



HAL
open science

Identification de SHISA3 comme gène médiateur de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer de la prostate résistant au docetaxel

Nicolas Martin

► To cite this version:

Nicolas Martin. Identification de SHISA3 comme gène médiateur de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer de la prostate résistant au docetaxel. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT: 2014PA11T057 . tel-01221968

HAL Id: tel-01221968

<https://theses.hal.science/tel-01221968>

Submitted on 29 Oct 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :
DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire : *Unité INSERM U981, équipe Cancer de la prostate*

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Nicolas MARTIN

Identification de SHISA3 comme gène médiateur de la transition
épithélio-mésenchymateuse dans le cancer de la prostate résistant
au docetaxel

Date de soutenance : 28/10/2014

Composition du jury :

Président :	Pr. Karim FIZAZI
Directeur de thèse :	Dr. Anne CHAUCHEREAU
Rapporteurs :	Dr. Olivier CUVILLIER Dr. Stéphane ANSIEAU
Examineurs :	Pr. Karim BENIHOUD Dr. Alain LE PAPE

*À mes parents,
qui ne m'ont jamais posé de limites et ont toujours cru en moi,
À ma sœur,
pour laquelle j'aurais aimé être plus présent ces dernières années,
À Emilie, ma compagne,
qui m'a soutenu au quotidien et durant les moments de doute.*

« Un pessimiste voit la difficulté dans chaque opportunité, un optimiste voit l'opportunité dans chaque difficulté » Winston Churchill

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse, le Pr. Karim Fizazi qui a présidé mon jury de thèse, le Dr. Olivier Cuvillier et le Dr. Stéphane Ansieau qui ont assumé la charge exigeante de rapporteur, le Pr. Karim Benihoud et le Dr. Alain Le PaPe pour avoir accepté d'être examinateur.

Je remercie particulièrement le Dr. Anne Chauchereau pour m'avoir accueilli dans son équipe pendant ces quatre années de thèse. Grâce à votre patience, votre disponibilité et votre confiance, vous avez permis l'aboutissement de ce travail semé d'embûches.

J'exprime également ma reconnaissance à l'ensemble de nos collaborateurs. Je remercie Guillaume Meurice et Frédéric Commo pour leur analyse des différentes signatures, Emilie Cochet et Vasily Ogryzko pour leur expertise en protéomique, Virginie Marty, Marie-Charlotte Dessoliers et Elodie Maingot pour les mises au point d'IHC, ainsi que Catherine Durieu et Eric Le Cam pour l'ensemble de leurs travaux en microscopie électronique. Je remercie notamment nos collaborateurs du CIPA d'Orléans pour leur contribution à mon travail de thèse et pour leur accueil lors des expériences que j'ai dû réaliser sur place.

Au cours de ces quatre années de thèse, j'ai rencontré des personnes formidables qui m'ont soutenu par leurs conseils et leur amitié.

Je remercie bien évidemment l'ensemble des membres de l'équipe Prostate pour nos moments de joies et nos discussions scientifiques. Je remercie particulièrement Sophie Cotteret pour son appui scientifique et son soutien dans les moments difficiles. Je remercie également Catherine Gaudin pour son aide technique, je n'aurais jamais pu terminer ma thèse sans toi. Merci à Marine d'avoir amené un vent de folie basque dans le bureau ! Une pensée à l'ancienne équipe BUP (Safae, Shanna, Sandra et Nader), j'espère que nous garderons cette amitié encore longtemps.

De manière générale, je remercie l'ensemble des membres de l'unité U981. Merci à l'équipe TIC (Ken, Angel, Florence, Nico, Tony, Luc, Elsa et les petits nouveaux), pour n'avoir jamais cessé de nous dépanner pour les manips, mais surtout pour leur sympathie. Je garderais de très bons souvenirs de nos conversations non scientifiques autour d'un café, ou autour d'un verre si je passais le vendredi midi ! Merci à l'équipe mélanome (Hélène, Delphine, Lise, Isabelle, Sandrine, Nyam, Stéphane). Je dois vous avouer que l'utilisation de votre cuve de transfert n'était qu'un prétexte pour glaner quelques carrés de chocolat ! Merci à la BUS (Virgine, Samar, Nadia, Olivia, Véronique) pour votre gentillesse et vos bons conseils. Merci au groupe CTC (Fanny, Emma, Marianne, Vincent, Benoit, Nadège) pour leur compagnie lors des manips nocturnes ou en weekend. Une pensée également aux membres des nouvelles équipes (Clara, Angie, Laure, Aurélie, Sylvie, Teele), votre gentillesse me fait regretter de ne pas vous avoir connus plus tôt.

Je remercie nos voisins de la RT (Nelly, Isa, Mélanie, Clélia, Patrick et les nouveaux). C'est toujours un plaisir de prendre un café autour d'une conversation sur George Clooney ! Je remercie également nos anciens voisins de l'U1015, le déménagement dans le nouveau bâtiment nous a éloigné mais c'est toujours un plaisir de revenir au 12^{ème}.

Je remercie également nos collègues de l'U749. Merci à Muriel pour ses conseils scientifiques et pour les soirées networking ! Merci à Jacques de m'avoir toujours bien accueilli malgré mon squat permanent au microscope. Merci à Dominique et surtout bon courage car c'est bientôt ton tour !

Merci au gang des sportifs ! Hélène, Tony, Semih, Isa, Virginie, que ce soit au badminton ou pour l'entraînement Odyssea, vous m'avez permis pendant un temps de garder un esprit sain dans un corps sain. Je vous promets qu'après la soutenance, Piou-Piou arrête les pizzas et se remet au sport !

Gracias al grupo cáncer de próstata de Buenos Aires. Gracias a Daniel Compagno, por su inversión en mi proyecto. Sobre todo gracias a Lucas por su ayuda y su amistad, un abrazo grande a tu familia y Benja. No puedo olvidar Felipe y Santiago, gracias por este mes. Voy a acordar estos momentos todo mi vida, aunque prefiero olvidar la cumbia !

Merci aux membres fondateurs de l'association de jeunes chercheurs de l'IGR (Najat, Mélanie, Elodie, Jane, Romain, Charles-Henri et les autres), cette aventure m'a beaucoup apporté.

Je remercie tout particulièrement Angélique pour son amitié et nos soirées geek ! Merci aussi à Ludo, mon maître Jedi, et à son fidèle acolyte Nyamounet sans qui les journées seraient bien tristes. Merci également à Sophie, la squatteuse de l'U981, Virginie et Samar pour les vacances post-AACR, j'en garderais un souvenir inoubliable !

Enfin, je remercie mes amis pour leur patience à mon égard et leur compréhension face aux difficultés de la thèse. Merci pour votre soutien et à bientôt pour fêter la fin de cette aventure!

Résumé

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme et représente la troisième cause de mortalité par cancer en France. Depuis 2004, le docetaxel est le traitement de référence du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (mCRPC). Cependant, malgré le bénéfice de survie obtenu, près de la moitié des patients traités développent une résistance à la chimiothérapie. L'objectif de mon projet de thèse consiste à identifier un prédicteur moléculaire permettant de sélectionner les patients qui vont répondre à la chimiothérapie par docetaxel. Par l'étude du mécanisme moléculaire associé avec le développement de la résistance, mon second objectif est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de contourner cette résistance.

Dans ce but, les profils d'expression de gènes et de microARNs différentiellement exprimés dans plusieurs modèles cellulaires de cancer de prostate résistants au docetaxel ont été établis. L'intégration des données issues de ces analyses haut-débit a suggéré que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) intervenait dans le mécanisme de résistance au docetaxel. La dissection du mécanisme d'EMT observé dans les modèles cellulaires a permis d'identifier SHISA3 comme une nouvelle protéine régulatrice de ce processus. Le gène *SHISA3*, alors jamais décrit chez l'Homme, est fortement sous-exprimé dans les modèles résistants au docetaxel présentant un phénotype mésenchymateux, mais également dans de multiples tumeurs humaines. L'inhibition de SHISA3 dans les modèles cellulaires sensibles induit une EMT complète, caractérisée par la perte des jonctions cellulaires, l'expression des facteurs de transcription mésenchymateux et l'augmentation des capacités migratoires. L'étude du mécanisme d'action de SHISA3 nous a permis de mettre en évidence l'interaction de SHISA3 avec le TGF β RII. Nous avons montré dans les cellules résistantes au docetaxel que l'inhibition pharmacologique de la voie du TGF β provoque une sensibilisation au docetaxel, démontrant l'importance de la régulation de cette voie dans la résistance à la chimiothérapie.

En parallèle de ce travail, nous avons établi un modèle de cancer de la prostate résistant au docetaxel chez la souris. L'obtention de ce modèle est cruciale pour réaliser la validation préclinique des thérapies visant à contourner les mécanismes de résistance au docetaxel. Les tumeurs obtenues dans ce nouveau modèle sont caractérisées par une sous-expression de SHISA3 et par l'expression des marqueurs d'EMT. Ce modèle nous permettra de valider *in vivo* le potentiel thérapeutique de l'association d'un inhibiteur de la voie du TGF β avec le docetaxel. De manière intéressante, nous avons observé *in vivo* que l'expression de SHISA3 est corrélée à la réponse au traitement par docetaxel. Ces résultats suggèrent que SHISA3 pourrait être un biomarqueur de réponse à la chimiothérapie.

Abstract

Prostate cancer is the most common cancer in men and the third leading cause of cancer mortality in France. Since 2004, docetaxel is the standard treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). However, nearly half of treated patients develop resistance to chemotherapy. The aim of my thesis is to identify molecular predictors to select patients who will respond to docetaxel chemotherapy. My second goal is to identify new therapeutic targets to overcome this resistance, by studying the molecular mechanisms involved in the development of resistance.

To this purpose, genes and microRNAs expression profiles were established in several cellular models of docetaxel-resistant prostate cancer. The integration of these high-throughput data suggested that the epithelial-mesenchymal transition (EMT) was involved in the mechanism of docetaxel resistance. Deciphering the EMT mechanism observed in our cellular models allowed the identification of *SHISA3* as a new regulator of this process. *SHISA3* is highly under-expressed in docetaxel resistant cells which present a mesenchymal phenotype. Interestingly, *SHISA3* is also down-regulated in a large variety of human tumors. The inhibition of *SHISA3* in sensitive cells induced a complete EMT, characterized by loss of cellular junctions, expression of mesenchymal transcription factors, and increased migratory capacity. The study of its mechanism of action allowed us to highlight the interaction of *SHISA3* with TGF β RII. We showed in docetaxel-resistant cells that pharmacological inhibition of the TGF β signalling pathway induces sensitization to docetaxel, demonstrating the importance of the regulation of this pathway in the resistance to chemotherapy.

In parallel, we developed a docetaxel-resistant prostate cancer model in mice. The establishment of this model is critical for the preclinical validation of new targeted therapies. Tumors obtained from this new model are characterized by the under-expression of *SHISA3* and the expression of EMT markers. This model will allow the validation of the therapeutic potential of co-treatment with docetaxel and TGF β signalling pathway inhibitors *in vivo*. Interestingly, we observed that *SHISA3* expression is correlated with response to docetaxel treatment *in vivo*. These results suggest that *SHISA3* could be a biomarker of response to docetaxel chemotherapy.

Table des matières

Liste des abréviations	5
Liste des figures.....	7
Liste des tableaux	9
Introduction générale	11
<i>Chapitre I : Le cancer de la prostate</i>	13
1. Structure et fonction de la glande prostatique	13
1.1. Description anatomique.....	13
1.2. Structure cellulaire de la prostate	14
1.3. Les modèles de cancer de la prostate.....	15
2. Progression tumorale du cancer de la prostate	17
2.1. Altérations génétiques impliquées dans l'initiation du cancer de la prostate	17
2.2. Evolution du cancer de la prostate, du PIN au carcinome	19
2.3. La dissémination métastatique	22
3. Les marqueurs du cancer de la prostate utilisés en clinique.....	23
4. Epidémiologie du cancer de la prostate.....	24
5. Les options thérapeutiques dans le traitement du cancer de la prostate	25
5.1. Les traitements locaux	25
5.2. Déprivation androgénique	25
5.3. Les traitements du CRPC	26
<i>Chapitre II : Mécanismes de résistance aux taxanes dans le cancer de la prostate</i>	33
1. Mécanismes généraux de la résistance aux chimiothérapies	33
1.1. Rôle du microenvironnement tumoral.....	33
1.2. Expression de pompes d'efflux des drogues	36
1.3. Hétérogénéité tumorale et cellules souches cancéreuses.....	36
2. Mécanismes de résistance liés aux microtubules	38
2.1. Mutations de la tubuline β	38
2.2. Expression des isotopes de la tubuline β	38
2.3. Implication des protéines associées aux microtubules	39
3. Echappement aux checkpoints du cycle cellulaire	40
4. Détournement de la machinerie apoptotique et activation des voies de survie	41
4.1. Altération de la réponse apoptotique intrinsèque induite par les taxanes.....	41
4.2. Détournement des voies de signalisation de survie	43
<i>Chapitre III : Thérapies proposées en clinique pour le traitement des CRPC chimiorésistants</i>	47
1. Les nouvelles hormonothérapies	47

2. Inhibition de l'efflux des drogues par la P-gp	48
2.1. Echec des thérapies ciblant la P-gp	48
2.2. Développement d'agents insensibles aux pompes d'efflux.....	48
3. Ciblage du microenvironnement	49
3.1. Inhibition de la néo-angiogénèse tumorale.....	49
3.2. Inactivation des cytokines inflammatoires	50
4. Inhibition des protéines chaperones	51
5. Régulation du programme apoptotique	51
5.1. Ciblage des protéines de la famille Bcl-2.....	51
5.2. Ciblage des IAP.....	52
5.3. Inhibition de PARP	52
6. Régulation des récepteurs aux facteurs de croissance	53
7. Ciblage de la voie PI3K/Akt/mTOR	53
8. Synthèse des stratégies thérapeutiques du CRPC chimio-résistant	54
Chapitre IV : L'EMT, une nouvelle facette des mécanismes de résistance au docetaxel.	55
1. Mécanismes moléculaires de l'EMT	55
1.1. Evénements précoces indépendants de la transcription de nouveaux gènes	55
1.2. Reprogrammation cellulaire	57
2. Les différents types d'EMT	60
2.1. EMT de type 1 dans l'embryogénèse	60
2.2. EMT de type 2 dans la régénération tissulaire et la fibrose.....	61
2.3. EMT de type 3 dans le développement de métastases.....	61
3. Les voies d'induction de l'EMT	63
3.1. Le TGFβ	63
3.2. Les facteurs de croissance	64
3.3. Interactions entre les intégrines et la matrice extracellulaire.....	65
3.4. Les voies de signalisation du développement embryonnaire	66
3.5. La voie de signalisation du récepteur des androgènes.....	70
4. Régulation de l'EMT par les microARNs	71
5. Participation de l'EMT dans la résistance aux taxanes	72
5.1. Relations entre CSC et EMT	72
5.2. Description des mécanismes de résistance liés à l'EMT	73
Matériels et Méthodes	75
Résultats	85
<i>Objectifs du projet de thèse</i>	87
Résultats I : Identification de nouvelles cibles dans le cancer de la prostate résistant au docetaxel par intégration de données de criblage	89
1. Etablissement des profils d'expression différentiels des miRs entre les cellules parentales et les cellules résistantes au docetaxel	89

