légère différence de méthylation globale peut avoir une répercussion importante sur la sensibilité à l'oxaliplatine.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet de la diminution du niveau d'expression des SHMT, dont on sait qu'elle induit une résistance à l'oxaliplatine, sur le niveau de méthylation globale de l'ADN. Nos résultats n'ont pas mis en évidence de différence de méthylation globale sur les lignées BPH et DU145. Pour la lignée BPH, ce résultat n'est pas surprenant car la diminution d'expression des *SHMT* n'a aucun effet sur la sensibilité de ces cellules aux deux dérivés du platine. Pour la lignée DU145, ce résultat est probablement lié au fait que le niveau de méthylation globale de la lignée DU145 est d'emblée trop proche du seuil de méthylation maximal qu'il est possible de détecter par la technique de pyroséquençage pour pouvoir mettre en évidence une augmentation de la méthylation. En revanche, pour la lignée LNCaP, possédant un niveau basal faible de méthylation, l'effet des siRNA anti-SHMT montre effectivement une augmentation du niveau de méthylation globale de l'ordre de 7 à 8 % qui est comparable à la différence observée entre la lignée BPH et la lignée DU145. Ce résultat préliminaire suggère donc que la résistance des cellules à l'oxaliplatine, induit par la répression de *SHMT2* (et ou *SHMT1*) implique, au moins en partie, une augmentation du niveau de méthylation global de l'ADN des cellules. Le fait que nous ayons montré qu'une faible différence du niveau de méthylation globale de l'ADN suffisait pour induire une différence de sensibilité à l'oxaliplatine, suggère éventuellement que ces modifications puissent être localisées sur certains promoteurs de gènes impliqués spécifiquement dans la réponse à l'oxaliplatine. L'étude de Shen *et al.* que nous avons mentionné précédemment montre clairement que le niveau basal de méthylation d'ilots CpG du gène P73 est prédictif de la réponse à la plupart des platines classiques (Shen *et al.* 2007). D'autres études réalisées en clinique ont également essayé de rechercher des corrélations entre le niveau de méthylation de promoteurs de gènes et l'acquisition du phénotype de résistance aux dérivés de platine. Une étude a par exemple montré qu'une augmentation du taux de méthylation

du gène *hMLH1* était associée à une résistance au cisplatine dans les cancers de l'ovaire (Watanabe *et al.* 2007), alors qu'une autre étude a déterminé qu'un taux élevé de méthylation du promoteur du gène *BRCA1* était associé à une plus grande sensibilité au cisplatine dans cette même indication (Chaudhry *et al.* 2009). En réalité, il semble que le phénomène soit plus complexe et que le phénotype de résistance au cisplatine soit la résultante de l'hypométhylation de certains gènes et de l'hyperméthylation d'autres gènes, ces derniers jouant certainement un rôle prépondérant dans l'acquisition de la résistance au cisplatine (Li *et al.* 2009; Chang *et al.* 2010).

Au cours de ce travail nous avons également envisagé de tester l'effet d'agents déméthylants sur la sensibilité à l'oxaliplatine, l'hypothèse étant que dans les cellules où ce niveau est élevé, comme la lignée DU145, la déméthylation soit accompagnée d'une plus grande sensibilité à l'oxaliplatine, mais n'ait pas ou peu d'effet sur la sensibilité au cisplatine. Ce type de démarche a déjà conduit à des résultats montrant que l'utilisation de la 5-azacytidine pouvait partiellement restaurer la sensibilité des tumeurs de l'ovaire au carboplatine, bien que cette étude n'ait pas mis en évidence de déméthylation au niveau global ou sur les promoteurs de certains gènes spécifiques (Fu *et al.* 2011). Une autre étude utilisant la décytabine, un inhibiteur de DNA méthyltransférases, a montré que cet agent permettait de sensibiliser des cellules de cancer de côlon à l'oxaliplatine (Flis *et al.* 2009). Il restera néanmoins à déterminer si un changement du niveau de méthylation peut avoir des conséquences sur le nombre d'adduits formés par le traitement des cellules à l'oxaliplatine, une hypothèse qu'il est possible de tester en mesurant la quantité des adduits formés et/ou la cinétique de formation de ces adduits. Ce type d'approche peut être réalisé *in vitro* en utilisant des ADN dont le niveau de méthylation est déjà calibré ou au niveau cellulaire par dosage des adduits formés en réponse aux traitements.

Notre travail a montré un lien entre la dérégulation du gène *SHMT2*, et plus globalement du cycle monocarboné, et une sensibilité « spécifique » à l'oxaliplatine, ce qui n'avait jamais été décrit auparavant. Même s'ils ne sont pas encore totalement élucidés, les mécanismes sur lesquels repose cette spécificité impliquent, au moins en partie, une dérégulation du niveau de méthylation de l'ADN.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- "Providence Prostate Cancer Evaluation." St John Providence Health System, from <http://www.stjohnprovidence.org/InnerPage.aspx?PageID=1446>.
- (2010). "Plan cancer 2009-2013 2ème Rapport d'étape."
- Abreu-Martin, M. T., A. Chari, A. A. Palladino, N. A. Craft and C. L. Sawyers (1999). "Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 activates androgen receptor-dependent transcription and apoptosis in prostate cancer." Mol Cell Biol **19**(7): 5143-5154.
- Anderson, D. D. and P. J. Stover (2009). "SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis." PLoS One **4**(6): e5839.
- Appling, D. R. (1991). "Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes." FASEB J **5**(12): 2645-2651.
- Balch, C., P. Yan, T. Craft, S. Young, D. G. Skalnik, T. H. Huang and K. P. Nephew (2005). "Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer." Mol Cancer Ther **4**(10): 1505-1514.
- Barrett, T., T. O. Suzek, D. B. Troup, S. E. Wilhite, W. C. Ngau, P. Ledoux, D. Rudnev, A. E. Lash, W. Fujibuchi and R. Edgar (2005). "NCBI GEO: mining millions of expression profiles--database and tools." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D562-566.
- Bassett, E., A. Vaisman, J. M. Havener, C. Masutani, F. Hanaoka and S. G. Chaney (2003). "Efficiency of extension of mismatched primer termini across from cisplatin and oxaliplatin adducts by human DNA polymerases beta and eta in vitro." Biochemistry **42**(48): 14197-14206.
- Batra, V., S. Sridhar and T. P. Devasagayam (2010). "Enhanced one-carbon flux towards DNA methylation: Effect of dietary methyl supplements against gamma-radiation-induced epigenetic modifications." Chem Biol Interact **183**(3): 425-433.
- Belpomme, D., P. Irigaray, M. Ossondo, D. Vacque and M. Martin (2009). "Prostate cancer as an environmental disease: an ecological study in the French Caribbean islands, Martinique and Guadeloupe." Int J Oncol **34**(4): 1037-1044.
- Best, C. J., J. W. Gillespie, Y. Yi, G. V. Chandramouli, M. A. Perlmutter, Y. Gathright, H. S. Erickson, L. Georgevich, M. A. Tangrea, P. H. Duray, S. Gonzalez, A. Velasco, W. M. Linehan, R. J. Matusik, D. K. Price, W. D. Figg, M. R. Emmert-Buck and R. F. Chuaqui (2005). "Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy." Clin Cancer Res **11**(19 Pt 1): 6823-6834.
- Bistulfi, G., E. Vandette, S. Matsui and D. J. Smiraglia (2010). "Mild folate deficiency induces genetic and epigenetic instability and phenotype changes in prostate cancer cells." BMC Biol **8**: 6.
- Bock, C. H., J. M. Cunningham, S. K. McDonnell, D. J. Schaid, B. J. Peterson, R. J. Pavlic, J. J. Schroeder, J. Klein, A. J. French, A. Marks, S. N. Thibodeau, E. M. Lange and K. A. Cooney (2001). "Analysis of the prostate cancer-susceptibility locus HPC20 in 172 families affected by prostate cancer." Am J Hum Genet **68**(3): 795-801.
- Bondil P. , G. A., Irani J. , Méria P. , Desgrandchamps F. "Prostate.fr." Le site des maladies de la prostate, from <http://www.prostate.fr/index2.php>.