1.1. Détermination des contrôles endogènes	89
1.2. Profils d'expression des miRs potentiellement impliqués dans la résistance	91
2. Identification de l'EMT dans le mécanisme de résistance au docetaxel	92
2.1. Intégration des données issues des signatures de gènes et de miRs	92
2.2. Morphologie des cellules résistantes	93
2.3. Le rôle du cluster miR-141/200 dans l'EMT des cellules IGR-CaP1-R	94
3. Discussion	95
Résultats II : Dissection du mécanisme d'EMT induit dans les cellules de cancer de la prostate résistantes au docetaxel	97
1. Caractérisation de l'EMT dans les modèles cellulaires résistants au docetaxel	97
1.1. Expression des marqueurs d'EMT dans les cellules résistantes au docetaxel	97
1.2. Expression des marqueurs de CSC dans les cellules résistantes au docetaxel	99
1.3. Nature des jonctions cellulaires dans les modèles résistants au docetaxel	100
1.4. Expression des facteurs de transcriptions de l'EMT	102
2. Identification des inducteurs impliqués dans l'EMT des cellules résistantes au docetaxel.....	103
2.1. Voies de signalisation régulées dans les cellules résistantes	103
2.2. Expression des gènes cibles de la voie WNT	103
2.3. Etat d'activation de la voie WNT/ β -caténine dans les cellules résistantes au docetaxel..	105
3. Discussion	106
Résultats III : SHISA3, un nouveau régulateur de la transition épithélio-mésenchymateuse	109
1. Contexte bibliographique	109
1.1. Les gènes SHISA et leur expression au cours du développement.....	109
1.2. SHISA3 dans l'inhibition des voies WNT et FGF	110
1.3. Expression de SHISA3 chez l'homme	111
2. Expression de SHISA3 dans les modèles résistants au docetaxel	112
2.1. Expression des gènes de la famille SHISA dans le modèle IGR-CaP1	112
2.2. Expression de SHISA3 dans les lignées de CaP sensibles et résistantes au docetaxel.....	113
3. Caractérisation de l'expression de SHISA3 dans les lignées cellulaires et les tissus humains	113
3.1. Expression de SHISA3 dans les lignées humaines.....	113
3.2. Expression de SHISA3 dans les tissus humains.....	114
3.3. Localisation cellulaire de SHISA3	116
3. Rôle fonctionnel de l'inhibition de SHISA3 dans l'EMT	117
3.1. Changement morphologique induit par l'inhibition de SHISA3	117
3.2. Expression des protéines de jonctions cellulaires après inhibition de l'expression de SHISA3	119
3.3. Inhibition de SHISA3 et expression des marqueurs mésenchymateux	120
3.4. Expression des gènes mésenchymateux consécutive au traitement par docetaxel	121
3.5. Implication de SHISA3 dans la migration cellulaire	122
4. Identification des cibles de SHISA3.....	123

4.1. Identification des partenaires potentiels de SHISA3 par spectrométrie de masse.....	123
4.2.1. Co-immunoprécipitation de SHISA3 et de ses partenaires.	124
4.2.3. Co-localisation du TGFβRII et de SHISA3.....	126
5. Rôle de SHISA3 dans la résistance au docetaxel induite par l'EMT	129
6. Discussion	130
Résultats IV : Etablissement d'un modèle de cancer de la prostate résistant au docetaxel chez la souris	135
1. Stratégie expérimentale	135
1.1. Description des stratégies utilisées pour le développement du modèle.....	135
1.2. Administration du docetaxel <i>in vivo</i>	137
2. Pression pharmacologique sur des tumeurs sensibles au docetaxel	137
2.1. Suivi de la croissance tumorale après administration de doses croissantes de docetaxel.	137
2.2. Validation de la résistance au docetaxel du modèle	139
3. Tumeurs issues de lignées résistantes au docetaxel <i>in vitro</i>	142
3.1. Tumorigénicité des lignées résistantes	142
3.2. Augmentation de la tumorigénicité du modèle par passages successifs.....	142
3.3. Validation de la résistance au docetaxel.....	143
4. Corrélation entre la résistance au docetaxel et la sous-expression de SHISA3 <i>in vivo</i>	144
4.1. Expression du gène SHISA3 dans les deux modèles animaux.....	144
4.2. Expression de l'E-cadhérine dans les tumeurs	145
4.3. Expression des marqueurs d'EMT dans les tumeurs résistantes au docetaxel	145
5. Le modèle cellulaire IGR-CaP1-R vivo	146
5.1. Caractérisation de la lignée IGR-CaP1-R vivo.....	146
5.2. Résistance au docetaxel <i>in vitro</i>	147
5.3. Tumorigénicité des cellules IGR-CaP1-R vivo.	148
6. Discussion	149
Discussion générale	153
Références bibliographiques	159
Annexes.....	183

Liste des abréviations

ARE : éléments de réponse aux androgènes
ABC : transporteurs à cassette de liaison à l'ATP
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AR : récepteur des androgènes
ARN : Acide Ribonucléique
AURKA : Aurora kinase A
BCRP : Breast Cancer Resistance Protein
CaMKII : calmoduline kinase II
CaP : cancer de la prostate
CCL2 : chemokine ligand-2
CK : cytokératine
CRPC : cancer de la prostate résistant à la castration
CSC : cellule souche cancéreuse
CYP17 : 17 α -hydroxylase/C17-20-lyase
DHT : dihydrotestostérone
DSH : dishevelled
ECM : matrice extracellulaire
EGF : epidermal growth factor
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
EMT-TF : facteurs de transcriptions spécifiques de l'EMT
FDA : Food and Drug Administration
FGF : fibroblast growth factor
FZD : Frizzled
GLI : glioma-associated oncogene family zinc finger
GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β
GSTP1 : glutathione-s-transférase
HGF : hepatocyte growth factor
Hh : Hedgehog
HIF1 α : hypoxia induced factor 1 α
HSP : protéine de choc thermique
IGF : Insulin Growth Factor
IHC : immunohistochimie
IgG : immunoglobuline G
IL-6 : interleukine 6
LEF-1 : lymphoid enhancer-binding factor 1
MAP : microtubule associated protein
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MDR : résistance multiple aux drogues
MET : transition mésenchymato-épithéliale
MIC1 : Macrophage inhibitory cytokine 1
miR : microARN
MMP : métalloprotéinases de la matrice
MRP1 : MDR protéine 1

mTOR : mammalian target of rapamycin
NF- κ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NSCLC : cancer du poumon non à petites cellules
PAL : phosphatase alcaline
PAP : phosphatase acide
PAR : partitioning-defective
PARP : Poly(ADP-ribose) polymerase
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : platelet-derived growth factor
PDX : xéno greffe issue de tumeur de patient
P-gp : P-glycoprotéine
PI3K : phospho-inositol-3-kinase
PIN : lésions néoplasiques intra-épithéliales
PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC : protéine kinase C
PSA : antigène spécifique de la prostate
PTCH : Patched
PTEN : phosphatase and tensin homolog
RB : retinoblastoma
RTK : récepteurs à activité tyrosine kinase
RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)
S1P : sphingosine-1-phosphate
Shh : Sonic Hedgehog
siARN : petit ARN interférent
SMO : smoothened
SphK : sphingosine kinase
STAT : signal transducers and activators of transcription
TCF : T-cell factor
TGF β : transforming growth factor β
TGF β R : transforming growth factor β receptor
TLDA : Taqman Low-Density Array
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
ZO-1 : zonula occludens 1
 α -SMA : α smooth muscle actin

Liste des figures

Figure 1 : Zones anatomiques de la prostate et prédisposition aux pathologies prostatiques	13
Figure 2 : Les différents types cellulaires exprimés dans les acini de la prostate	14
Figure 3 : Evénements impliqués dans la progression tumorale du CaP.....	17
Figure 4 : Voie de signalisation du récepteur des androgènes	21
Figure 5 : Processus métastatique.....	22
Figure 6 : Action des taxanes sur la dynamique des microtubules.....	30
Figure 7 : Activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par les taxanes	31
Figure 8 : Implication du microenvironnement dans la résistance au docetaxel.....	35
Figure 9 : Les CSC dans la résistance à la chimiothérapie.....	37
Figure 10 : Mécanismes de résistance aux taxanes liés à l'induction de l'apoptose intrinsèque.....	41
Figure 11 : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR	44
Figure 12 : Destruction des jonctions cellulaires après induction de l'EMT	56
Figure 13 : Les différents types d'EMT	60
Figure 14 : Rôle de l'EMT et de la MET dans le processus métastatique.....	62
Figure 15 : Voie de signalisation du TGF β	63
Figure 16 : Voie de signalisation des facteurs de croissance dans l'EMT	64
Figure 17 : Description des voies WNT canonique et non canoniques.....	66
Figure 18 : La voie de signalisation Hedgehog	68
Figure 19 : La voie de signalisation Notch.....	69
Figure 20 : Validation des contrôles endogènes.....	91
Figure 21 : Morphologie des cellules résistantes au docetaxel comparée aux cellules parentales.....	93
Figure 22 : Régulation de l'expression de ZEB1 par le cluster miR-141/200c.....	94
Figure 23 : Expression des gènes spécifiques de l'EMT dans les lignées sensibles et résistantes au docetaxel.....	98
Figure 24 : Expression des marqueurs d'EMT dans les lignées sensibles et résistantes au docetaxel..	98
Figure 25 : Expression des gènes de CSC dans les lignées sensibles et résistantes au docetaxel	99
Figure 26 : Expression des marqueurs CSC.....	99
Figure 27 : Expression des marqueurs de jonctions serrées dans les modèles résistantes au docetaxel	100
Figure 28 : Expression des protéines de jonctions adhérentes et des desmosomes.....	101
Figure 29 : Localisation cellulaire des protéines de jonctions adhérentes et du desmosome	101
Figure 30 : Expression des EMT-TF dans les cellules résistantes au docetaxel	102
Figure 31 : Identification des gènes cibles de la voie WNT/ β -caténine exprimés dans les signatures de résistance au docetaxel	103
Figure 32 : Etat d'activation de la kinase GSK3 β	105
Figure 33 : Structure des protéines de la famille SHISA	110
Figure 34 : Mécanismes d'action potentiels des protéines SHISA	110
Figure 35 : Profil d'expression de SHISA3 chez l'homme par tissu.....	111
Figure 36 : Expression des gènes de la famille SHISA dans les lignées IGR-CaP1 sensibles et résistantes au docetaxel	112

Figure 37 : Expression de <i>SHISA3</i> dans les clones IGR-CaP1 résistants à des doses croissantes de docetaxel.....	112
Figure 38 : Expression de <i>SHISA3</i> dans les lignées résistantes au docetaxel.....	113
Figure 39 : Expression de <i>SHISA3</i> dans un panel de lignées cellulaire	114
Figure 40 : Expression de <i>SHISA3</i> dans un panel de tissus humains normaux	115
Figure 41 : Comparaison de l'expression de <i>SHISA3</i> entre les tissus normaux et tumoraux	115
Figure 42 : Localisation intracellulaire de <i>SHISA3</i>	116
Figure 43 : Morphologie des cellules IGR-CaP1 et PC3 après extinction de <i>SHISA3</i>	117
Figure 44 : Destruction des jonctions serrées consécutive à l'inhibition de <i>SHISA3</i>	118
Figure 45 : Relocalisation de la β -caténine après extinction de <i>SHISA3</i>	119
Figure 46 : Transcription des gènes de l'EMT après extinction de <i>SHISA3</i>	120
Figure 47 : Expression des marqueurs d'EMT après induction par si <i>SHISA3</i> et TGF β 1	121
Figure 48 : Transcription des gènes mésenchymateux suite au traitement par docetaxel	121
Figure 49 : Effet de l'extinction de <i>SHISA3</i> sur la migration cellulaire.....	122
Figure 50 : Stratégie utilisée pour l'identification des cibles de <i>SHISA3</i>	123
Figure 51 : Détermination des partenaires potentiels de <i>SHISA3</i>	124
Figure 52 : Co-immunoprécipitation de <i>SHISA3</i> , TGF β R2 et de l'EGFR.....	125
Figure 53 : Co-immunoprécipitation des protéines endogènes <i>SHISA3</i> et TGF β R2.....	125
Figure 54 : Co-localisation de <i>SHISA3</i> et TGF β R2.....	126
Figure 55 : Production de TGF β 1 dans les lignées sensibles et résistantes au docetaxel.....	127
Figure 56 : Efficacité du docetaxel dans les cellules parentales après induction de l'EMT.....	128
Figure 57 : Effet de l'inhibition de la signalisation du TGF β sur la capacité des cellules IGR-CaP1 et IGR-CaP1-R à former des colonies en présence de docetaxel	128
Figure 58 : Modèle proposé du mode d'action de <i>SHISA3</i> dans l'EMT	132
Figure 59 : Stratégies d'établissement d'un modèle murin de CaP résistant au docetaxel.....	136
Figure 60 : Toxicité du traitement par docetaxel <i>in vivo</i>	136
Figure 61 : Suivi de la croissance tumorale après administration de doses croissantes de docetaxel .	138
Figure 62 : Réponse au traitement par docetaxel dans les souris porteuses de tumeurs.....	140
Figure 63 : Efficacité du protocole de traitement au docetaxel admin 4	141
Figure 64 : Réponse au docetaxel du modèle issu des cellules IGR-CaP1/megix	141
Figure 65 : Tumorigénicité des clones résistants issus de la lignée IGR-CaP1.....	142
Figure 66 :Augmentation de la croissance tumorale suite à des passages successifs.....	143
Figure 67 : Réponse au docetaxel du modèle issu des cellules IGR-CaP1-R25	143
Figure 68 : Expression de <i>SHISA3</i> après traitement au docetaxel dans les modèles <i>in vivo</i>	144
Figure 69 :Expression de l'E-cadhérine dans les tumeurs au cours des passages	145
Figure 70 : Expression des marqueurs d'EMT dans les tumeurs résistantes au docetaxel.....	146
Figure 71 : Caractérisation des cellules IGR-CaP1-R vivo.....	147
Figure 72 : Résistance au docetaxel de la lignée IGR-CaP1-R vivo comparé à la lignée sensible	147
Figure 73 : Croissance des xénogreffes IGR-CaP1-R vivo.....	148
Figure 74 : Synthèse des mécanismes de résistance au docetaxel dans le CaP.....	156
Figure 75 : Hypothèse sur le mécanisme d'action moléculaire de <i>SHISA3</i>	157

Liste des tableaux

Tableau 1 : Modèles cellulaires du cancer de la prostate les plus couramment utilisés.....	16
Tableau 2 : Incidence et mortalité estimées des principaux cancers chez l'homme en 2012 en France.....	24
Tableau 3 : Essais cliniques dans le traitement du CRPC résistant au docetaxel.....	54
Tableau 4 : Facteurs de transcription impliqués dans l'EMT.....	57
Tableau 5 : Liste des amorces et des anticorps utilisés	84
Tableau 6 : Signature des gènes de résistance au docetaxel de la lignée IGR-CaP1.....	86
Tableau 7 : Profils d'expression différentielle des miRs dans les trois modèles de CaP résistants au docetaxel.....	90
Tableau 8 : Validation des candidats de micro-array par PCR quantitative.....	90
Tableau 9 : Intégration des données issues des analyses d'expression de gènes et de miRs.....	92
Tableau 10 : Voies de signalisation régulées dans les cellules résistantes au docetaxel	104

Introduction générale

Chapitre I

Le cancer de la prostate

1. Structure et fonction de la glande prostatique

1.1. Description anatomique

La prostate est une glande exocrine située sous la vessie entre la symphyse pubienne et le rectum. C'est une formation musculo-glandulaire de la forme d'une châtaigne, qui entoure la partie supérieure de l'urètre. La prostate et les vésicules séminales produisent le liquide séminal. Ce fluide est riche en molécules ionisées (citrate, zinc, polyamines, glycoprotéines), en enzymes et en facteurs de croissance qui favorisent la traversée de la glaire cervicale par les spermatozoïdes et assurent leur protection contre les agents cytotoxiques. Selon le modèle anatomique proposé par McNeal [1], la prostate est composée de quatre zones : une zone antérieure fibro-musculaire où le cancer de la prostate ne se développe que très rarement, une zone centrale siège de 8 % des cancers prostatiques, une zone de transition qui donne naissance à 25 % des carcinomes, et une zone périphérique où se développent la grande majorité des cancer de la prostate (70 % des cas) (figure 1). La zone périphérique, la zone centrale et la zone de transition forment le compartiment glandulaire.

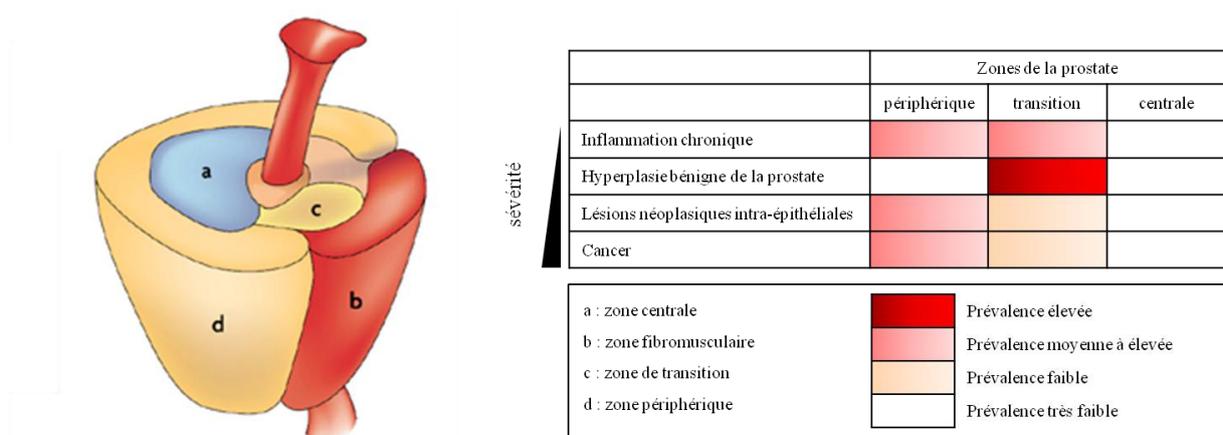


Figure 1 : Zones anatomiques de la prostate et prédisposition aux pathologies prostatiques. Adapté de De Marzo 2007.

1.2. Structure cellulaire de la prostate

La prostate est formée de glandes et de stroma. L'épithélium glandulaire, qui représente 60% du tissu prostatique, est formé d'acini composés de trois types cellulaires, les cellules luminales, basales et les cellules neuroendocrines (figure 2). Ces cellules épithéliales expriment des marqueurs distincts et possèdent des fonctions spécifiques. Chez l'adulte, les cellules luminales sont responsables de la sécrétion du liquide prostatique. Elles sont différenciées, non-prolifératives et bordent la lumière des acini [2]. Elles expriment l'antigène spécifique de la prostate (PSA) [3] et le récepteur des androgènes (AR) [4]. Les cellules luminales nécessitent d'ailleurs une exposition continue aux androgènes pour leur survie, ce qui définit le phénotype androgéno-dépendant [5]. Elles expriment également des marqueurs épithéliaux comme les cytokératines (CK) CK8 et CK18. Les cellules épithéliales basales séparent les cellules luminales de la membrane basale. Ce sont des cellules prolifératives androgéno-indépendantes. Elles expriment le marqueur CD44, ainsi que les cytokératines CK5 et CK14. Les cellules neuroendocrines sont très peu nombreuses et distribuées de manière irrégulière entre la couche basale et la couche luminaire de la glande (figure 2). Les cellules neuroendocrines sont issues des cellules souches de la prostate et agissent de façon paracrine sur la prolifération et la différenciation des cellules environnantes [6]. Ces cellules expriment les marqueurs épithéliaux CK5, CK14, CK18, ainsi que les marqueurs neuroendocrines comme la synaptophysine, la chromogranine A et la somatostatine.

La zone fibro-musculaire, aussi appelée stroma, est principalement composée de fibroblastes. Cette zone est également constituée de cellules musculaires lisses, de nerfs, de cellules dendritiques et de vaisseaux sanguins. Les cellules du stroma sécrètent des facteurs de croissance participant au renouvellement de l'épithélium et à son activité sécrétoire. Les fibroblastes notamment, sont capables d'interagir avec les cellules environnantes via la sécrétion de PEIF (prostatic epithelium inhibiting factor) [7]. Les fibroblastes et les cellules musculaires sont également capables d'exprimer le AR.

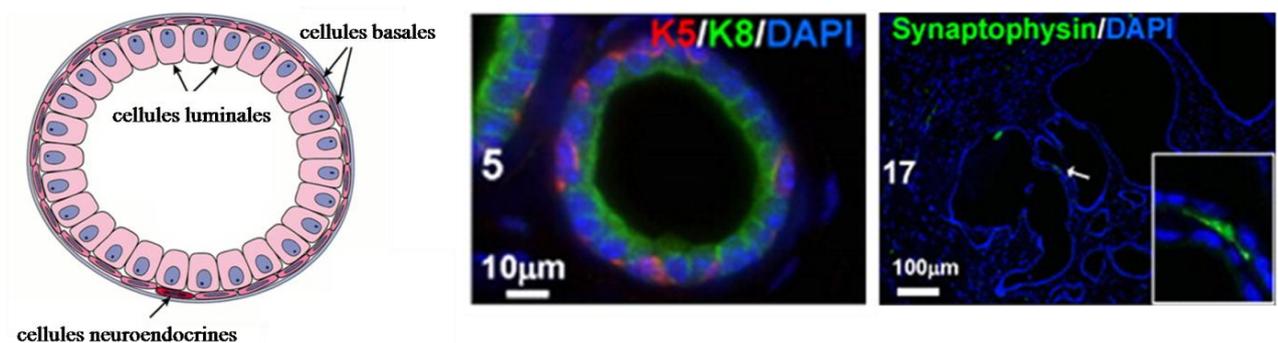


Figure 2 : Les différents types cellulaires exprimés dans les acini de la prostate. Schéma adapté de Abate-Shen 2000, immunofluorescence extraites de Goldstein 2008. Les cellules basales expriment la cytokératine 5 (K5), les cellules luminales la cytokératine 8 (K8). La synaptophysine est utilisée comme marqueur des cellules neuroendocrines.

1.3. Les modèles de cancer de la prostate

Les modèles cellulaires de cancer de la prostate (CaP) sont essentiels à l'étude de la pathologie. En effet, ils permettent l'identification des processus moléculaires mis en jeu et par conséquent la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Les modèles animaux sont des outils importants et permettent l'étude des mécanismes identifiés *in vitro* à l'échelle d'un organisme. Ils sont très utilisés pour approfondir les connaissances sur des processus comme la dissémination métastatique, mais aussi pour tester de nouvelles thérapies. En cancérologie notamment, toute nouvelle drogue est testée sur des modèles précliniques avant d'évaluer son potentiel chez les patients. L'objectif de cette partie n'est pas de détailler les modèles de CaP de façon exhaustive, mais de présenter les modèles les plus couramment utilisés.

1.3.1. Les modèles cellulaires de CaP

Les modèles cellulaires sont divisés en sous-catégories suivant leur capacité à exprimer les marqueurs prostatiques AR et PSA. Les modèles insensibles aux androgènes, qui de façon générale n'expriment pas le AR, constituent la catégorie des modèles cellulaires androgéno-indépendants. Les deux lignées les plus utilisées de cette catégorie sont les cellules PC3 et DU145 [8], [9]. Ces lignées cellulaires se cultivent facilement et plusieurs sous-lignées en ont été dérivées pour augmenter leurs pouvoirs métastatiques (notamment par implantation chez l'animal). Il existe de nombreuses autres lignées cellulaires androgéno-indépendantes, mais celles-ci sont moins utilisées. Les lignées cellulaires de CaP androgéno-sensibles expriment le AR et nécessitent la présence d'androgènes pour leur survie. Ces modèles sont peu nombreux, les lignées LNCaP, ARCaP et 22RV1 étant les plus communément utilisées [10]–[12]. Le modèle 22RV1 est particulier puisqu'il est issu d'une tumeur primaire de CaP, contrairement aux modèles décrits précédemment établis à partir de métastases (tableau 1). Ces modèles sont très peu nombreux car leur mise en culture est particulièrement difficile, c'est pourquoi la majorité de ces modèles sont établis après une greffe chez l'animal (notamment 22RV1 et PPC-1). La lignée IGR-CaP1, établie au laboratoire, est une nouvelle lignée androgéno-indépendante issue d'une tumeur primitive sans passage chez l'animal [13]. Enfin, il existe des lignées cellulaires immortalisées *in vitro* par transduction de protéines virales (antigène T du virus SV40, papillomavirus 18) ou avec le gène de la télomérase. Cette technique permet d'établir des lignées de stades plus précoces dans le CaP (BPH-1 [14]) mais également des lignées issues de tissus normaux (RWPE-1 [15]).

De façon générale, les lignées cellulaires les plus tumorigéniques sont très utilisées pour réaliser des xéno greffes chez la souris. Ces modèles sont utilisés pour évaluer l'efficacité des nouveaux traitements et réaliser les preuves de concept. Les modèles de CaP maintenus chez l'animal, bien que plus contraignants, sont également utilisés pour les évaluations précliniques.

1.3.2. Les modèles animaux de CaP

De nombreux modèles animaux sont établis à partir de xénogreffes (orthotopique, sous-cutanée...) de matériel tumoral humain. Les xénogreffes issues de tumeurs de patients (PDX) ont par exemple donné naissance aux modèles LuCaP35[16] et CWR22 [17]. Il existe également des modèles animaux développant des CaP spontanés, comme les modèles de rat Dunning R-3327 et Lobund Wistar [18]. Ces deux modèles récapitulent les événements majeurs de progression tumorale prostatique. Le chien est la deuxième espèce non humaine capable de développer des cancers spontanés, cependant la disponibilité de ce modèle reste un handicap à son utilisation. Enfin, les connaissances sur le CaP ont conduit au développement de souris transgéniques pour lesquelles l'expression d'un ou plusieurs gènes est altérée. Ces modèles représentent des outils indispensables à la compréhension des mécanismes de tumorigénèse dans la prostate. Les différents modèles transgéniques couramment utilisés dans la littérature sont décrits par Scott *et al.* [19].

Lignée cellulaire	origine	AR	PSA	tumorigénicité
PC3	métastase os	-	-	+
DU145	métastase cerveau	-	-	+
LNCaP	métastase ganglion	+	+	+
ARCaP	ascites	+	+	+
MDA PCa2a	métastase os	+	+	+
MDA PCa2b	métastase os	+	+	+
C4	dérivée de LNCaP	-	+	+
C4-2	dérivée de LNCaP	-	+	+
DuCaP	métastase dure-mère	+	+	+
VCaP	métastase os	+	+	+
22RV1	CaP	+	+	+
PPC-1	CaP	+	+	ND
IGR-CaP1	CaP	-	-	+
Dérivées de PDX	origine	AR	PSA	androgéno-sensible
LuCaP 35	métastase ganglion	+	+	+
CWR22	CaP	+	+	+
PAC-120 HD	CaP	+	+	+
PAC-120 HID	CaP	+	+	-
PC-82	CaP	+	+	+
LuCaP 23.1	métastase ganglion		+	+
HONDA	métastase testicule	+	-	+
Lignée immortalisée	immortalisation	AR	PSA	tumorigénicité
PNT1A	T-SV40	-	-	+
PNT1B	T-SV40	-	-	+
PNT2-C2	T-SV40	-	-	-
BPH-1	T-SV40	-	-	-
RWPE-1	HPV-18	+	+	-
957E/hTERT	hTERT	-	-	ND
RC-58T	hTERT	+	+	+

Tableau 1 : Modèles cellulaires du cancer de la prostate les plus couramment utilisés.

2. Progression tumorale du cancer de la prostate

Le CaP est la conséquence du développement malin de lésions néoplasiques intra-épithéliales prostatiques (PIN). Il ne se développe pas à la suite d'autres pathologies telles que l'hyperplasie bénigne de la prostate ou l'hyperplasie adénomateuse atypique [20]. Comme dans la majorité des cancers, le CaP est causé par l'accumulation d'altérations génétiques qui conduisent à la prolifération des cellules malignes. Ces altérations génomiques peuvent être causées par l'inflammation chronique de la prostate suite à des épisodes de prostatites [21] ou par le stress oxydatif associé au vieillissement cellulaire [22]. Certaines altérations génétiques sont aussi transmises de manière héréditaire. Aux stades plus avancés, les cellules du CaP se différencient et acquièrent la capacité d'envahir d'autres tissus entraînant le développement de métastases (figure 3).

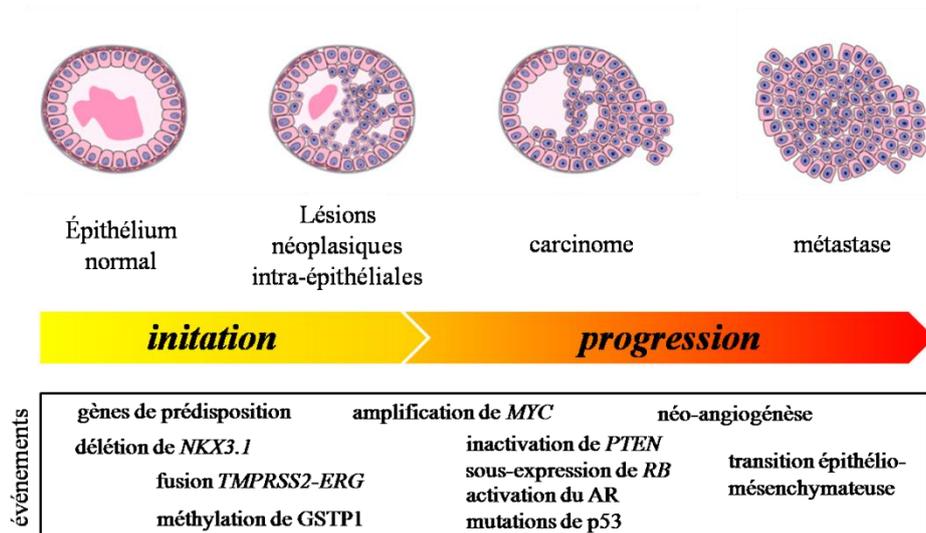


Figure 3 : Événements impliqués dans la progression tumorale du CaP. Adapté de Shen 2010.

2.1. Altérations génétiques impliquées dans l'initiation du cancer de la prostate

De manière générale, peu de mutations sont retrouvées dans les tumeurs de prostate. Cette pathologie est cependant caractérisée par un grand nombre de remaniements chromosomiques.

2.1.1. Les gènes de prédisposition

Certaines mutations ou délétions sont retrouvées dans les familles ayant une forte prédisposition à développer la maladie. Cependant, contrairement à d'autres cancers courants comme le cancer du sein ou du colon, où un faible nombre de gènes de susceptibilité explique une grande proportion des familles à haut risque, la prédisposition héréditaire au CaP peut être provoquée par un grand nombre de gènes différents. Les études génomiques haut-débit ont permis d'identifier plusieurs

gènes de prédisposition [23]. *RNASEL* fut le premier gène de susceptibilité identifié dans le CaP [24]. L'expression du variant d'épissage R462Q de ce gène a été associée à une augmentation du risque de développer un cancer sporadique [25]. L'expression de variants de *CHEK2*, un régulateur de la réponse aux dommages de l'ADN, est associée à une modeste augmentation du risque de développer un CaP [26]. Un lien a été suggéré entre le développement du cancer de la prostate et les gènes de prédisposition au cancer du sein *BRCA1* et *BRCA2* [27]. L'étude IMPACT évalue actuellement le rôle des mutations dans ces deux gènes sur le développement du CaP.