- Bonkhoff, H. and R. Berges (2010). "From pathogenesis to prevention of castration resistant prostate cancer." Prostate **70**(1): 100-112.
- Boudny, V., O. Vrana, F. Gaucheron, V. Kleinwachter, M. Leng and V. Brabec (1992). "Biophysical analysis of DNA modified by 1,2-diaminocyclohexane platinum(II) complexes." Nucleic Acids Res **20**(2): 267-272.
- Braybrooke, J. P., N. C. Levitt, S. Joel, T. Davis, S. Madhusudan, H. Turley, S. Wilner, A. L. Harris and D. C. Talbot (2003). "Pharmacokinetic study of cisplatin and infusional etoposide phosphate in advanced breast cancer with correlation of response to topoisomerase IIalpha expression." Clin Cancer Res **9**(13): 4682-4688.
- Brazma, A., P. Hingamp, J. Quackenbush, G. Sherlock, P. Spellman, C. Stoeckert, J. Aach, W. Ansorge, C. A. Ball, H. C. Causton, T. Gaasterland, P. Glenisson, F. C. Holstege, I. F. Kim, V. Markowitz, J. C. Matese, H. Parkinson, A. Robinson, U. Sarkans, S. Schulze-Kremer, J. Stewart, R. Taylor, J. Vilo and M. Vingron (2001). "Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data." Nat Genet **29**(4): 365-371.
- Brazma, A., H. Parkinson, U. Sarkans, M. Shojatalab, J. Vilo, N. Abeygunawardena, E. Holloway, M. Kapushesky, P. Kemmeren, G. G. Lara, A. Oezcimen, P. Rocca-Serra and S. A. Sansone (2003). "ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI." Nucleic Acids Res **31**(1): 68-71.
- Brena, R. M., T. H. Huang and C. Plass (2006). "Quantitative assessment of DNA methylation: Potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings." J Mol Med (Berl) **84**(5): 365-377.
- Burchenal, J. H., G. Irani, K. Kern, L. Lokys and J. Turkevich (1980). "1,2-Diaminocyclohexane platinum derivatives of potential clinical value." Recent Results Cancer Res **74**: 146-155.
- Cai, C., D. C. Portnoy, H. Wang, X. Jiang, S. Chen and S. P. Balk (2009). "Androgen receptor expression in prostate cancer cells is suppressed by activation of epidermal growth factor receptor and ErbB2." Cancer Res **69**(12): 5202-5209.
- Cancel-Tassin, G., A. Latil, A. Valeri, P. Mangin, G. Fournier, P. Berthon and O. Cussenot (2001). "PCAP is the major known prostate cancer predisposing locus in families from south and west Europe." Eur J Hum Genet **9**(2): 135-142.
- Carducci, M. A. and A. Jimeno (2006). "Targeting bone metastasis in prostate cancer with endothelin receptor antagonists." Clin Cancer Res **12**(20 Pt 2): 6296s-6300s.
- Carroll, A. G., H. J. Voeller, L. Sugars and E. P. Gelmann (1993). "p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines." Prostate **23**(2): 123-134.
- Carter, B. S., T. H. Beaty, G. D. Steinberg, B. Childs and P. C. Walsh (1992). "Mendelian inheritance of familial prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3367-3371.
- Chaney, S. G., S. L. Campbell, E. Bassett and Y. Wu (2005). "Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts." Crit Rev Oncol Hematol **53**(1): 3-11.

- Chang, X., C. L. Monitto, S. Demokan, M. S. Kim, S. S. Chang, X. Zhong, J. A. Califano and D. Sidransky (2010). "Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers." Cancer Res **70**(7): 2870-2879.
- Chasin, L. A., A. Feldman, M. Konstam and G. Urlaub (1974). "Reversion of a Chinese hamster cell auxotrophic mutant." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(3): 718-722.
- Chaudhry, P., R. Srinivasan and F. D. Patel (2009). "Utility of gene promoter methylation in prediction of response to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer (EOC)." Cancer Invest **27**(8): 877-884.
- Chen, C. D., D. S. Welsbie, C. Tran, S. H. Baek, R. Chen, R. Vessella, M. G. Rosenfeld and C. L. Sawyers (2004). "Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy." Nat Med **10**(1): 33-39.
- Clark, J. P. and C. S. Cooper (2009). "ETS gene fusions in prostate cancer." Nat Rev Urol **6**(8): 429-439.
- Coin, F., P. Frit, B. Viollet, B. Salles and J. M. Egly (1998). "TATA binding protein discriminates between different lesions on DNA, resulting in a transcription decrease." Mol Cell Biol **18**(7): 3907-3914.
- Crawford, E. D. and E. P. DeAntoni (1993). "PSA as a screening test for prostate cancer." Urol Clin North Am **20**(4): 637-646.
- Cunha, G. R. and L. M. Matrisian (2002). "It's not my fault, blame it on my microenvironment." Differentiation **70**(9-10): 469-472.
- Cuzick, J., G. P. Swanson, G. Fisher, A. R. Brothman, D. M. Berney, J. E. Reid, D. Mesher, V. O. Speights, E. Stankiewicz, C. S. Foster, H. Moller, P. Scardino, J. D. Warren, J. Park, A. Younus, D. D. Flake, 2nd, S. Wagner, A. Gutin, J. S. Lanchbury and S. Stone (2011). "Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study." Lancet Oncol **12**(3): 245-255.
- Danila, D. C., M. J. Morris, J. S. de Bono, C. J. Ryan, S. R. Denmeade, M. R. Smith, M. E. Taplin, G. J. Bubley, T. Kheoh, C. Haqq, A. Molina, A. Anand, M. Koscuizka, S. M. Larson, L. H. Schwartz, M. Fleisher and H. I. Scher (2010). "Phase II multicenter study of abiraterone acetate plus prednisone therapy in patients with docetaxel-treated castration-resistant prostate cancer." J Clin Oncol **28**(9): 1496-1501.
- de Bono, J. S., C. J. Logothetis, A. Molina, K. Fizazi, S. North, L. Chu, K. N. Chi, R. J. Jones, O. B. Goodman, Jr., F. Saad, J. N. Staffurth, P. Mainwaring, S. Harland, T. W. Flaig, T. E. Hutson, T. Cheng, H. Patterson, J. D. Hainsworth, C. J. Ryan, C. N. Sternberg, S. L. Ellard, A. Flechon, M. Saleh, M. Scholz, E. Efsthathiou, A. Zivi, D. Bianchini, Y. Loriot, N. Chieffo, T. Kheoh, C. M. Haqq and H. I. Scher (2011). "Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer." N Engl J Med **364**(21): 1995-2005.
- de Bono, J. S., S. Oudard, M. Ouzguroglu, S. Hansen, J. P. Machiels, I. Kocak, G. Gravis, I. Bodrogi, M. J. Mackenzie, L. Shen, M. Roessner, S. Gupta and A. O. Sartor (2010). "Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial." Lancet **376**(9747): 1147-1154.