2.1.2. Hyperméthylation de *GSTP1*

La glutathion-s-transférase (*GSTP1*) est une protéine impliquée dans le mécanisme de détoxification et dans la protection contre le stress oxydatif. La perte de l'activité de *GSTP1* par méthylation augmente le risque de dommages à l'ADN et sensibilise les cellules aux phénomènes de carcinogénèse induits par l'alimentation, les oxydants et par l'inflammation [28]. L'hyperméthylation du promoteur de *GSTP1* est observée dans 90% des adénocarcinomes prostatiques, 70% des PIN de haut grade et jamais dans l'épithélium normal [29].

2.1.3. Délétion du gène *NKX3.1*

Les altérations partielles du chromosome 8 sont fréquemment retrouvées dans les cancers de la prostate. Les délétions au niveau du chromosome 8p sont observées de façon précoce dans la carcinogénèse prostatique [30]. Parmi les gènes localisés en 8p, on retrouve le gène *NKX3.1*, codant pour une protéine impliquée dans la morphogénèse des canaux prostatiques et dans la différenciation et l'acquisition des fonctions sécrétoires par les cellules épithéliales prostatiques. La protéine *NKX3.1* est normalement exprimée par l'épithélium prostatique normal, alors qu'elle est absente dans les PIN et les cellules tumorales. Les délétions de la région codant pour ce gène sont observées dans près de 85% des adénocarcinomes prostatiques [31].

2.1.4. Expression du gène de fusion *TMPRSS2-ERG*

Le gène de fusion *TMPRSS2-ERG* est retrouvé dans environ 70% des adénocarcinomes prostatiques [32]. Ce gène de fusion est obtenu par translocation sur le bras long du chromosome 21. La translocation place les séquences promotrices du gène *TMPRSS2* en amont de la séquence codant pour le gène *ERG*. La fusion des gènes *TMPRSS2* et *ERG* est un événement précoce dans la carcinogénèse [33]. Le gène *TMPRSS2* code pour la sérine protéase transmembranaire 2, une protéine multimérique à domaine sérine-protéase contrôlée par les androgènes. *ERG* est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de nombreux processus biologiques comme la prolifération cellulaire, la différenciation et la réponse au stress [34]. La fusion *TMPRSS2-ERG* provoque une surexpression de *ERG* contrôlée par les androgènes. L'utilisation d'un modèle murin transgénique

exprimant ETV1, un gène cible de TMPRSS2-ERG, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la prostate entraîne le développement de PIN. Cependant, aucune souris ne développe de carcinomes invasifs, suggérant que d'autres altérations génétiques sont également nécessaires à la progression tumorale du CaP [35].

2.2. Evolution du cancer de la prostate, du PIN au carcinome

2.2.1. Surexpression de l'oncogène *MYC*

L'oncogène *MYC* est situé au niveau de la région chromosomique 8q24. Ce gène est amplifié dans les tumeurs avancées de la prostate [36]. En réponse aux signaux du microenvironnement cellulaire, *MYC* peut réguler un large spectre d'activités biologiques distinctes, telles que le cycle cellulaire, la croissance cellulaire, l'apoptose, l'instabilité génomique, ou encore l'angiogénèse. L'amplification de *MYC* est corrélée avec la progression tumorale, le grade et un mauvais pronostic du CaP [37]. Il a été montré que l'amplification du gène *MYC* est aussi associée à un fort pouvoir métastatique [38]. *In vivo*, les souris surexprimant *MYC* développent des PIN capables de progresser vers un carcinome invasif et dans de rares cas vers la métastase [39]. *MYC* est également impliqué dans le processus de différenciation cellulaire. Il a été montré que la co-expression de *MYC* et de la kinase PIM-1 entraînait le développement de carcinome à différenciation neuroendocrine [40]. De manière intéressante, Gurel *et al.* ont montré à partir de tumeurs de patients que *MYC* pouvait avoir un rôle dans l'initiation du CaP, la protéine étant surexprimée dans les lésions PIN en l'absence d'amplification du gène [41]. La surexpression de *MYC* représente donc un événement majeur dans la tumorigénèse du CaP.

2.2.2. Inactivation de *PTEN*

PTEN (phosphatase and tensin homolog) est un gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 10 (q23.31). Il code pour une phosphatase antagoniste de la phospho-inositol-3-kinase (PI3K) capable d'inhiber la voie de signalisation PI3K/Akt. *PTEN* intervient également dans le maintien du cytosquelette et la migration cellulaire [42]. L'inactivation de *PTEN* est fréquente au cours du carcinome prostatique. Elle résulte le plus souvent de délétions [43], moins fréquemment de mutations [44] et son expression peut être régulée au niveau transcriptionnel [45]. La perte de *PTEN* semble corrélée au stade tumoral, elle est par ailleurs observée dans plus de la moitié des formes de CaP métastatiques [46].

2.2.3. Sous-expression de *RB*

La perte du chromosome 13q, la région contenant le gène *RB* (retinoblastoma) est retrouvée dans 50% des CaP [47]. *RB* est un gène suppresseur de tumeur activé par la cycline D1 capable de réguler la progression du cycle cellulaire en phase G1/S. *In vivo*, il a été montré que le Knock-Out du gène sur du tissu prostatique implanté en capsule sous-rénale entraînait le développement d'adénocarcinomes invasifs [48]. La sous-expression de *RB* a été identifiée dans 34% des CaP localisés et 74% des CaP métastatiques [49].

2.2.4. Mutations de *P53*

Le gène *P53* est un suppresseur de tumeur [50] muté dans 20 à 30% des CaP. *P53* a un rôle essentiel dans la transcription des gènes impliqués dans l'apoptose. *P53* est aussi impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau du checkpoint de la phase G1/S, permettant l'arrêt du cycle en cas de dommages à l'ADN. Ce mécanisme assure le maintien de l'intégrité du génome [51]. Dans le CaP, les mutations de la séquence codante de *P53* entraînent un dysfonctionnement de l'apoptose et favorisent l'accumulation de cellules tumorales ayant des anomalies génétiques susceptibles d'entraîner une prolifération androgéno-indépendante [52]. Chez les patients, les mutations *P53* sont rares au stade du CaP localisé (20 à 30%) mais fréquentes dans les stades avancés de la maladie, notamment dans le CaP métastatique (environ 70%) [53].

2.2.5. Activation de la signalisation du récepteur des androgènes

Les androgènes sont des hormones synthétisées à partir du cholestérol, capables de réguler le développement et le maintien des caractères masculins chez les vertébrés en se liant spécifiquement à leur récepteur (AR). La testostérone est le principal androgène circulant chez l'homme. Elle est produite quasi-exclusivement par les cellules du testicule puis transformée en dihydrotestostérone (DHT) dans la prostate par la 5 α réductase. Le second organe sécréteur d'androgènes chez l'homme est la glande surrénale. En l'absence de stimulation par les androgènes, le AR est associé aux protéines de choc thermique (HSP) et séquestré dans le cytoplasme [54]. Après activation par l'hormone, le AR se dissocie des protéines chaperones, ce qui entraîne sa translocation dans le noyau sous forme de dimère où il se lie aux éléments de réponse aux androgènes (ARE) pour induire la transcription de ses gènes cibles (figure 4) [55]. La signalisation du AR joue un rôle crucial dans le développement et l'homéostasie de la prostate chez l'homme en stimulant la prolifération cellulaire et en inhibant l'apoptose [56]. Par conséquent, l'activation non contrôlée du AR dans les cellules de la prostate entraîne le développement et la progression tumorale [57]. L'activation continue du AR est maintenue par différents mécanismes comme l'amplification du gène du AR [58], des mutations au niveau des sites d'activation du récepteur [59], ou la modulation de l'expression d'enzyme du métabolisme des androgènes. Les cellules tumorales sont également capables de convertir les androgènes surrénaliens

en testostérone et DHT, entraînant l'activation autocrine du AR [60]. L'utilisation de rat Lobund-Wistar a permis de montrer que la présence d'androgènes est requise pour le développement tumoral [61]. Chez l'homme, il a été montré que les patients atteints de pseudohermaphrodisme n'exprimant pas la 5 α réductase ne développent pas de CaP, démontrant l'importance de cette voie dans la pathologie [62].

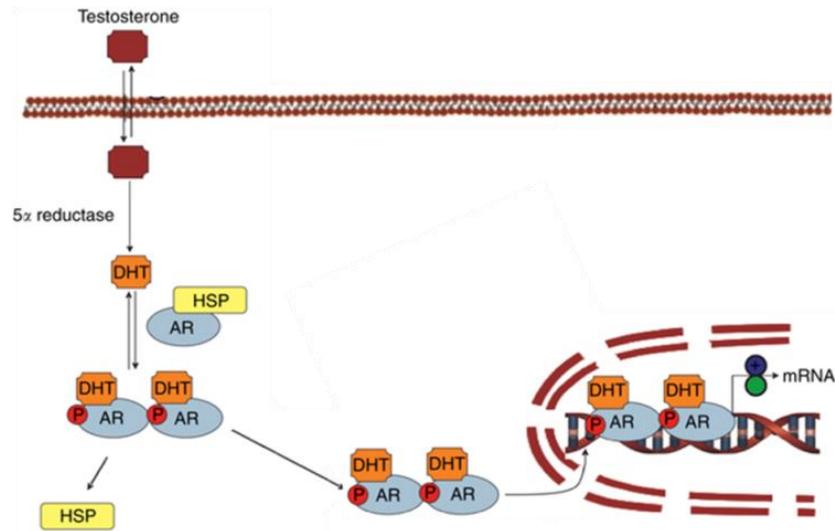


Figure 4 : Voie de signalisation du récepteur des androgènes. Adapté de Traish 2009[63].

2.3. La dissémination métastatique

La dissémination métastatique correspond au stade le plus avancé du CaP. Ce processus nécessite le développement d'un réseau vasculaire intra-tumoral, ainsi que la perte de l'adhésion à la membrane basale et l'acquisition de propriétés invasives par les cellules tumorales (figure 5).

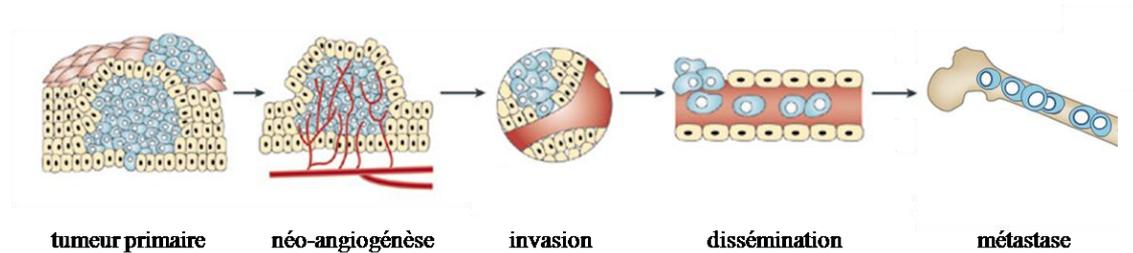


Figure 5 : Processus métastatique. Adapté de Fidler 2003.

2.3.1. La néo-angiogénèse tumorale

L'angiogénèse est le processus qui permet aux vaisseaux sanguins et lymphatiques de se mettre en place dans un organe pour en assurer l'oxygénation, l'apport de nutriments et l'élimination des déchets. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est un facteur essentiel dans la néo-angiogénèse tumorale. Dans les cellules PC3 et LNCaP, l'expression du VEGF est régulée par l'hypoxie, montrant que la néo-angiogénèse est une réponse à la raréfaction des ressources associée à la croissance tumorale [64]. Il a été montré que l'utilisation d'anticorps neutralisants du VEGF retardait la croissance tumorale et la dissémination métastatique des xénogreffes de cellules DU145 [65]. Enfin, il a été décrit que les récepteurs du VEGF, VEGFR-1 et VEGFR-2, sont surexprimés à la surface des cellules d'adénocarcinome de la prostate moyennement différenciées [66]. Ces données démontrent que les cellules de CaP participent activement à la néo-angiogénèse tumorale.

2.3.2. La différenciation cellulaire

La dissémination métastatique est dépendante de l'acquisition de propriétés de migration et d'invasion par les cellules tumorales. Le mécanisme de différenciation cellulaire nécessaire à ce processus est appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Comme nous le verrons de façon détaillée par la suite (Chapitre 4), l'EMT est déclenchée par des facteurs externes et implique l'activation de voies de signalisation comme la voie PI3K/Akt, ou les voies impliquées dans le développement embryonnaire (WNT, Notch et Hedgehog). Les cellules mésenchymateuses expriment des enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire (ECM) et possèdent une architecture du cytosquelette qui facilite leur migration. Ces modifications permettent l'invasion des cellules et leur dissémination dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins. Elles permettent aussi l'extravasation et la colonisation du site métastatique.

2.3.3. Les métastases osseuses

Les métastases osseuses représentent plus de 90 % des métastases du CaP. Les complications dues aux métastases osseuses (comme les douleurs, les fractures et les compressions médullaires) sont responsables de la mortalité du CaP [67]. Il existe deux catégories de métastases osseuses : les métastases ostéocondensantes et ostéolytiques. Contrairement à ce que l'on observe dans le cancer du sein où les métastases sont majoritairement ostéolytiques, les métastases du CaP sont le plus souvent ostéocondensantes ou présentent une association des deux phénomènes.

Les métastases ostéocondensantes sont caractérisées par une augmentation de l'activité des ostéoblastes, ce qui entraîne une production d'os à l'architecture désorganisée et sujet aux fractures. L'endothéline joue un rôle prépondérant dans la production osseuse. L'endothéline est impliquée dans la formation des métastases ostéocondensantes du CaP chez l'homme et chez la souris [68]. Dans le cas des lésions ostéolytiques, l'augmentation de l'activité des ostéoclastes entraîne la résorption de l'os. L'ostéolyse est un processus complexe dont l'acteur principal est l'axe RANK/RANKL. La fixation de RANKL à son récepteur induit la maturation des ostéoclastes et promeut l'ostéolyse [69]. *In vitro*, il a été montré que la co-culture de cellules ostéoclastes-like humaines avec les lignées PC3, LNCaP et DU145 augmentait fortement l'expression de RANKL dans les cellules de CaP [70]. Chez les patients, Brown *et al.* ont montré que les cellules prostatiques tumorales sont capables de produire RANKL et que la sécrétion de ce facteur est plus importante dans les métastases osseuses comparée aux autres sites métastatiques [71].

3. Les marqueurs du cancer de la prostate utilisés en clinique

A ce jour, le marqueur biochimique principal du CaP est le PSA. Le PSA est une sérine protéase appartenant à la famille des kallikréines, sécrétée par les cellules épithéliales prostatiques, ayant un rôle dans la liquéfaction du sperme. Il existe une corrélation entre le taux sérique de PSA et le volume de la glande prostatique. Il est admis qu'une concentration normale de PSA est comprise entre 0 et 4 ng/ml, une valeur supérieure à 10 ng/ml permet de suspecter un cancer localisé, une valeur supérieure à 40 ng/ml fait suspecter un CaP étendu aux ganglions ou d'autres organes, une valeur supérieure à 100 ng/ml entraîne le diagnostic d'un CaP métastatique. Le diagnostic du CaP basé sur le dosage de la PSA doit être confirmé par des biopsies prostatiques. Le PSA est également un indicateur de la réponse aux traitements. D'autres marqueurs comme le taux de phosphatases acides (PAP) ou de phosphatases alcalines (PAL) sont utilisés pour le suivi des patients mais pas pour le diagnostic.

4. Épidémiologie du cancer de la prostate

En France et dans les pays occidentaux, le CaP représente un problème de santé publique majeur. C'est le cancer le plus fréquent chez l'homme, suivi par le cancer du poumon et le cancer colorectal. Le CaP est la troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme et représente plus de 10% des décès par cancer (recensement INCA 2013, tableau 2). Cependant, alors que le nombre de cas augmente, le nombre de mort reste stable, voire diminue depuis le dernier recensement. Ceci est dû à une augmentation des dépistages effectués durant ces dernières années, conduisant à un surdiagnostic. L'âge est le principal facteur de risque du CaP avec un âge moyen au diagnostic de 71 ans en France (INCA, 2005). Le CaP est également une maladie à évolution lente. Selon l'American Cancer Society, le taux de survie à 5 ans après le diagnostic est de 100%, de 99% à 10 ans et de 94% à 15 ans. Cependant, du fait de son incidence croissante avec l'âge et du vieillissement de la population [60], le traitement efficace du CaP devient une priorité.

Localisation	Effectif- Nouveaux cas	Contribution à l'ensemble des cancers	Effectif- décès	Contribution à l'ensemble des décès par cancers
PROSTATE ^a	53 465	26.7	8 876	10.4
Colon-rectum	23 226	11.6	9 275	10.9
Poumon	28 211	14.1	21 326	25.0
Vessie	9 549	4.8	3 574	4.2
Pancréas	5 963	3.0	nd	nd
Rein	7 781	3.9	2 651	3.1
Lèvre-bouche- pharynx	8 033	4.0	2 465	2.9
Mélanome cutané	5 429	2.7	954	1.1
Foie	6 867	3.4	nd	nd
Thyroïde	2 324	1.2	145	0.2
Estomac	4 308	2.2	2 834	3.3
Système nerveux central	2 814	1.4	1 761	2.1
Oesophage	3 503	1.7	2 653	3.1
Larynx	2 821	1.4	783	0.9
Testicules	2 317	1.2	85	0.1
Tous cancers ^{aa}	200 350	100.0	85 255	100.0

Tableau 2 : Incidence et mortalité estimées des principaux cancers chez l'homme en 2012 en France. Source INCA

5. Les options thérapeutiques dans le traitement du cancer de la prostate

Au stade précoce, le CaP localisé et confiné à la capsule prostatique peut-être traité de façon curative par intervention chirurgicale et radiothérapie. Cependant, s'il est diagnostiqué trop tard, le carcinome prostatique évolue vers des stades plus avancés de la maladie caractérisés par l'invasion des tissus environnants puis l'apparition de métastases. La transition vers le CaP métastatique est généralement liée à l'apparition d'une résistance aux androgènes, généralement provoquée par l'utilisation des thérapies anti-hormonales.

5.1. Les traitements locaux

La prostatectomie radicale consiste en l'exérèse de l'ensemble de la prostate, des vésicules séminales et d'une partie des canaux déférents. La mortalité observée suite à cette intervention est quasi nulle (< 1 %). Les complications de la prostatectomie radicale sont essentiellement l'impuissance et l'incontinence urinaire. La complication la plus sévère de cette intervention est la récurrence locale due à une tumeur résiduelle.

La radiothérapie peut être utilisée de façon postopératoire à titre adjuvant ou en cas de récurrence locale. En radiothérapie externe, les doses délivrées sont classiquement de 66-70 Gy pendant 5 à 7 semaines. La mortalité est nulle et les complications locales correspondent essentiellement à des sténoses de l'urètre. Dans 40 à 60% des cas, il peut apparaître une impuissance sexuelle qui s'installe progressivement en quelques années.

La curiethérapie est un type de radiothérapie locale au cours de laquelle des grains d'iode radioactif (140 Gy) sont implantés dans la prostate tumorale, sous contrôle échographique. Son indication est réservée à des formes de bon pronostic (PSA < 10ng/ml), avec un volume prostatique de moins de 60cm³. Les effets secondaires sont retardés de quelques semaines, et consistent en l'apparition de difficultés mictionnelles et des douleurs pelviennes. Les risques d'incontinence sont très faibles et seulement 20 à 30% des patients présentent une impuissance.

5.2. Déprivation androgénique

Les thérapies de déprivation en androgènes sont utilisées dans le traitement du CaP depuis la découverte de leur efficacité en 1941 [72]. La diminution de l'action des androgènes peut être obtenue

par pulpectomie et castration chimique. La pulpectomie est une intervention chirurgicale consistant en l'ablation de la pulpe du testicule afin de supprimer la sécrétion endocrine de testostérone.

La castration androgénique chimique est réalisée par traitement avec des analogues de la LH-RH et/ou des anti-androgènes périphériques. Les analogues de la LH-RH sont administrés par voie parentérale pour inhiber la synthèse de testostérone par les testicules. La stimulation en continue de l'axe hypothalamo-hypophysaire par les analogues de la LH-RH provoque une inhibition de la synthèse de testostérone. Les anti-androgènes périphériques se lient de manière compétitive au AR au niveau du site de liaison de la DHT et inhibent sa signalisation. Les anti-androgènes sont parfois utilisés en association avec les analogues de la LH-RH pour obtenir un blocage androgénique complet.

Dans la majorité des cas, un phénomène d'échappement est observé 2 à 3 ans après le début du traitement anti-androgénique. Ce phénomène, appelé résistance à la castration, est associé avec l'apparition de métastases et représente le stade ultime de la progression tumorale du CaP. On parle alors de CaP métastatique résistant à la castration (mCRPC).

5.3. Les traitements du CRPC

5.3.1. L'hormonothérapie de troisième génération

De nombreuses études ont montré que la voie de signalisation du AR reste un élément critique de la progression tumorale chez les patients traités par les anti-androgènes. Les mécanismes de résistance à ces thérapies sont l'augmentation de la synthèse enzymatique d'androgènes par les cellules tumorales, notamment à partir des androgènes surrénaliens, une sensibilité accrue aux androgènes par surexpression du récepteur, des mutations du AR ou l'expression de variants d'épissage menant à une activation facilitée ou constitutive de la voie de signalisation [73]. Ces connaissances ont mené au développement de stratégies plus efficaces pour cibler la voie du AR chez les hommes atteints de CRPC. L'acétate d'abiratérone inhibe l'enzyme 17 α -hydroxylase/C17-20-lyase (CYP17), qui possède les deux activités enzymatiques, permettant d'une part le blocage de la biosynthèse des androgènes testiculaires et surrénaliens, et d'autre part un blocage de la biosynthèse des androgènes par la cellule tumorale qui exprime cette enzyme [74]. L'abiratérone agit donc sur la composante intra et extra-tumorale de la synthèse des androgènes. Récemment, l'abiratérone a montré son efficacité chez les patients atteints de CRPC [75], conduisant à son approbation par la FDA (Food and Drug Administration). D'autres hormonothérapies de nouvelle génération ont été développées comme l'enzalutamide (MDV3100) et l'ortéronel (TAK-700). Leur mécanisme d'action et leur efficacité clinique seront détaillés dans le Chapitre 3.

5.3.2. Thérapies ciblant les métastases osseuses

Les complications associées à l'apparition des métastases osseuses diminuent la qualité de vie et menacent la survie des patients avec une médiane de survie globale d'environ 1,5 à 2 ans. C'est pourquoi plusieurs thérapies ont été développées pour cibler spécifiquement les métastases osseuses.

Le radium 223 est un isotope utilisé en radiothérapie. Due à sa structure chimique proche de celle du calcium, le radium est absorbé par les métastases osseuses et induit leur destruction par émission de radiations α . Les radiations α ont un faible taux de pénétration (environ 2 à 6 cellules) permettant de sauvegarder les tissus sains environnants [76]. L'efficacité du Radium 223 a été évaluée lors d'un essai clinique de phase III chez les patients métastatiques. Les auteurs ont montré que le radium 223 entraîne une augmentation de la survie globale des patients [77], menant à son approbation par la FDA dans les cas de CRPC présentant des métastases osseuses.

Le denosumab est un anticorps monoclonal dirigé contre RANKL utilisé dans les maladies dégénératives de l'os comme l'ostéoporose et les tumeurs osseuses non opérables. L'efficacité du denosumab a été étudiée dans le traitement des métastases osseuses de CaP dans une étude de phase III. Chez les patients CRPC non métastatiques, le denosumab retarde l'apparition des métastases osseuses et diminue les douleurs associées, sans toutefois augmenter la survie globale [78]. Cette étude a permis l'approbation du denosumab par la FDA pour le traitement des CRPC non métastatiques.

5.3.2. Immunothérapies dirigées contre les cellules de prostate

Les immunothérapies anticancéreuses sont des approches visant à traiter le cancer en activant la réponse immunitaire contre les cellules malignes. La preuve de ce concept a été apportée par Small *et al.* En effet, les auteurs ont montré que l'injection sous-cutanée de GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), un facteur stimulant la réponse immunitaire, permettait une diminution du volume tumoral chez les patients CRPC [79]. Le CaP est une cible idéale pour ces stratégies du fait que les cellules tumorales expriment plusieurs antigènes spécifiques comme le PSA ou la PAP.

Cette notion a mené au développement du Sipuleucel-t, un vaccin anti-tumoral utilisant la capacité de présentation des antigènes des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont obtenues chez le patient par leucaphérèse. Elles sont ensuite transformées *ex vivo* pour produire une protéine de fusion constituée de PAP et du GM-CSF. Les cellules sont ensuite réinjectées aux patients, déclenchant une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales exprimant le PAP. L'efficacité du Sipuleucel-t a été évaluée dans un essai de phase III chez les patients atteints de CRPC métastatique. L'utilisation du vaccin entraîne un bénéfice de survie globale chez les patients, sans effet sur la survie sans progression [80]. Cette étude a conduit à l'approbation de cette thérapie par la FDA

et l'agence européenne du médicament, qui conseille son utilisation chez les patients métastatiques peu symptomatiques ou asymptomatiques chez lesquels la chimiothérapie n'est pas indiquée. Cependant, du fait de son coût, ce traitement n'est pas prescrit en Europe.

Suite au succès du Sipuleucel-t, un autre vaccin anti-tumoral a été développé, le PROSTVAC-VF, utilisant le même principe mais dont la cible est le PSA. Un essai clinique de phase II a montré que la thérapie est bien tolérée par les patients et une augmentation de la survie globale a été observée [81].

5.3.3. Les taxanes dans le traitement des CRPC métastatiques

La majorité des tumeurs de la prostate est caractérisée par une croissance lente, même au stade métastatique, les rendant peu sensibles aux drogues ciblant la réplication de l'ADN [82]. En effet, les agents chimiothérapeutiques tels que les anthracyclines, les agents alkylants, les antimétabolites, les sels de platine et les inhibiteurs de topoisomérases n'ont pas montré d'efficacité significative lors de nombreux essais cliniques de phase II [83]. Seule l'association entre une chimiothérapie par mitoxantrone et la prednisone (un corticostéroïde anti-inflammatoire) a montré un effet palliatif élevé chez les patients mais aucun effet sur la survie globale [84]. Ces résultats ont mis en avant la nécessité d'utiliser de nouvelles classes d'agents thérapeutiques pour soigner le CRPC.

5.3.3.1. Les taxanes

5.3.3.1.1. Le paclitaxel

Identifié en 1971, le paclitaxel, extrait de l'écorce d'if (*Taxus brevifolia*) a été décrit comme un agent anti-leucémique [85]. Le traitement au paclitaxel de xénogreffes issues de tumeurs de patients (PDX) a démontré le potentiel anti-tumoral certain de cette drogue sur les métastases et tumeurs primaires de multiples cancers solides [86]. Le paclitaxel a été approuvé par la FDA comme chimiothérapie anticancéreuse de référence dans le cancer de l'ovaire avancé [87]. Cependant, l'évaluation de l'efficacité du paclitaxel dans le traitement du CRPC n'a montré qu'un effet modeste en phase II [88], [89]. Suite à ces résultats aucune phase III n'a été réalisée, n'offrant aucune alternative thérapeutique à la mitoxantrone dans le traitement des patients CRPC. La recherche de nouvelles voies de synthèse du paclitaxel a mené à la découverte d'un analogue prometteur, le docetaxel.

5.3.3.1.2. Le docetaxel

Le docetaxel a été synthétisé en 1986 à partir d'un précurseur extrait des aiguilles d'if d'Europe (*Taxus baccata*), le 10-deacetyl-baccatine III. Le docetaxel montre une efficacité anti-tumorale 2,5 fois

plus importante que le paclitaxel sur des lignées cellulaires murines de macrophage et de leucémie [90]. De manière intéressante, les données *in vitro* montrent qu'il n'existe pas de résistance croisée entre le docetaxel et le paclitaxel [90], ni avec le cisplatine [91]. L'activité anti-tumorale du docetaxel est supérieure à celle de la doxorubicine, du cisplatine et du paclitaxel dans des xénogreffes de cancer du sein [92]. En 2004, deux essais cliniques de phase III ont montré un bénéfice de survie globale chez les patients CRPC traités au docetaxel (18,9 mois contre 16,5 pour la première étude [93], 17,5 mois contre 15,6 dans la deuxième [94]). Il s'agit du premier traitement efficace dans le traitement du CRPC, amenant l'autorisation rapide de sa commercialisation en Mai 2004 aux Etats-Unis et en Aout 2004 en Europe.

5.3.3.1.3. Cabazitaxel

Le cabazitaxel est un autre dérivé hémi-synthétique développé à partir du 10-deacetyl-baccatine III. Récemment, le cabazitaxel a montré un effet cytotoxique important sur des xénogreffes issues de multiples lignées cellulaires (dont les DU145). De manière intéressante, le cabazitaxel s'est montré efficace dans le traitement de xénogreffes de lignées résistantes au docetaxel [95]. Son efficacité sur des lignées résistantes au docetaxel serait due à une rétention intracellulaire plus importante et une meilleure pénétration de la drogue au niveau de la membrane cellulaire [96]. Comme pour le docetaxel, le cabazitaxel a montré une efficacité supérieure à la mitoxantrone dans le traitement des patients atteints de CRPC [97]. Il est actuellement comparé au docetaxel dans l'essai de phase III FIRSTANA et pourrait remplacer le docetaxel en première ligne.

5.3.3.2. Mécanisme d'action des taxanes

L'étude du mécanisme d'action du paclitaxel a permis de découvrir son effet stabilisateur de microtubule et inhibiteur de la migration cellulaire [98]. Les microtubules sont des composants du cytosquelette. Ils affectent un grand nombre de fonctions cellulaires vitales et déterminent la forme de la cellule. Ils constituent le squelette des cils primaires, des flagelles et jouent un rôle important dans le guidage et le transport de matériaux intracellulaires, la sécrétion d'hormones, le transport de granules et l'accrochage de récepteurs à la membrane. Ils ont une fonction capitale dans la formation du fuseau mitotique permettant les mouvements des chromosomes lors de la mitose vers les deux pôles avant la division cellulaire [99]. Ces propriétés font des microtubules une cible thérapeutique pertinente dans le traitement des cancers.