- de Kok, J. B., G. W. Verhaegh, R. W. Roelofs, D. Hessels, L. A. Kiemeny, T. W. Aalders, D. W. Swinkels and J. A. Schalken (2002). "DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors." Cancer Res **62**(9): 2695-2698.
- DESGRANDCHAMPS F. (1), T. R., CUSSENOT O. (1), TEILLAC P. (1), and L. D. A. (1) (1992). "Facteurs de croissance prostatiques et hypertrophie bénigne de la prostate: Etat des connaissances actuelles et perspectives." Progrès en urologie.
- Dhanasekaran, S. M., T. R. Barrette, D. Ghosh, R. Shah, S. Varambally, K. Kurachi, K. J. Pienta, M. A. Rubin and A. M. Chinnaiyan (2001). "Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer." Nature **412**(6849): 822-826.
- Dingemans, A. M., M. A. Witlox, R. A. Stallaert, P. van der Valk, P. E. Postmus and G. Giaccone (1999). "Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer." Clin Cancer Res **5**(8): 2048-2058.
- Donkena, K. V., H. Yuan and C. Y. Young (2010). "Vitamin Bs, one carbon metabolism and prostate cancer." Mini Rev Med Chem **10**(14): 1385-1392.
- Douglas, J. A., A. M. Levin, K. A. Zuhlke, A. M. Ray, G. R. Johnson, E. M. Lange, D. P. Wood and K. A. Cooney (2007). "Common variation in the BRCA1 gene and prostate cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(7): 1510-1516.
- Droz, J. P., X. Muracciole, N. Mottet, M. Ould Kaci, J. M. Vannetzel, N. Albin, S. Culine, J. M. Rodier, J. L. Misset, S. Mackenzie, E. Cvitkovic and G. Benoit (2003). "Phase II study of oxaliplatin versus oxaliplatin combined with infusional 5-fluorouracil in hormone refractory metastatic prostate cancer patients." Ann Oncol **14**(8): 1291-1298.
- Duggan, D., S. L. Zheng, M. Knowlton, D. Benitez, L. Dimitrov, F. Wiklund, C. Robbins, S. D. Isaacs, Y. Cheng, G. Li, J. Sun, B. L. Chang, L. Marovich, K. E. Wiley, K. Balter, P. Stattin, H. O. Adami, M. Gielzak, G. Yan, J. Sauvageot, W. Liu, J. W. Kim, E. R. Bleecker, D. A. Meyers, B. J. Trock, A. W. Partin, P. C. Walsh, W. B. Isaacs, H. Gronberg, J. Xu and J. D. Carpten (2007). "Two genome-wide association studies of aggressive prostate cancer implicate putative prostate tumor suppressor gene DAB2IP." J Natl Cancer Inst **99**(24): 1836-1844.
- Dunn, T. A., H. J. Schmoll, V. Grunwald, C. Bokemeyer and J. Casper (1997). "Comparative cytotoxicity of oxaliplatin and cisplatin in non-seminomatous germ cell cancer cell lines." Invest New Drugs **15**(2): 109-114.
- Edwards, S. M., Z. Kote-Jarai, J. Meitz, R. Hamoudi, Q. Hope, P. Osin, R. Jackson, C. Southgate, R. Singh, A. Falconer, D. P. Dearnaley, A. Ardern-Jones, A. Murkin, A. Dowe, J. Kelly, S. Williams, R. Oram, M. Stevens, D. M. Teare, B. A. Ponder, S. A. Gayther, D. F. Easton and R. A. Eeles (2003). "Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene." Am J Hum Genet **72**(1): 1-12.
- El Sheikh, S. S., J. Domin, P. Abel, G. Stamp and N. Lalani el (2004). "Phosphorylation of both EGFR and ErbB2 is a reliable predictor of prostate cancer cell proliferation in response to EGF." Neoplasia **6**(6): 846-853.

- Eussen, S. J., S. E. Vollset, S. Hustad, O. Midttun, K. Meyer, A. Fredriksen, P. M. Ueland, M. Jenab, N. Slimani, P. Ferrari, A. Agudo, N. Sala, G. Capella, G. Del Giudice, D. Palli, H. Boeing, C. Weikert, H. B. Bueno-de-Mesquita, F. L. Buchner, F. Carneiro, F. Berrino, P. Vineis, R. Tumino, S. Panico, G. Berglund, J. Manjer, R. Stenling, G. Hallmans, C. Martinez, L. Arrizola, A. Barricarte, C. Navarro, L. Rodriguez, S. Bingham, J. Linseisen, R. Kaaks, K. Overvad, A. Tjonneland, P. H. Peeters, M. E. Numans, F. Clavel-Chapelon, M. C. Boutron-Ruault, S. Morois, A. Trichopoulou, E. Lund, M. Plebani, E. Riboli and C. A. Gonzalez (2010). "Vitamins B2 and B6 and genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism as risk factors for gastric adenocarcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(1): 28-38.
- Farrell, N., T. T. Ha, J. P. Souchard, F. L. Wimmer, S. Cros and N. P. Johnson (1989). "Cytostatic trans-platinum(II) complexes." J Med Chem **32**(10): 2240-2241.
- Fink, D., S. Nebel, S. Aebi, H. Zheng, B. Cenni, A. Nehme, R. D. Christen and S. B. Howell (1996). "The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance." Cancer Res **56**(21): 4881-4886.
- Flis, S., A. Gnyszka, I. Misiewicz-Krzeminska and J. Splawinski (2009). "Decytabine enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin and 5-fluorouracil in the colorectal cancer cell line Colo-205." Cancer Cell Int **9**: 10.
- Frizell, J. (1998). "The PSA test." Am J Nurs **98**(4): 14-15.
- Fu, S., W. Hu, R. Iyer, J. J. Kavanagh, R. L. Coleman, C. F. Levenback, A. K. Sood, J. K. Wolf, D. M. Gershenson, M. Markman, B. T. Hennessy, R. Kurzrock and R. C. Bast, Jr. (2011). "Phase 1b-2a study to reverse platinum resistance through use of a hypomethylating agent, azacitidine, in patients with platinum-resistant or platinum-refractory epithelial ovarian cancer." Cancer **117**(8): 1661-1669.
- Fukuda, M., Y. Ohe, F. Kanzawa, M. Oka, K. Hara and N. Saijo (1995). "Evaluation of novel platinum complexes, inhibitors of topoisomerase I and II in non-small cell lung cancer (NSCLC) sublines resistant to cisplatin." Anticancer Res **15**(2): 393-398.
- Gamelin, L., O. Capitain, A. Morel, A. Dumont, S. Traore, B. Anne le, S. Gilles, M. Boisdron-Celle and E. Gamelin (2007). "Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway." Clin Cancer Res **13**(21): 6359-6368.
- Garrow, T. A., A. A. Brenner, V. M. Whitehead, X. N. Chen, R. G. Duncan, J. R. Korenberg and B. Shane (1993). "Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization." J Biol Chem **268**(16): 11910-11916.
- Gasent Blesa, J. M., V. Giner Marco, V. Giner-Bosch, P. Cerezuela Fuentes and V. Alberola Candel (2011). "Phase II trial of oxaliplatin and capecitabine after progression to first-line chemotherapy in androgen-independent prostate cancer patients." Am J Clin Oncol **34**(2): 155-159.
- Gayther, S. A., K. A. de Foy, P. Harrington, P. Pharoah, W. D. Dunsmuir, S. M. Edwards, C. Gillett, A. Ardern-Jones, D. P. Dearnaley, D. F. Easton, D. Ford, R. J. Shearer, R. S. Kirby, A. L. Dowe, J. Kelly, M. R. Stratton, B. A. Ponder, D. Barnes and R. A. Eeles