5.3.3.2.1. Action des taxanes sur la polymérisation des microtubules

Le paclitaxel, le docetaxel et le cabazitaxel partagent le même site de liaison au niveau de la tubuline β (acide aminé 217 à 233). Le site de liaison des taxanes est situé dans une région

hydrophobe, la liaison est assurée par des liaisons hydrogènes et des contacts hydrophobes avec les hélices H1, H6 et H7 [100]. Alors que le site de liaison du paclitaxel est connu depuis les années 1990, le mécanisme moléculaire leur permettant de stabiliser les microtubules reste peu connu. Un modèle a été proposé pour expliquer la dynamique d'assemblage des microtubules. La tubuline pourrait se trouver dans deux conformations distinctes, droites et stables quand elle est liée au GTP, courbe et flexible après hydrolyse du GTP en GDP + Pi. Ce changement conformationnel serait responsable des propriétés d'assemblage/désassemblage de la tubuline [101]. Après liaison des taxanes, la tubuline β est bloquée en conformation droite, et ce même après l'hydrolyse du GTP, ce qui inhibe la dépolymérisation des microtubules (figure 6) [102]. L'instabilité dynamique est une caractéristique essentielle des microtubules. La perturbation de ce mécanisme conduit au blocage de la cellule en phase G2/M [103]. L'arrêt de la mitose en résultant déclenche le checkpoint du fuseau mitotique, ce qui entraîne une chaîne d'événements moléculaires menant à l'apoptose [104].

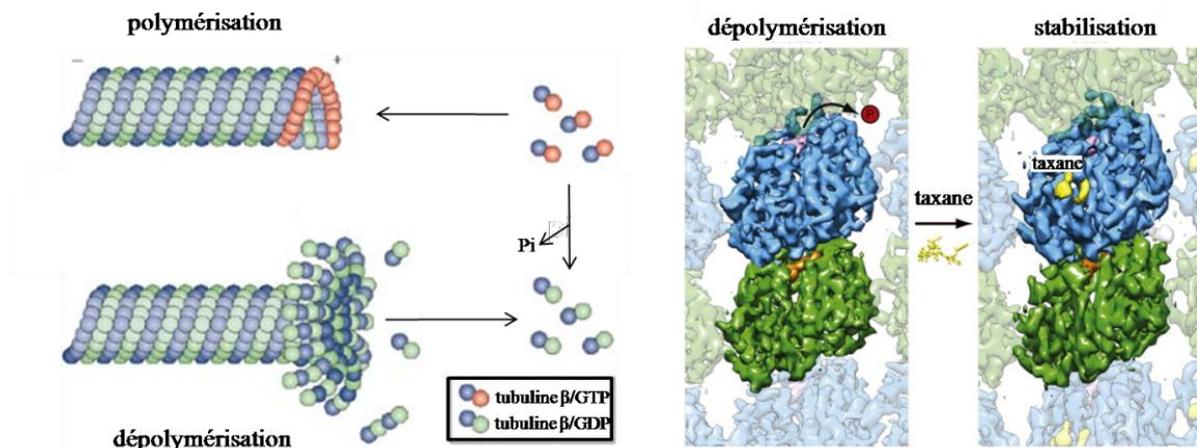


Figure 6 : Action des taxanes sur la dynamique des microtubules. Adapté de Cheeseman 2008 [105] et Alushin 2014 [106].

5.3.3.2.2. Bcl-2, une protéine centrale de l'apoptose induite par le docetaxel

La mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques est le plus souvent de type apoptotique, aussi bien dans les cellules tumorales que dans les cellules normales [107]. Plusieurs études ont montré que la voie d'apoptose privilégiée en réponse au traitement par chimiothérapie est la voie intrinsèque. L'élément central de la voie intrinsèque de l'apoptose est la mitochondrie. Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique appartenant à une large famille de régulateurs de l'apoptose. La protéine Bcl-2, localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, inhibe l'homodimérisation des protéines pro-apoptotiques Bax empêchant la libération du cytochrome c et l'activation de la cascade des caspases (figure 7).

Bcl-2 est considéré comme le gardien de l'intégrité des microtubules. Sa phosphorylation spécifique au niveau de la sérine S70 est un point de contrôle de la mitose. Les drogues antimitotiques induisent l'inactivation de Bcl-2 par phosphorylation. Il a été montré que les taxanes induisent la phosphorylation de Bcl-2 au niveau de la sérine S70, S87 et la thréonine T69 ce qui provoque un arrêt mitotique, puis la mort par la voie intrinsèque de l'apoptose [108]. De manière intéressante, le docetaxel est 10 à 100 fois plus puissant que le paclitaxel pour induire la phosphorylation de Bcl-2 dans des modèles cellulaires de cancer du sein et de prostate [109]. Ces données suggèrent que l'efficacité supérieure du docetaxel serait due à une meilleure induction de l'apoptose.

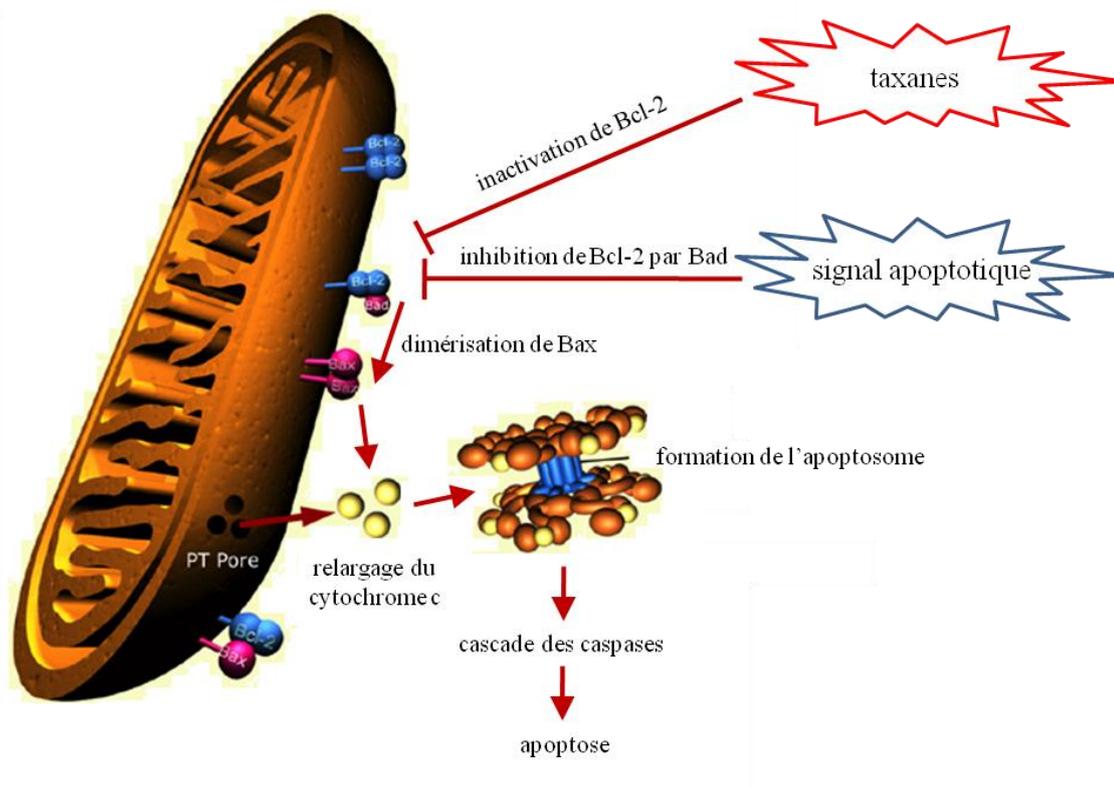


Figure 7 : Activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par les taxanes. Source: Dr Philip Dash, Université de Reading.

Le docetaxel est la première thérapie ayant montré un bénéfice de survie dans le traitement des CRPC. Cependant, une proportion significative des patients ne répond pas au traitement et développe une résistance à la chimiothérapie. Les mécanismes impliqués dans l'acquisition de la résistance au docetaxel sont répertoriés dans le chapitre suivant.

Chapitre II

Mécanismes de résistance aux taxanes dans le cancer de la prostate

Les dispositifs mis en jeu dans la résistance aux taxanes sont complexes et variés. Ils impliquent des mécanismes généraux communs à la résistance aux autres chimiothérapies, des mécanismes spécifiques liés à l'action des taxanes sur les microtubules ainsi que l'activation des voies de survie cellulaire.

1. Mécanismes généraux de la résistance aux chimiothérapies

1.1. Rôle du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est l'environnement cellulaire dans lequel la tumeur existe, il inclut le système vasculaire entourant la tumeur, les cellules immunitaires, les fibroblastes, les cytokines, le stroma et l'ECM. La perturbation de ces éléments lors de la progression tumorale peut induire une perte d'efficacité de la chimiothérapie (figure 8).

1.1.1. Défaut de distribution de la drogue

Le défaut de distribution de la drogue au site tumoral constitue l'un des mécanismes connus de résistance à la chimiothérapie [110]. Les drogues anticancéreuses atteignent les tumeurs solides via le flux sanguin et traversent l'ECM pour agir sur les cellules cancéreuses. Cependant, les vaisseaux sanguins intra-tumoraux sont désorganisés et dysfonctionnels. Ces anomalies perturbent la distribution des drogues anticancéreuses, incluant les taxanes, au site tumoral où elles doivent pénétrer profondément pour agir [111]. La distribution des drogues au site tumoral peut aussi être entravée par l'augmentation de la pression des fluides interstitiels causée par des fuites au niveau du système vasculaire, ainsi qu'au drainage lymphatique défectueux [112]. Enfin, la composition protéique de l'ECM, les interactions cellules-cellules et l'architecture tumorale peuvent affecter la pénétration de la drogue. Les tumeurs qui possèdent un réseau de collagène richement interconnecté

montrent un faible taux de pénétration des drogues à haut poids moléculaire, comparé aux tumeurs présentant un réseau de collagène désorganisé [113].

1.1.2. Hypoxie

La désorganisation du système vasculaire tumoral induit des défauts d'acheminement des nutriments et d'oxygène donnant naissance à des zones hypoxiques dans la tumeur [114]. Les cellules les plus éloignées du flux sanguin reçoivent moins de nutriment et par conséquent prolifèrent moins rapidement. La faible prolifération de ces cellules les rend moins sensibles aux drogues ciblant le cycle cellulaire. De plus, les zones hypoxiques permettent la sélection de phénotypes malins plus agressifs [115]. Par exemple, il a été montré que le facteur de transcription HIF1 α (Hypoxia Induced Factor 1 α), induit par l'hypoxie, régule l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire, la résistance aux traitements et déclenche le processus métastatique des lignées cellulaires PC3 [116]. Enfin, il a été montré que l'association du docetaxel et du TH-302, une prodrogue activée par l'hypoxie, dans des xénogreffes de cellules PC3 augmente la sensibilité des tumeurs à la chimiothérapie [117]. Ces résultats démontrent l'importance de l'hypoxie dans la réponse à la chimiothérapie par docetaxel.

1.1.3. Intégrines et adhésions cellulaires

Les intégrines sont des protéines transmembranaires essentielles pour les interactions intercellulaires et pour les interactions avec l'ECM. L'interaction des intégrines avec l'ECM entraîne une réponse cellulaire dépendante de la composition protéique de la matrice. En effet, les intégrines sont constituées de deux sous-unités, les chaînes α et β . La composition des hétérodimères d'intégrine procure la spécificité de liaison avec les divers composants de l'ECM. Par exemple, les intégrines α 1 β 1 et α 2 β 1 interagissent avec le collagène et les intégrines contenant une sous-unité α _v sont activées par la fibronectine [118].

L'implication des intégrines dans la résistance aux drogues a été observée dans une grande variété de cancers [119]. Dans le cas particulier de la résistance aux taxanes, Weaver *et al.* ont démontré que la culture de cellules de cancer du sein en présence de membrane basale reconstituée entraînait la formation d'acini résistants au paclitaxel [120]. Dans ce cas, la formation des acini est dépendante de l'activation de l'intégrine β 4 par la membrane basale. De même, il a été montré que l'inhibition de l'expression de l'intégrine β 1 dans une lignée de carcinome œsophagien résistant au docetaxel restaure sa sensibilité à la drogue [121]. Dans les cellules DU145, l'interaction des cellules avec la fibronectine active une voie de signalisation de survie qui protège les cellules tumorales de l'apoptose induite par le docetaxel [122]. Cet effet sur la survie est dépendant de la formation d'un complexe entre l'intégrine β 1 et IGF-1R (Insulin Growth Factor Receptor).

1.1.4. Cytokines inflammatoires et microenvironnement

Les cellules PC3 et DU145 expriment constitutivement plusieurs cytokines pro inflammatoires tels que l'interleukine 6 (IL-6) et le GM-CSF [123]. La production autocrine d'IL-6 est impliquée dans plusieurs aspects de la progression tumorale, notamment le processus de résistance à la castration [124]. Cependant, il a été montré que l'IL-6 est également sécrétée par les cellules du stroma tumoral dans le cancer gastrique [125]. Dans le CaP, la stimulation des cellules PC3 par de l'IL-6 exogène confère aux cellules une résistance à l'apoptose induite par divers agents cytotoxiques [126]. Le rôle de l'IL-6 dans la réponse au docetaxel a été récemment étudié chez les patients atteints de CRPC [127]. Les auteurs ont montré qu'une forte expression d'IL-6 dans les tumeurs avant traitement au docetaxel est un marqueur de mauvais pronostic de survie globale.

MIC1 (Macrophage Inhibitory Cytokine 1) est un membre de la superfamille des cytokines TGF β (Transforming Growth Factor β). MIC1 est un facteur exprimé par les macrophages du microenvironnement qui possède une activité anti-tumorale en agissant sur l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et l'angiogénèse. L'exposition de cellules PC3 avec une protéine MIC1 recombinante augmente leur résistance au docetaxel [128]. De plus, il a été montré que des cellules PC3 résistantes au docetaxel possèdent une forte expression autocrine de MIC1. L'inhibition de l'expression de MIC1 est suffisante pour restaurer la sensibilité de ces cellules au docetaxel. Chez les patients, de forts niveaux d'expression de MIC1 ont été mesurés dans des métastases de CaP, de cancer du colon et du sein [129].

La sécrétion de cytokines par les cellules de CaP peut aussi influencer sur les cellules environnantes et conférer une résistance au docetaxel. Le chemokine ligand-2 (CCL2) est un facteur soluble qui agit comme un modulateur de la croissance des métastases osseuses du CaP, en stimulant l'activité des ostéoclastes [130]. La sécrétion de CCL2 peut être induite par la chimiothérapie et peut protéger les cellules de CaP de la cytotoxicité du docetaxel en activant la Pi3K/Akt[131].

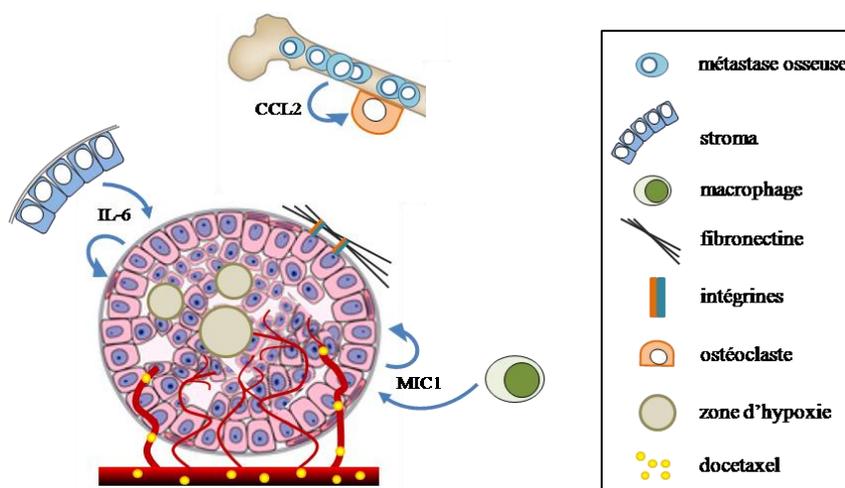


Figure 8 : Implication du microenvironnement dans la résistance au docetaxel.