- (2000). "The frequency of germ-line mutations in the breast cancer predisposition genes BRCA1 and BRCA2 in familial prostate cancer. The Cancer Research Campaign/British Prostate Group United Kingdom Familial Prostate Cancer Study Collaborators." Cancer Res **60**(16): 4513-4518.
- Gleason, D. F. (1992). "Histologic grading of prostate cancer: a perspective." Hum Pathol **23**(3): 273-279.
- Gorlov, I. P., G. E. Gallick, O. Y. Gorlova, C. Amos and C. J. Logothetis (2009). "GWAS meets microarray: are the results of genome-wide association studies and gene-expression profiling consistent? Prostate cancer as an example." PLoS One **4**(8): e6511.
- Grolleau, F., L. Gamelin, M. Boisdron-Celle, B. Lapied, M. Pelhate and E. Gamelin (2001). "A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels." J Neurophysiol **85**(5): 2293-2297.
- Gronberg, H. (2003). "Prostate cancer epidemiology." Lancet **361**(9360): 859-864.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hazra, A., C. S. Fuchs, T. Kawasaki, G. J. Kirkner, D. J. Hunter and S. Ogino (2010). "Germline polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and DNA methylation in colorectal cancer." Cancer Causes Control **21**(3): 331-345.
- Heinlein, C. A. and C. Chang (2004). "Androgen receptor in prostate cancer." Endocr Rev **25**(2): 276-308.
- Herbig, K., E. P. Chiang, L. R. Lee, J. Hills, B. Shane and P. J. Stover (2002). "Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses." J Biol Chem **277**(41): 38381-38389.
- Hermans, K. G., R. van Marion, H. van Dekken, G. Jenster, W. M. van Weerden and J. Trapman (2006). "TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer." Cancer Res **66**(22): 10658-10663.
- Hull, G. W., F. Rabbani, F. Abbas, T. M. Wheeler, M. W. Kattan and P. T. Scardino (2002). "Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients." J Urol **167**(2 Pt 1): 528-534.
- Inagaki, K. and Y. Kidani (1985). "Steric effect in binding of antitumor active platinum (II) complex to nucleic acid base." Chem Pharm Bull (Tokyo) **33**(12): 5593-5596.
- INCa (2010). "La situation du cancer en France en 2010." Collection Rapports et synthèses.
- InfoCancer. "Les sels de platine." from <http://www.arcagy.org/infocancer/traitement-du-cancer/traitements-systemiques/chimiotherapie/les-medicaments/les-alkylants/les-sels-de-platine.html>.
- Irahara, N., K. Noshio, Y. Baba, K. Shima, N. I. Lindeman, A. Hazra, E. S. Schernhammer, D. J. Hunter, C. S. Fuchs and S. Ogino (2010). "Precision of pyrosequencing assay to

- measure LINE-1 methylation in colon cancer, normal colonic mucosa, and peripheral blood cells." J Mol Diagn **12**(2): 177-183.
- Irvine, R. A., M. C. Yu, R. K. Ross and G. A. Coetzee (1995). "The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer." Cancer Res **55**(9): 1937-1940.
- Jamieson, E. R., M. P. Jacobson, C. M. Barnes, C. S. Chow and S. J. Lippard (1999). "Structural and kinetic studies of a cisplatin-modified DNA icosamer binding to HMG1 domain B." J Biol Chem **274**(18): 12346-12354.
- Jamieson, E. R. and S. J. Lippard (1999). "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts." Chem Rev **99**(9): 2467-2498.
- Jennerwein, M. M., A. Eastman and A. Khokhar (1989). "Characterization of adducts produced in DNA by isomeric 1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II) complexes." Chem Biol Interact **70**(1-2): 39-49.
- Jentzmik, F., C. Stephan, M. Lein, K. Miller, B. Kamlage, B. Bethan, G. Kristiansen and K. Jung (2011). "Sarcosine in prostate cancer tissue is not a differential metabolite for prostate cancer aggressiveness and biochemical progression." J Urol **185**(2): 706-711.
- Jentzmik, F., C. Stephan, K. Miller, M. Schrader, A. Erbersdobler, G. Kristiansen, M. Lein and K. Jung (2010). "Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours." Eur Urol **58**(1): 12-18; discussion 20-11.
- Johnson, S. W., K. V. Ferry and T. C. Hamilton (1998). "Recent insights into platinum drug resistance in cancer." Drug Resist Updat **1**(4): 243-254.
- Kantoff, P. W., S. Halabi, M. Conaway, J. Picus, J. Kirshner, V. Hars, D. Trump, E. P. Winer and N. J. Vogelzang (1999). "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 **17**(8): 2506-2513.
- Kao, F. T. and T. T. Puck (1967). "Genetics of somatic mammalian cells. IV. Properties of Chinese hamster cell mutants with respect to the requirement for proline." Genetics **55**(3): 513-524.
- Kasperzyk, J. L., K. Fall, L. A. Mucci, N. Hakansson, A. Wolk, J. E. Johansson, S. O. Andersson and O. Andren (2009). "One-carbon metabolism-related nutrients and prostate cancer survival." Am J Clin Nutr **90**(3): 561-569.
- Kauffmann, A. and W. Huber (2010). "Microarray data quality control improves the detection of differentially expressed genes." Genomics **95**(3): 138-142.
- Kelland, L. R. (2000). "An update on satraplatin: the first orally available platinum anticancer drug." Expert Opin Investig Drugs **9**(6): 1373-1382.
- Kong, Z., D. Xie, T. Boike, P. Raghavan, S. Burma, D. J. Chen, A. A. Habib, A. Chakraborty, J. T. Hsieh and D. Saha (2010). "Downregulation of human DAB2IP gene expression in prostate cancer cells results in resistance to ionizing radiation." Cancer Res **70**(7): 2829-2839.

- Korcok, M. (1985). "NCI offering computer database on cancer research." Can Med Assoc J **133**(3): 225-227.
- Kosmidis, P., N. Mylonakis, C. Nicolaidis, C. Kalophonos, E. Samantas, J. Boukovinas, G. Fountzilas, D. Skarlos, T. Economopoulos, D. Tsavdaridis, P. Papakostas, C. Bacoyiannis and M. Dimopoulos (2002). "Paclitaxel plus carboplatin versus gemcitabine plus paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III randomized trial." J Clin Oncol **20**(17): 3578-3585.
- Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, R. A. Brekken, E. Sivridis, K. C. Gatter, A. L. Harris and E. H. Sage (2003). "Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients." Cancer Res **63**(17): 5376-5380.
- Kral, M., V. Rosinska, V. Student, M. Grepl, M. Hrabec and J. Bouchal (2011). "Genetic determinants of prostate cancer: a review." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **155**(1): 3-9.
- Laadem, A. and E. Cvitkovic (2001). "[Oxaliplatin: a first DACH-platinum in oncology]." Bull Cancer **88 Spec No**: S9-13.
- Lange, E. M., H. Chen, K. Brierley, E. E. Perrone, C. H. Bock, E. Gillanders, M. E. Ray and K. A. Cooney (1999). "Linkage analysis of 153 prostate cancer families over a 30-cM region containing the putative susceptibility locus HPCX." Clin Cancer Res **5**(12): 4013-4020.
- Lapointe, J., C. Li, C. P. Giacomini, K. Salari, S. Huang, P. Wang, M. Ferrari, T. Hernandez-Boussard, J. D. Brooks and J. R. Pollack (2007). "Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis." Cancer Res **67**(18): 8504-8510.
- Lapointe, J., C. Li, J. P. Higgins, M. van de Rijn, E. Bair, K. Montgomery, M. Ferrari, L. Egevad, W. Rayford, U. Bergerheim, P. Ekman, A. M. DeMarzo, R. Tibshirani, D. Botstein, P. O. Brown, J. D. Brooks and J. R. Pollack (2004). "Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(3): 811-816.
- Lashkari, D. A., J. L. DeRisi, J. H. McCusker, A. F. Namath, C. Gentile, S. Y. Hwang, P. O. Brown and R. W. Davis (1997). "Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13057-13062.
- Lawson, R. K. (1990). "Benign prostatic hyperplasia and growth factors." Urologe A **29**(1): 5-7.
- Lee, J. K., D. M. Havaleshko, H. Cho, J. N. Weinstein, E. P. Kaldjian, J. Karpovich, A. Grimshaw and D. Theodorescu (2007). "A strategy for predicting the chemosensitivity of human cancers and its application to drug discovery." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(32): 13086-13091.
- Levine, A. J., J. C. Figueiredo, W. Lee, D. V. Conti, K. Kennedy, D. J. Duggan, J. N. Poynter, P. T. Campbell, P. Newcomb, M. E. Martinez, J. L. Hopper, L. Le Marchand, J. A. Baron, P. J. Limburg, C. M. Ulrich and R. W. Haile (2010). "A candidate gene study of folate-associated one carbon metabolism genes and colorectal cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(7): 1812-1821.

- Li, M., C. Balch, J. S. Montgomery, M. Jeong, J. H. Chung, P. Yan, T. H. Huang, S. Kim and K. P. Nephew (2009). "Integrated analysis of DNA methylation and gene expression reveals specific signaling pathways associated with platinum resistance in ovarian cancer." BMC Med Genomics **2**: 34.
- Liu, J. J. and R. L. Ward (2010). "Folate and one-carbon metabolism and its impact on aberrant DNA methylation in cancer." Adv Genet **71**: 79-121.
- Luka, Z. (2008). "Methyltetrahydrofolate in folate-binding protein glycine N-methyltransferase." Vitam Horm **79**: 325-345.
- Luo, J., D. J. Duggan, Y. Chen, J. Sauvageot, C. M. Ewing, M. L. Bittner, J. M. Trent and W. B. Isaacs (2001). "Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling." Cancer Res **61**(12): 4683-4688.
- Luo, J., T. Dunn, C. Ewing, J. Sauvageot, Y. Chen, J. Trent and W. Isaacs (2002). "Gene expression signature of benign prostatic hyperplasia revealed by cDNA microarray analysis." Prostate **51**(3): 189-200.
- MacGrogan, G., P. Rudolph, I. Mascarel Id, L. Mauriac, M. Durand, A. Avril, J. M. Dilhuydy, J. Robert, S. Mathoulin-Pelissier, V. Picot, A. Floquet, G. Sierankowski and J. M. Coindre (2003). "DNA topoisomerase IIalpha expression and the response to primary chemotherapy in breast cancer." Br J Cancer **89**(4): 666-671.
- Mancuso, A., S. Oudard and C. N. Sternberg (2007). "Effective chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer (HRPC): present status and perspectives with taxane-based treatments." Crit Rev Oncol Hematol **61**(2): 176-185.
- Marks, L. S., Y. Fradet, I. L. Deras, A. Blase, J. Mathis, S. M. Aubin, A. T. Cancio, M. Desaulniers, W. J. Ellis, H. Rittenhouse and J. Groskopf (2007). "PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy." Urology **69**(3): 532-535.
- Maskos, U. and E. M. Southern (1992). "Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ." Nucleic Acids Res **20**(7): 1679-1684.
- McDonnell, T. J., P. Troncoso, S. M. Brisbay, C. Logothetis, L. W. Chung, J. T. Hsieh, S. M. Tu and M. L. Campbell (1992). "Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer." Cancer Res **52**(24): 6940-6944.
- Meyer, M. S., K. L. Penney, J. R. Stark, F. R. Schumacher, H. D. Sesso, M. Loda, M. Fiorentino, S. Finn, R. J. Flavin, T. Kurth, A. L. Price, E. L. Giovannucci, K. Fall, M. J. Stampfer, J. Ma and L. A. Mucci (2010). "Genetic variation in RNASEL associated with prostate cancer risk and progression." Carcinogenesis **31**(9): 1597-1603.
- Micetich, K. C., D. Barnes and L. C. Erickson (1985). "A comparative study of the cytotoxicity and DNA-damaging effects of cis-(diammino)(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum(II) and cis-diamminedichloroplatinum(II) on L1210 cells." Cancer Res **45**(9): 4043-4047.
- Mike, S., C. Harrison, B. Coles, J. Staffurth, T. J. Wilt and M. D. Mason (2006). "Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer." Cochrane Database Syst Rev(4): CD005247.

- Miyamoto, H., E. M. Messing and C. Chang (2004). "Androgen deprivation therapy for prostate cancer: current status and future prospects." Prostate **61**(4): 332-353.
- Mohammad, N. S., R. Yedluri, P. Addepalli, S. R. Gottumukkala, R. R. Digumarti and V. K. Kutala (2011). "Aberrations in one-carbon metabolism induce oxidative DNA damage in sporadic breast cancer." Mol Cell Biochem **349**(1-2): 159-167.
- Murphy, A. J., C. A. Hughes, C. Barrett, H. Magee, B. Loftus, J. J. O'Leary and O. Sheils (2007). "Low-level TOP2A amplification in prostate cancer is associated with HER2 duplication, androgen resistance, and decreased survival." Cancer Res **67**(6): 2893-2898.
- Nagji, A. S., S. H. Cho, Y. Liu, J. K. Lee and D. R. Jones (2010). "Multigene expression-based predictors for sensitivity to Vorinostat and Velcade in non-small cell lung cancer." Mol Cancer Ther **9**(10): 2834-2843.
- Narod, S. A., A. Seth and R. Nam (2008). "Fusion in the ETS gene family and prostate cancer." Br J Cancer **99**(6): 847-851.
- Niclot, S., Q. Pruvot, C. Besson, D. Savoy, E. Macintyre, G. Salles, N. Brousse, B. Varet, P. Landais, P. Taupin, C. Junien and D. Baudry-Bluteau (2006). "Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas." Blood **108**(1): 278-285.
- Oh, W. K. and P. W. Kantoff (1999). "Docetaxel (Taxotere)-based chemotherapy for hormone-refractory and locally advanced prostate cancer." Semin Oncol **26**(5 Suppl 17): 49-54.
- Oh, W. K., M. H. Tay and J. Huang (2007). "Is there a role for platinum chemotherapy in the treatment of patients with hormone-refractory prostate cancer?" Cancer **109**(3): 477-486.
- Olivier Cussenot, G. C.-T. (2004). "Facteurs de risque génétiques pour le cancer de la prostate." Médecine/Science **20**: 562-568.
- Olivier Cussenot, G. C.-T. (2004). "Facteurs de risque génétiques pour le cancer de la prostate." MEDECINE/SCIENCE **20**: 562-568.
- Paller, C. J. and E. S. Antonarakis (2011). "Cabazitaxel: a novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer." Drug Des Devel Ther **5**: 117-124.
- Parkinson, H., U. Sarkans, M. Shojatalab, N. Abeygunawardena, S. Contrino, R. Coulson, A. Farne, G. G. Lara, E. Holloway, M. Kapushesky, P. Lilja, G. Mukherjee, A. Oezcimen, T. Rayner, P. Rocca-Serra, A. Sharma, S. Sansone and A. Brazma (2005). "ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D553-555.
- Paull, K. D., R. H. Shoemaker, L. Hodes, A. Monks, D. A. Scudiero, L. Rubinstein, J. Plowman and M. R. Boyd (1989). "Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm." J Natl Cancer Inst **81**(14): 1088-1092.