1.2. Expression de pompes d'efflux des drogues

L'un des mécanismes de résistance aux drogues largement décrit et bien connu est le phénomène de résistance multiple aux drogues (MDR), qui fait intervenir des transporteurs capables d'agir comme des pompes d'efflux pour réduire la concentration intra-cytoplasmique des agents thérapeutiques. Ces pompes sont impliquées dans la résistance à des agents chimiothérapeutiques très différents. Les transporteurs MDR sont des protéines membranaires appartenant à la famille des transporteurs à cassette de liaison à l'ATP (ABC). Les transporteurs ABC sont membres d'une superfamille de protéines comprenant 49 transporteurs, divisés en 8 familles. Les membres les plus connus sont la P-glycoprotéine (P-gp), encodée par le gène *ABCB1*, la MDR protéine 1 (MRP1) encodé par le gène *ABCC1*, et la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) encodée par *ABCG2*.

L'efficacité du docetaxel est limitée par la forte affinité de ce dernier pour la P-gp. Il a été montré *in vitro* que les cellules cancéreuses qui surexpriment la P-gp deviennent résistantes au docetaxel et au paclitaxel [132]. De plus, les cellules traitées par le docetaxel ou le paclitaxel sont capables de surexprimer la P-gp, ce qui leur permet de devenir résistantes à ces drogues [133]. Au niveau clinique, la P-gp est peu exprimée dans la prostate normale [134], mais fortement exprimée dans les épithéliums tumoraux et associée avec le grade tumoral [135], montrant l'importance de l'expression de la P-gp dans la progression tumorale et la résistance au traitement.

MRP1 et BCRP sont également associées avec le phénotype MDR dans les lignées cancéreuses de prostate. En effet, l'expression ectopique de MRP1 est associée à l'induction d'un phénotype MDR dans les cellules DU145 et PC3 [136]. De même, la surexpression de BCRP dans les lignées LNCaP et CWR-RI augmente la résistance des cellules au docetaxel [137]. Chez les patients, l'expression de MRP1 corrèle avec le stade tumoral du CaP [135]. L'inhibition des pompes d'efflux constitue donc une approche thérapeutique possible pour le traitement des CRPC résistant à la chimiothérapie.

1.3. Hétérogénéité tumorale et cellules souches cancéreuses

Pendant de nombreuses années, les tumeurs ont été considérées comme une entité homogène contenant des cellules relativement identiques. A partir des années 1960, cette théorie a commencé à être réfutée, lorsque plusieurs études ont montré qu'une tumeur était constituée de cellules hétérogènes ayant des capacités différentes de prolifération, de tumorigénèse et de dissémination [138]. *In vitro*, Park *et al.* ont montré que seule une faible proportion de cellules leucémiques était capable de former des colonies [139]. Ils proposèrent l'hypothèse selon laquelle ces cellules cancéreuses sont originaires d'une sous-population de cellules ayant un potentiel prolifératif illimité, appelées cellules souches cancéreuses (CSC). Dans le CaP, les CSC représentent 0.1% des cellules tumorales. Elles sont

caractérisées par l'expression des marqueurs de surface CD44, CD133, et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Il a été proposé que ces cellules, qui ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier, sont responsables de la résistance aux traitements, ou de phénomènes de récurrence après traitement [140]. Dans ce sens, il a été montré qu'OCT4, un facteur de transcription critique pour le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires, est surexprimé dans les cellules CWR-R1 résistantes au docetaxel [141]. De plus, le traitement par docetaxel dans les lignées PC3 et DU145 augmente la proportion de cellules exprimant CD133 et CD44 [142]. Cette population cellulaire est associée à la résistance au docetaxel et à d'autres drogues [143]. En effet, l'inhibition de l'expression de TR4, un récepteur nucléaire impliqué dans la différenciation des cellules souches, dans les cellules C4-2 exprimant CD133 augmente leur sensibilité au docetaxel [144]. Enfin, BCRP est exprimé dans les CSC. Etant donné le rôle de BCRP dans le phénotype de MDR, il a été proposé que l'expression de BCRP pourrait être responsable de la chimiorésistance relative des cellules souches [73].

Le concept de l'implication des CSC dans la rechute après thérapie anti-tumorale est de plus en plus accepté par la communauté scientifique. Le ciblage des CSC représente donc un axe thérapeutique particulièrement intéressant (figure 9).

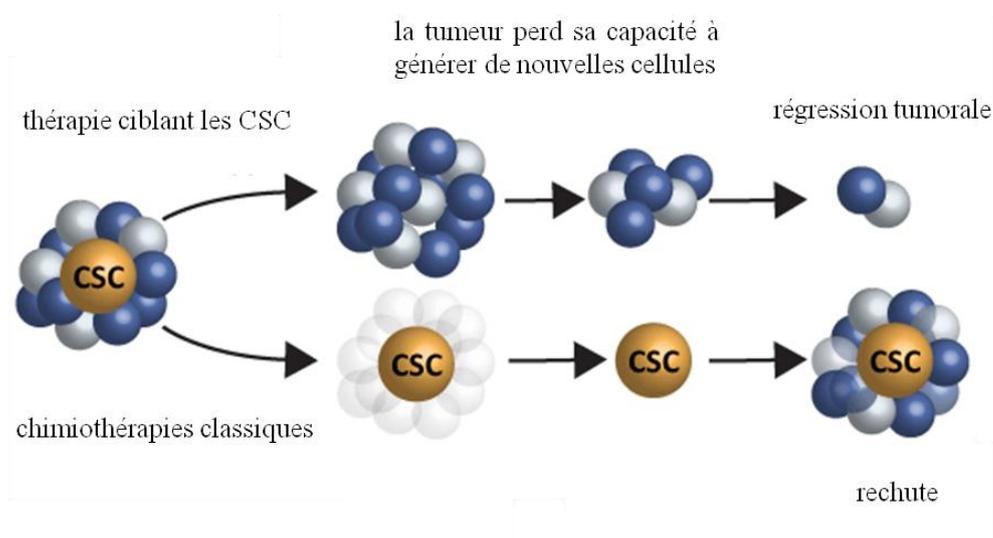


Figure 9 : Les CSC dans la résistance à la chimiothérapie. Source MacroGenics.

2. Mécanismes de résistance liés aux microtubules

La liaison des taxanes à la tubuline β augmente la stabilité des microtubules et empêche leur dépolymérisation. Cependant, les cellules tumorales développent des stratégies permettant le maintien de la dynamique des microtubules, essentielle au bon fonctionnement cellulaire.

2.1. Mutations de la tubuline β

Les mutations de la tubuline β modifient la dynamique et la stabilité des microtubules ainsi que les sites de liaison des taxanes [145]. Historiquement, les premières mutations conférant une résistance au paclitaxel ont été découvertes au niveau du site de liaison du GTP. Ces mutations touchent la phénylalanine 270 (F270V) et l'Alanine 364 (A364T) [146]. Hara *et al.* ont montré que la mutation de la phénylalanine 270 (F270I) de la tubuline β est aussi associée à la résistance au docetaxel dans une lignée de CaP dérivée des LNCaP résistante au docetaxel [147]. Un cluster de mutations affectant 3 leucines (L215, L217 et L228) a également été identifié en analysant des lignées de cancer de l'ovaire résistantes au paclitaxel [148]. Ces mutations sont proches du site de liaison des taxanes et sont responsables de l'acquisition de la résistance au paclitaxel [149]. L'utilisation de modèles cellulaires résistants aux épothilones, des molécules cytotoxiques dont le mécanisme d'action et le site de liaison à la tubuline β sont identiques aux taxanes, ont permis d'identifier 3 nouveaux sites de mutation T274I, R282Q et Q292E [150]. Dans une étude portant sur 49 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), les 19 patients présentant une mutation de la tubuline β n'ont pas répondu au traitement par paclitaxel [151]. A ce jour, aucune étude n'a rapporté cette mutation dans les tumeurs du CaP.

2.2. Expression des isotypes de la tubuline β

Il existe chez l'homme, sept isotypes de tubuline β (I, II, III, IVa, IVb, V, VI and VII) avec une distribution variable suivant les tissus. *In vitro*, l'expression de la tubuline β III est associée à la résistance au paclitaxel dans diverses lignées cancéreuses humaines (prostate, poumon, ovaire et sein) [152]. Les microtubules composés uniquement de tubuline β III présentent un plus grand dynamisme et ont un taux d'échange des dimères de tubuline avec les extrémités des microtubules plus élevé [153]. C'est pourquoi des concentrations plus élevées de paclitaxel sont nécessaires pour stabiliser les microtubules formés de tubuline β III [154]. Ces résultats ont permis de suggérer que le potentiel anti-tumoral du docetaxel pourrait être affecté par l'expression de tubuline β III.

Une étude réalisée sur 28 biopsies de CaP localement avancé a montré que l'expression de la tubuline β III augmente après traitement par docetaxel [155]. Cependant, bien que l'expression de la

tubuline β III soit corrélée avec le score de Gleason et le mauvais pronostic, aucune association entre la tubuline β III et la résistance aux taxanes n'a été démontrée [156]. Récemment, la méta-analyse de Karki *et al.* basée sur l'étude de plusieurs types cancers traités par les taxanes, a démontré qu'il n'existait pas de corrélation entre l'expression de la tubuline β III et la réponse aux taxanes [157].

Finalement, bien que plusieurs travaux suggèrent que l'expression de la tubuline β III soit impliquée dans la résistance aux taxanes *in vitro*, elle ne semble pas associée à la résistance chez les patients. Dans ce sens, l'ensemble des lignées résistantes au docetaxel établies au laboratoire ne présentent pas de surexpression de la tubuline β III, suggérant également que ce mécanisme n'est pas essentiel à l'acquisition de la résistance.

2.3. Implication des protéines associées aux microtubules

Différents effecteurs permettent de contrôler le comportement de la dynamique des microtubules, notamment les protéines stabilisatrices MAP (microtubule associated protein) telles que MAP1 et MAP2 [158], MAP/tau et MAP4. Les protéines déstabilisatrices comme MCAK (Mammalian Centrosome-associated Kinesin) [159] et la Stathmine influent également sur cette dynamique.

La protéine MAPT/tau est capable de se lier au site de liaison du paclitaxel [160], entraînant une diminution de l'efficacité de la drogue sur la stabilisation des microtubules. Il a été montré qu'une faible expression de MAP/Tau est associée à une meilleure réponse au paclitaxel chez les patientes atteintes de cancer du sein [161]. L'activité de MAP4 est contrôlée par la phosphorylation. Il a été montré dans les cellules de cancer de l'ovaire que le traitement au paclitaxel entraîne la phosphorylation de MAP4, menant à la perte de liaison à la tubuline [162]. De plus, des fibroblastes murins résistants au docetaxel ne présentent pas de phosphorylation de MAP4 en réponse au traitement [163].

La Stathmine déstabilise les microtubules pendant l'interphase et la mitose. Plusieurs protéines kinases comme la Cdk1 et la famille des kinases PAK (p21-associated kinases) sont capables de phosphoryler la Stathmine pour empêcher sa liaison aux tubulines. L'inhibition de la Stathmine dans la lignée LNCaP réduit la prolifération et la clonogénicité des cellules suite à un traitement au paclitaxel [164]. Un taux élevé de Stathmine dans les lignées de CaP a été corrélé avec une augmentation de leur capacité proliférative et l'apparition d'un phénotype plus agressif. L'expression de la Stathmine a été proposée comme marqueur de pronostic dans le CaP, et semble être une cible thérapeutique potentielle [165].

3. Echappement aux checkpoints du cycle cellulaire

En inhibant la dynamique des microtubules, les taxanes provoquent un mésalignement des chromosomes lors de la mitose, ce qui provoque l'activation du checkpoint mitotique, un arrêt du cycle cellulaire puis l'apoptose. L'Aurora kinase A (AURKA) est une serine/thréonine kinase qui joue un rôle clé dans l'initiation de la mitose via l'activation du checkpoint mitotique [166]. Dans les cellules de CaP, l'inhibition d'AURKA entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et une sensibilisation au docetaxel. Dans les cellules DU145, il a récemment été montré que l'inhibition d'AURKA induit une sensibilité au docetaxel [167]. *In vivo*, les xénogreffes issues des cellules déficientes en AURKA ont une sensibilité accrue au docetaxel [168]. AURKA pourrait donc être une cible intéressante dans le traitement du CRPC résistant au docetaxel, cependant aucun essai clinique évaluant l'inhibition d'AURKA chez les patients chimiorésistants n'est en cours. Seul l'alisertib, un inhibiteur d'AURKA, est actuellement en cours d'évaluation clinique dans le traitement des CRPC naïfs au docetaxel (NCT01799278).

Il a été montré au laboratoire que le contrôle du checkpoint mitotique par LZTS1 intervient dans le mécanisme de résistance au docetaxel des cellules de CaP. En début de mitose et jusqu'à la fin de la transition métaphase-anaphase, LZTS1 se lie à la phosphatase CDC25C pour empêcher sa dégradation. En l'absence de LZTS1, la dégradation précoce de CDC25C déclenche l'activation du MPF et une transition métaphase-anaphase prématurée. Les cellules IGR-CaP1 résistantes au docetaxel perdent l'expression de LZTS1 et l'inhibition de son expression dans les lignées sensibles augmente leur résistance à la chimiothérapie [133]. En l'absence de LZTS1, le ciblage pharmacologique de CDC25C ou des kinases mitotiques CHK1 et PLK1 permet de contourner la résistance et provoque la mort des cellules résistantes. Ces travaux sont cohérents avec les travaux portant sur un modèle de xénogreffe de cancer du colon, qui ont montré *in vivo* que le co-traitement de xénogreffes avec le docetaxel et avec un inhibiteur de CHK1, sensibilise les tumeurs au docetaxel [169].