- Penney, K. L., J. A. Sinnott, K. Fall, Y. Pawitan, Y. Hoshida, P. Kraft, J. R. Stark, M. Fiorentino, S. Perner, S. Finn, S. Calza, R. Flavin, M. L. Freedman, S. Setlur, H. D. Sesso, S. O. Andersson, N. Martin, P. W. Kantoff, J. E. Johansson, H. O. Adami, M. A. Rubin, M. Loda, T. R. Golub, O. Andren, M. J. Stampfer and L. A. Mucci (2011). "mRNA expression signature of Gleason grade predicts lethal prostate cancer." J Clin Oncol **29**(17): 2391-2396.
- Perner, S., F. Demichelis, R. Beroukhim, F. H. Schmidt, J. M. Mosquera, S. Setlur, J. Tchinda, S. A. Tomlins, M. D. Hofer, K. G. Pienta, R. Kuefer, R. Vessella, X. W. Sun, M. Meyerson, C. Lee, W. R. Sellers, A. M. Chinnaiyan and M. A. Rubin (2006). "TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer." Cancer Res **66**(17): 8337-8341.
- Petrylak, D. P., C. M. Tangen, M. H. Hussain, P. N. Lara, Jr., J. A. Jones, M. E. Taplin, P. A. Burch, D. Berry, C. Moinpour, M. Kohli, M. C. Benson, E. J. Small, D. Raghavan and E. D. Crawford (2004). "Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer." N Engl J Med **351**(15): 1513-1520.
- Picus, J. and M. Schultz (1999). "Docetaxel (Taxotere) as monotherapy in the treatment of hormone-refractory prostate cancer: preliminary results." Semin Oncol **26**(5 Suppl 17): 14-18.
- Pignon, J. C., B. Koopmansch, G. Nolens, L. Delacroix, D. Waltregny and R. Winkler (2009). "Androgen receptor controls EGFR and ERBB2 gene expression at different levels in prostate cancer cell lines." Cancer Res **69**(7): 2941-2949.
- Plumb, J. A., G. Strathdee, J. Sludden, S. B. Kaye and R. Brown (2000). "Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter." Cancer Res **60**(21): 6039-6044.
- Pollack, J. R., C. M. Perou, A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. S. Jeffrey, D. Botstein and P. O. Brown (1999). "Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays." Nat Genet **23**(1): 41-46.
- Rajput, A. B., M. A. Miller, A. De Luca, N. Boyd, S. Leung, A. Hurtado-Coll, L. Fazli, E. C. Jones, J. B. Palmer, M. E. Gleave, M. E. Cox and D. G. Huntsman (2007). "Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers." J Clin Pathol **60**(11): 1238-1243.
- Rhodes, D. R., S. Kalyana-Sundaram, V. Mahavisno, R. Varambally, J. Yu, B. B. Briggs, T. R. Barrette, M. J. Anstet, C. Kincead-Beal, P. Kulkarni, S. Varambally, D. Ghosh and A. M. Chinnaiyan (2007). "Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles." Neoplasia **9**(2): 166-180.
- Rhodes, D. R., J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, T. Barrette, A. Pandey and A. M. Chinnaiyan (2004). "ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform." Neoplasia **6**(1): 1-6.
- Robbins, A. S., T. M. Koppie, S. L. Gomez, A. Parikh-Patel and P. K. Mills (2007). "Differences in prognostic factors and survival among white and Asian men with prostate cancer, California, 1995-2004." Cancer **110**(6): 1255-1263.

- Robbins, A. S., D. Yin and A. Parikh-Patel (2007). "Differences in prognostic factors and survival among White men and Black men with prostate cancer, California, 1995-2004." Am J Epidemiol **166**(1): 71-78.
- Robert, J., A. Vekris, P. Pourquier and J. Bonnet (2004). "Predicting drug response based on gene expression." Crit Rev Oncol Hematol **51**(3): 205-227.
- Rosenberg, B., L. Vancamp and T. Krigas (1965). "Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode." Nature **205**: 698-699.
- Rosenberg, B., L. VanCamp, J. E. Trosko and V. H. Mansour (1969). "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents." Nature **222**(5191): 385-386.
- Rostad, K., M. Mannelqvist, O. J. Halvorsen, A. M. Oyan, T. H. Bo, L. Stordrange, S. Olsen, S. A. Haukaas, B. Lin, L. Hood, I. Jonassen, L. A. Akslen and K. H. Kalland (2007). "ERG upregulation and related ETS transcription factors in prostate cancer." Int J Oncol **30**(1): 19-32.
- Rouissi, K., S. Ouerhani, E. Oliveira, R. Marrakchi, L. Cherni, F. Ben Othman, M. R. Ben Slama, M. Sfaxi, M. Ayed, M. Chebil, A. Amorim, M. J. Prata and A. Benammar Elgaaied (2009). "Polymorphisms in one-carbon metabolism pathway genes and risk for bladder cancer in a Tunisian population." Cancer Genet Cytogenet **195**(1): 43-53.
- Sato, N., N. Fukushima, N. Maehara, H. Matsubayashi, J. Koopmann, G. H. Su, R. H. Hruban and M. Goggins (2003). "SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions." Oncogene **22**(32): 5021-5030.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." Science **270**(5235): 467-470.
- Scherf, U., D. T. Ross, M. Waltham, L. H. Smith, J. K. Lee, L. Tanabe, K. W. Kohn, W. C. Reinhold, T. G. Myers, D. T. Andrews, D. A. Scudiero, M. B. Eisen, E. A. Sausville, Y. Pommier, D. Botstein, P. O. Brown and J. N. Weinstein (2000). "A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer." Nat Genet **24**(3): 236-244.
- Schilder, R. J., F. P. LaCreta, R. P. Perez, S. W. Johnson, J. M. Brennan, A. Rogatko, S. Nash, C. McAleer, T. C. Hamilton, D. Roby and et al. (1994). "Phase I and pharmacokinetic study of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812) administered on a day 1 and day 8 schedule." Cancer Res **54**(3): 709-717.
- Seppala, E. H., T. Ikonen, V. Autio, A. Rokman, N. Mononen, M. P. Matikainen, T. L. Tammela and J. Schleutker (2003). "Germ-line alterations in MSR1 gene and prostate cancer risk." Clin Cancer Res **9**(14): 5252-5256.
- Shen, L., Y. Kondo, S. Ahmed, Y. Bumber, K. Konishi, Y. Guo, X. Chen, J. N. Vilaythong and J. P. Issa (2007). "Drug sensitivity prediction by CpG island methylation profile in the NCI-60 cancer cell line panel." Cancer Res **67**(23): 11335-11343.
- Shi, L., L. H. Reid, W. D. Jones, R. Shippy, J. A. Warrington, S. C. Baker, P. J. Collins, F. de Longueville, E. S. Kawasaki, K. Y. Lee, Y. Luo, Y. A. Sun, J. C. Willey, R. A. Setterquist, G. M. Fischer, W. Tong, Y. P. Dragan, D. J. Dix, F. W. Frueh, F. M. Goodsaid, D. Herman,

- R. V. Jensen, C. D. Johnson, E. K. Lobenhofer, R. K. Puri, U. Schrf, J. Thierry-Mieg, C. Wang, M. Wilson, P. K. Wolber, L. Zhang, S. Amur, W. Bao, C. C. Barbacioru, A. B. Lucas, V. Bertholet, C. Boysen, B. Bromley, D. Brown, A. Brunner, R. Canales, X. M. Cao, T. A. Cebula, J. J. Chen, J. Cheng, T. M. Chu, E. Chudin, J. Corson, J. C. Corton, L. J. Croner, C. Davies, T. S. Davison, G. Delenstarr, X. Deng, D. Dorris, A. C. Eklund, X. H. Fan, H. Fang, S. Fulmer-Smentek, J. C. Fuscoe, K. Gallagher, W. Ge, L. Guo, X. Guo, J. Hager, P. K. Haje, J. Han, T. Han, H. C. Harbottle, S. C. Harris, E. Hatchwell, C. A. Hauser, S. Hester, H. Hong, P. Hurban, S. A. Jackson, H. Ji, C. R. Knight, W. P. Kuo, J. E. LeClerc, S. Levy, Q. Z. Li, C. Liu, Y. Liu, M. J. Lombardi, Y. Ma, S. R. Magnuson, B. Maqsoodi, T. McDaniel, N. Mei, O. Myklebost, B. Ning, N. Novoradovskaya, M. S. Orr, T. W. Osborn, A. Papallo, T. A. Patterson, R. G. Perkins, E. H. Peters, R. Peterson, K. L. Phillips, P. S. Pine, L. Pusztai, F. Qian, H. Ren, M. Rosen, B. A. Rosenzweig, R. R. Samaha, M. Schena, G. P. Schroth, S. Shchegrova, D. D. Smith, F. Staedtler, Z. Su, H. Sun, Z. Szallasi, Z. Tezak, D. Thierry-Mieg, K. L. Thompson, I. Tikhonova, Y. Turpaz, B. Vallanat, C. Van, S. J. Walker, S. J. Wang, Y. Wang, R. Wolfinger, A. Wong, J. Wu, C. Xiao, Q. Xie, J. Xu, W. Yang, S. Zhong, Y. Zong and W. Slikker, Jr. (2006). "The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements." Nat Biotechnol **24**(9): 1151-1161.
- Shoemaker, R. H. (2006). "The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen." Nat Rev Cancer **6**(10): 813-823.
- Singh, D., P. G. Febbo, K. Ross, D. G. Jackson, J. Manola, C. Ladd, P. Tamayo, A. A. Renshaw, A. V. D'Amico, J. P. Richie, E. S. Lander, M. Loda, P. W. Kantoff, T. R. Golub and W. R. Sellers (2002). "Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior." Cancer Cell **1**(2): 203-209.
- Soller, M. J., M. Isaksson, P. Elfving, W. Soller, R. Lundgren and I. Panagopoulos (2006). "Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer." Genes Chromosomes Cancer **45**(7): 717-719.
- Sonpavde, G., G. Attard, J. Bellmunt, M. D. Mason, B. Malavaud, B. Tombal and C. N. Sternberg (2011). "The role of abiraterone acetate in the management of prostate cancer: a critical analysis of the literature." Eur Urol **60**(2): 270-278.
- Sreekumar, A., L. M. Poisson, T. M. Rajendiran, A. P. Khan, Q. Cao, J. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R. J. Lonigro, Y. Li, M. K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G. S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D. C. Alexander, A. Berger, J. R. Shuster, J. T. Wei, S. Varambally, C. Beecher and A. M. Chinnaiyan (2009). "Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression." Nature **457**(7231): 910-914.
- Sternberg, C. N. (2005). "Satraplatin in the treatment of hormone-refractory prostate cancer." BJU Int **96**(7): 990-994.
- Stone, K. R., D. D. Mickey, H. Wunderli, G. H. Mickey and D. F. Paulson (1978). "Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)." Int J Cancer **21**(3): 274-281.
- Stover, P. J., L. H. Chen, J. R. Suh, D. M. Stover, K. Keyomarsi and B. Shane (1997). "Molecular cloning, characterization, and regulation of the human mitochondrial serine hydroxymethyltransferase gene." J Biol Chem **272**(3): 1842-1848.

- Struys, E. A., A. C. Heijboer, J. van Moorselaar, C. Jakobs and M. A. Blankenstein (2010). "Serum sarcosine is not a marker for prostate cancer." Ann Clin Biochem **47**(Pt 3): 282.
- Takata, M., M. S. Sasaki, S. Tachiiri, T. Fukushima, E. Sonoda, D. Schild, L. H. Thompson and S. Takeda (2001). "Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs." Mol Cell Biol **21**(8): 2858-2866.
- Takimoto, C. H. (2009). "Phase 0 clinical trials in oncology: a paradigm shift for early drug development?" Cancer Chemother Pharmacol **63**(4): 703-709.
- Tannock, I. F., R. de Wit, W. R. Berry, J. Horti, A. Pluzanska, K. N. Chi, S. Oudard, C. Theodore, N. D. James, I. Turesson, M. A. Rosenthal and M. A. Eisenberger (2004). "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer." N Engl J Med **351**(15): 1502-1512.
- Tannock, I. F., D. Osoba, M. R. Stockler, D. S. Ernst, A. J. Neville, M. J. Moore, G. R. Armitage, J. J. Wilson, P. M. Venner, C. M. Coppin and K. C. Murphy (1996). "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 **14**(6): 1756-1764.
- Teni Boulikas, A. P., Evangelos Bellis, and Petros Christofi (2007). "Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms." Cancer Therapy **5**: 537-583.
- Tibbetts, A. S. and D. R. Appling (2010). "Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism." Annu Rev Nutr **30**: 57-81.
- Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, S. Perner, S. M. Dhanasekaran, R. Mehra, X. W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J. E. Montie, R. B. Shah, K. J. Pienta, M. A. Rubin and A. M. Chinnaiyan (2005). "Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer." Science **310**(5748): 644-648.
- Trivedi, C., B. Redman, L. E. Flaherty, O. Kucuk, W. Du, L. K. Heilbrun and M. Hussain (2000). "Weekly 1-hour infusion of paclitaxel. Clinical feasibility and efficacy in patients with hormone-refractory prostate carcinoma." Cancer **89**(2): 431-436.
- Trock, B. J., F. Leonessa and R. Clarke (1997). "Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance." J Natl Cancer Inst **89**(13): 917-931.
- True, L., I. Coleman, S. Hawley, C. Y. Huang, D. Gifford, R. Coleman, T. M. Beer, E. Gelmann, M. Datta, E. Mostaghel, B. Knudsen, P. Lange, R. Vessella, D. Lin, L. Hood and P. S. Nelson (2006). "A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(29): 10991-10996.
- Vaisman, A. and S. G. Chaney (2000). "The efficiency and fidelity of translesion synthesis past cisplatin and oxaliplatin GpG adducts by human DNA polymerase beta." J Biol Chem **275**(17): 13017-13025.
- Vaisman, A., C. Masutani, F. Hanaoka and S. G. Chaney (2000). "Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta." Biochemistry **39**(16): 4575-4580.

- Vaisman, A., M. Varchenko, A. Umar, T. A. Kunkel, J. I. Risinger, J. C. Barrett, T. C. Hamilton and S. G. Chaney (1998). "The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts." Cancer Res **58**(16): 3579-3585.
- Valle, D., S. J. Downing, S. C. Harris and J. M. Phang (1973). "Proline biosynthesis: multiple defects in Chinese hamster ovary cells." Biochem Biophys Res Commun **53**(4): 1130-1136.
- van Bokhoven, A., M. Varella-Garcia, C. Korch, W. U. Johannes, E. E. Smith, H. L. Miller, S. K. Nordeen, G. J. Miller and M. S. Lucia (2003). "Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines." Prostate **57**(3): 205-225.
- van der Heijden, M. S., J. R. Brody, D. A. Dezentje, E. Gallmeier, S. C. Cunningham, M. J. Swartz, A. M. DeMarzo, G. J. Offerhaus, W. H. Isacoff, R. H. Hruban and S. E. Kern (2005). "In vivo therapeutic responses contingent on Fanconi anemia/BRCA2 status of the tumor." Clin Cancer Res **11**(20): 7508-7515.
- Veldscholte, J., C. Ris-Stalpers, G. G. Kuiper, G. Jenster, C. Berrevoets, E. Claassen, H. C. van Rooij, J. Trapman, A. O. Brinkmann and E. Mulder (1990). "A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens." Biochem Biophys Res Commun **173**(2): 534-540.
- Vlaeminck-Guillem, V., A. Ruffion and J. Andre (2008). "[Value of urinary PCA3 test for prostate cancer diagnosis]." Prog Urol **18**(5): 259-265.
- Wadelius, M., A. O. Andersson, J. E. Johansson, C. Wadelius and E. Rane (1999). "Prostate cancer associated with CYP17 genotype." Pharmacogenetics **9**(5): 635-639.
- Wagner, C. and Z. Luka (2011). "Sarcosine, folate metabolism and prostate cancer--is there a link?" J Urol **185**(2): 385-386.
- Wang, J., Y. Cai, C. Ren and M. Ittmann (2006). "Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer." Cancer Res **66**(17): 8347-8351.
- Wang, L., J. Lu, J. An, Q. Shi, M. R. Spitz and Q. Wei (2007). "Polymorphisms of cytosolic serine hydroxymethyltransferase and risk of lung cancer: a case-control analysis." Lung Cancer **57**(2): 143-151.
- Wang, L., S. K. McDonnell, J. M. Cunningham, S. Hebring, S. J. Jacobsen, J. R. Cerhan, S. L. Slager, M. L. Blute, D. J. Schaid and S. N. Thibodeau (2003). "No association of germline alteration of MSR1 with prostate cancer risk." Nat Genet **35**(2): 128-129.
- Wang, L., S. K. McDonnell, D. A. Elkins, S. L. Slager, E. Christensen, A. F. Marks, J. M. Cunningham, B. J. Peterson, S. J. Jacobsen, J. R. Cerhan, M. L. Blute, D. J. Schaid and S. N. Thibodeau (2001). "Role of HPC2/ELAC2 in hereditary prostate cancer." Cancer Res **61**(17): 6494-6499.
- Watanabe, Y., H. Ueda, T. Etoh, E. Koike, N. Fujinami, A. Mitsuhashi and H. Hoshiai (2007). "A change in promoter methylation of hMLH1 is a cause of acquired resistance to

- platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer." *Anticancer Res* **27**(3B): 1449-1452.
- Wei, M., S. M. Cohen, A. P. Silverman and S. J. Lippard (2001). "Effects of spectator ligands on the specific recognition of intrastrand platinum-DNA cross-links by high mobility group box and TATA-binding proteins." *J Biol Chem* **276**(42): 38774-38780.
- Weinstein, S. J., R. Stolzenberg-Solomon, P. Pietinen, P. R. Taylor, J. Virtamo and D. Albanes (2006). "Dietary factors of one-carbon metabolism and prostate cancer risk." *Am J Clin Nutr* **84**(4): 929-935.
- Welsh, J. B., L. M. Sapinoso, A. I. Su, S. G. Kern, J. Wang-Rodriguez, C. A. Moskaluk, H. F. Frierson, Jr. and G. M. Hampton (2001). "Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer." *Cancer Res* **61**(16): 5974-5978.
- Wen, Y., M. C. Hu, K. Makino, B. Spohn, G. Bartholomeusz, D. H. Yan and M. C. Hung (2000). "HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway." *Cancer Res* **60**(24): 6841-6845.
- Williams, P. D., S. Cheon, D. M. Havaleshko, H. Jeong, F. Cheng, D. Theodorescu and J. K. Lee (2009). "Concordant gene expression signatures predict clinical outcomes of cancer patients undergoing systemic therapy." *Cancer Res* **69**(21): 8302-8309.
- Xie, D., C. Gore, J. Liu, R. C. Pong, R. Mason, G. Hao, M. Long, W. Kabbani, L. Yu, H. Zhang, H. Chen, X. Sun, D. A. Boothman, W. Min and J. T. Hsieh (2010). "Role of DAB2IP in modulating epithelial-to-mesenchymal transition and prostate cancer metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(6): 2485-2490.
- Xu, J. (2000). "Combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics." *Am J Hum Genet* **66**(3): 945-957.
- Yang, J., J. Parsons, N. H. Nicolay, S. Caporali, C. F. Harrington, R. Singh, D. Finch, S. D'Atri, P. B. Farmer, P. G. Johnston, W. G. McKenna, G. Dianov and R. A. Sharma (2010). "Cells deficient in the base excision repair protein, DNA polymerase beta, are hypersensitive to oxaliplatin chemotherapy." *Oncogene* **29**(3): 463-468.
- Yang, M., H. Guo, C. Wu, Y. He, D. Yu, L. Zhou, F. Wang, J. Xu, W. Tan, G. Wang, B. Shen, J. Yuan, T. Wu and D. Lin (2009). "Functional FEN1 polymorphisms are associated with DNA damage levels and lung cancer risk." *Hum Mutat* **30**(9): 1320-1328.
- Zdraveski, Z. Z., J. A. Mello, C. K. Farinelli, J. M. Essigmann and M. G. Marinus (2002). "MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA." *J Biol Chem* **277**(2): 1255-1260.
- Zhai, X., H. Beckmann, H. M. Jantzen and J. M. Essigmann (1998). "Cisplatin-DNA adducts inhibit ribosomal RNA synthesis by hijacking the transcription factor human upstream binding factor." *Biochemistry* **37**(46): 16307-16315.