4. Détournement de la machinerie apoptotique et activation des voies de survie

4.1. Altération de la réponse apoptotique intrinsèque induite par les taxanes

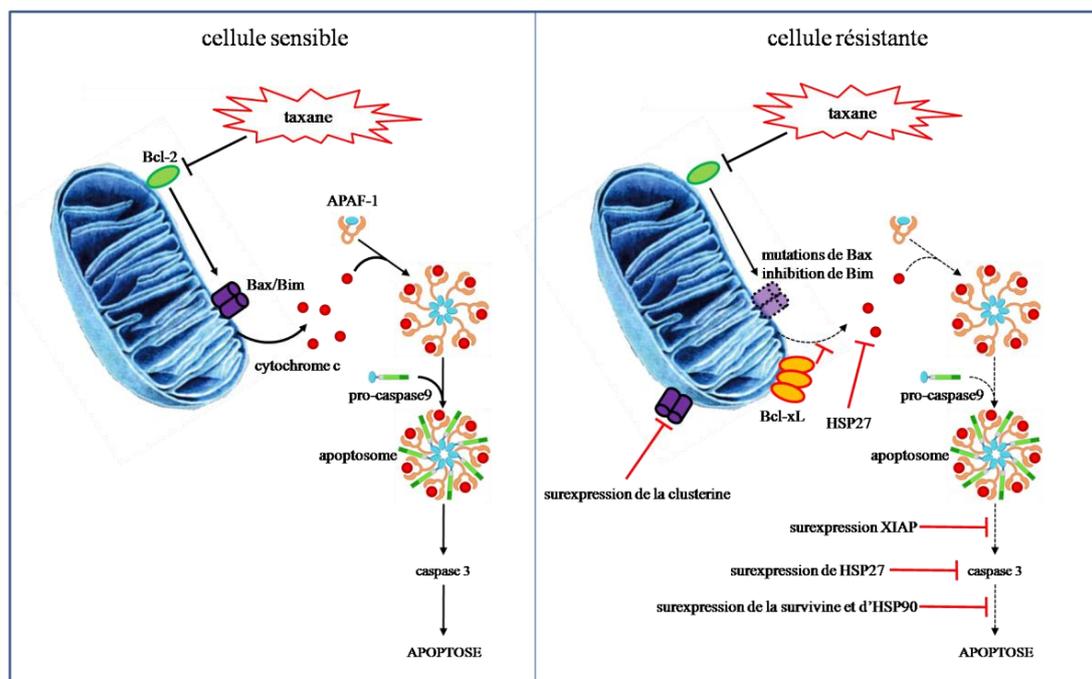


Figure 10 : Mécanismes de résistance aux taxanes liés à l'induction de l'apoptose intrinsèque.

4.1.1. Les membres de la famille Bcl-2

La famille Bcl-2 comprend des protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques qui ont été impliquées dans la résistance à la chimiothérapie par docetaxel. La surexpression *in vitro* de Bcl-xL, un membre de la famille anti-apoptotique (figure 10), entraîne une résistance aux taxanes dans les cellules PC3 alors que son inhibition augmente la sensibilité aux drogues [170]. Dans ce sens, de forts niveaux d'expression de Bcl-xL sont retrouvés en IHC dans les biopsies de patients CRPC [171]. De même, une forte expression de la protéine anti-apoptotique Mcl1 est retrouvée dans les tumeurs de CaP avancées et les métastases osseuses [172].

Inversement, l'expression de protéines pro-apoptotiques augmente la sensibilité de certaines lignées cellulaires à l'apoptose induite par les taxanes. Des mutations de la protéine pro-apoptotique Bax ont été identifiées dans 20 % des lignées de cellules leucémiques et de carcinomes coliques. Ces mutations, en entraînant une perte de fonction de la protéine, pourraient constituer un marqueur de chimiorésistance [173]. De même, l'inhibition de la protéine pro-apoptotique Bim diminue la sensibilité au paclitaxel des cellules de CaP [174]. Récemment, les travaux de Savry *et al.* ont

démonstré dans les cellules de cancer de poumon, de sein et de neuroblastome que la surexpression de Bcl-2 était responsable de la sensibilité aux agents ciblant les microtubules. Les auteurs expliquent ce résultat, paradoxal au vu de la fonction anti-apoptotique de Bcl-2, par le fait que la surexpression de Bcl-2 entraîne la surexpression de la protéine Bim et donc l'apoptose [175]. Ces résultats corrélaient avec les données obtenues chez les patients, puisqu'il a été montré qu'une importante expression de Bcl-2 chez les patients CRPC prédisait une meilleure survie globale [176].

4.1.2. Les protéines inhibitrices de l'apoptose

Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) forment une famille de 5 protéines qui régulent la survie de la cellule [177]. Elles inhibent la cascade des caspases de l'apoptose mitochondriale en se liant directement au cytochrome c et aux caspases (figure 10) [178]. Elles agissent en réponse à une large variété de signaux d'apoptose incluant le traitement par les chimiothérapies. Les IAP ont aussi un rôle dans la progression du cycle cellulaire. XIAP et la survivine sont les IAP les plus étudiées dans la carcinogénèse et la chimiorésistance. La surexpression de XIAP *in vitro* induit une résistance au paclitaxel par inhibition du clivage de la pro-caspase 3 [179]. De même, l'inhibition de la survivine dans les lignées LNCaP et C4-2 augmente leur sensibilité au docetaxel [180]. Ces données ont été confirmées *in vivo* puisque l'inhibition de l'expression de la survivine entraîne une régression tumorale et augmente la réponse au docetaxel de xéno greffes PC3 et PPC-1 [181].

4.1.3. Les protéines chaperones : la clusterine et les HSP

La clusterine est une glycoprotéine anti-apoptotique exprimée de manière ubiquitaire dans les tissus humains. La clusterine est capable d'inhiber l'apoptose en se liant à une variété de molécules pro-apoptotiques de la voie d'apoptose mitochondriale (comme Bax) qui sont normalement activées suite aux traitements par chimiothérapie [182]. Dans les cellules DU145 résistantes au docetaxel, l'inhibition de la clusterine augmente la sensibilité des cellules à la chimiothérapie. *In vivo*, les xéno greffes de cellules LNCaP qui surexpriment la clusterine répondent moins bien au paclitaxel. En clinique, l'expression de la clusterine est augmentée dans les échantillons de prostatectomie de patients ayant reçu une hormonothérapie ou une chimiothérapie néoadjuvante par docetaxel [183]. Ces résultats suggèrent que la clusterine pourrait être une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement du CRPC résistant au docetaxel.

Les protéines HSP sont des chaperones moléculaires qui stabilisent les protéines suite à un stress tel que le choc thermique, l'hypoxie ou les thérapies cytotoxiques, ce qui prévient la mort cellulaire. Les HSP sont classées suivant leur poids moléculaire. HSP27 est capable de séquestrer le cytochrome c et la caspase 3, empêchant la cascade des caspases induite par l'apoptose intrinsèque (figure 10). Dans les cellules PC3 et les xéno greffes, l'inhibition de HSP27 augmente

significativement l'apoptose induite par le paclitaxel [184]. Au niveau clinique, de forts niveaux d'expression de HSP27 ont été retrouvés dans le CaP après traitement aux hormonothérapies [185]. HSP70 et 72 ont été également impliquées dans la résistance à la chimiothérapie dans les cellules PC3 et DU145 [186], [187]. HSP90 prends en charge de nombreuses protéines, incluant des molécules de signalisation importantes en cancérologie (Akt, Raf1, Her2). Cette interaction bloque la dégradation des protéines par la voie du protéasome. Dans les tumeurs de CaP, HSP90 est surexprimée par rapport aux tissus sains et pourrait avoir un rôle dans la résistance aux thérapies anti-hormonales [188]. Ces résultats encourageants ont amorcé le développement d'inhibiteurs de HSP utilisables en clinique. Leur efficacité dans le traitement du CRPC métastatique réfractaire au docetaxel sera traitée dans le chapitre suivant.

4.2. Détournement des voies de signalisation de survie

Les voies de signalisation associées à la survie cellulaire sont de façon générale activées lors de la tumorigénèse. Plusieurs travaux ont montré que ces voies sont, de plus, impliquées dans la résistance aux taxanes.

4.2.1. Activation des récepteurs des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance se lient à des récepteurs à activité tyrosine kinase et entraînent la transduction de signaux de survie, de prolifération ou de différenciation cellulaires en activant des voies de signalisation spécifiques. De nombreux travaux ont montré dans les cellules de CaP que les thérapies ciblant les récepteurs aux facteurs de croissance augmentaient la sensibilité aux taxanes et à d'autres agents cytotoxiques. Par exemple, le trastuzumab, un anticorps anti-HER2, augmente la sensibilité au paclitaxel de xénogreffes LNCaP et CWR22 [189]. Le gefitinib, un inhibiteur de l'EGFR (epidermal growth factor receptor), augmente la cytotoxicité du paclitaxel et du docetaxel dans les xénogreffes de cellules PC3 [190]. L'inhibition de l'IGF-1R dans les cellules DU145 augmente leur sensibilité au paclitaxel et à la mitoxantrone [191]. L'utilisation de l'imatinib mésylate, un inhibiteur de tyrosine kinase capable d'inhiber l'autophosphorylation du PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), entraîne une sensibilisation au paclitaxel dans les modèles de métastase osseuses de CaP [192]. Enfin, il a été montré que l'utilisation d'un récepteur soluble synthétique du FGFR (fibroblast growth factor receptor), capable de piéger le FGF circulant, augmente la cytotoxicité du paclitaxel dans les cellules DU145 [193].

Ces approches, qui par ailleurs ont déjà fait leurs preuves en clinique dans le traitement d'autres cancers, ont montré des résultats prometteurs sur le traitement de cellules de CaP *in vivo*. Une

autre approche a été envisagée ces dernières années, qui consiste à inactiver directement les voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire en aval de ces récepteurs.

4.2.1.1. La voie de signalisation STAT

Les protéines STAT (signal transducers and activators of transcription) constituent une famille de 7 facteurs de transcription qui se dimérisent et transloquent dans le noyau pour activer la transcription de leurs gènes cibles. En réponse au stress, ils sont activés et modulent l'expression de gènes pro et anti-apoptotiques [194]. Dans les lignées de CaP, STAT1 est associé à la résistance au docetaxel. En effet, STAT1 est surexprimé dans les cellules PC3 et DU145 résistantes au docetaxel et son inhibition par interférence ARN sensibilise ces cellules à la chimiothérapie. Il a été suggéré que ce mécanisme est lié à la clusterine puisque l'inhibition de STAT1 entraîne une sous-expression de cette protéine [195]. De manière intéressante, la surexpression de STAT1 est également observée dans le modèle IGR-CaP1 résistant au docetaxel établis au laboratoire.

4.2.1.2. La voie PI3K/Akt/mTOR

La voie PI3K/Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) est probablement l'une des voies de signalisation les plus perturbées dans le cancer. La PI3K est au carrefour d'un réseau complexe de voies de signalisation qui transduit le signal de multiples effecteurs tels que les facteurs de croissance (EGF, IGF...) ou d'autres récepteurs membranaires tels que c-Met (figure 11).

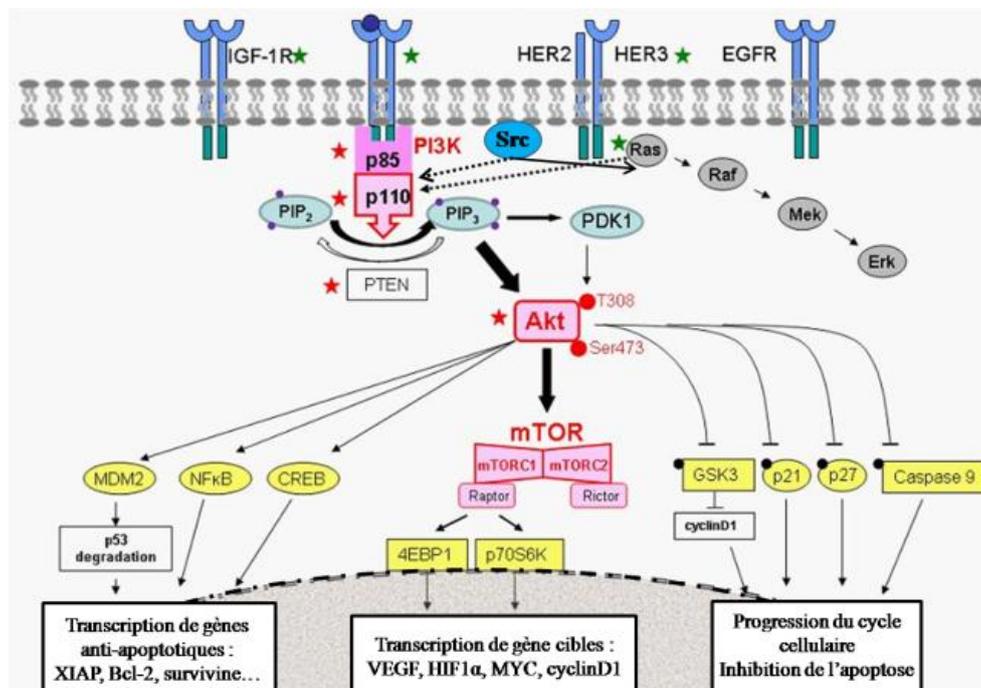


Figure 11 : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. Adapté de Leary 2013 [196]

Il existe un « crosstalk » entre la voie PI3K/Akt/mTOR et la voie des MAP kinase (Mitogen-activated protein) grâce à la capacité des protéines Ras et Src d'activer ces deux voies [197]. La PI3K est une kinase capable de phosphoryler le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). Celui-ci peut alors activer la kinase Akt qui va réguler un grand nombre de cibles et activer la prolifération et les voies de survie. De par son action régulatrice sur NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), Akt peut promouvoir la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que XIAP, Bcl-2 ou la survivine [198]. Akt est aussi capable de phosphoryler les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ce qui entraîne la progression non contrôlée du cycle et la survie. L'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR peut être due à des mutations activatrices de PI3K, à des mutations ou à l'amplification des isoformes d'Akt, et elle est activée par la perte de PTEN. En effet, dans des conditions normales, PTEN régule négativement cette voie en déphosphorylant PIP3 en PIP2.

De nombreuses études ont démontré le rôle de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la résistance à la chimiothérapie. L'activation de la PI3K peut notamment promouvoir le développement de la chimiorésistance en activant la surexpression de MRP1 [199]. Récemment, il a été montré que l'utilisation du NVP-BEZ235 (un double inhibiteur de PI3K et de mTOR) en association avec le docetaxel permettait de sensibiliser des lignées de CaP C4-2 résistantes au docetaxel *in vitro* et *in vivo* [200].

4.2.2. Rôle des kinases lipidiques dans la résistance aux taxanes

L'étude du rôle de la PI3K dans la résistance au docetaxel a montré l'importance des kinases lipidiques dans les mécanismes de chimiorésistance. La Sphingosine kinase (SphK) est une kinase lipidique qui catalyse la formation de sphingosine-1-phosphate (S1P) à partir de la sphingosine. Il existe deux SphK, SphK1 et SphK2, encodées par deux gènes distincts ayant la même fonction dans la formation de S1P. Il a été montré que la voie SphK1/S1P est inhibée par un traitement avec le docetaxel ou avec la camptothécine, le docetaxel ayant une action inhibitrice plus importante. L'inhibition pharmacologique ou par interférence ARN de SphK1 entraîne l'apoptose des cellules de CaP, et inversement la surexpression de la protéine confère une résistance aux chimiothérapies. Ces résultats suggèrent que la voie SphK1/S1P est impliquée dans l'apoptose induite par le docetaxel [201]. L'utilisation *in vivo* d'inhibiteur de SphK1 ne montre pas d'effet significatif sur la croissance tumorale des xénogreffes PC3 mais un effet synergique a été observé en association avec le docetaxel [202]. Dans les cellules de cancer de l'ovaire, l'inhibition spécifique de SphK2 augmente la sensibilité au paclitaxel [203]. Récemment, il a été montré dans des lignées de cancer du sein que le co-traitement avec du S1P exogène et du docetaxel doublait l'effet cytotoxique de la chimiothérapie [204]. Ces

données suggèrent que l'axe SphK/S1P pourrait être un axe thérapeutique intéressant en co-traitement avec une chimiothérapie.

La kinase PIM-1 est une sérine/thréonine kinase impliquée dans le développement de cancers hématopoïétiques et dans le CaP. Dans les modèles cellulaires LNCaP, 22RV1 et PC3, deux isoformes de la protéine sont exprimées. Il a été montré que seule la forme de 44kDa est impliquée dans la résistance à la chimiothérapie par doxorubicine et mitoxantrone [205]. La surexpression de la kinase PIM-1 augmente la résistance des lignées DU145 et RWPE-2 traitées au docetaxel, et à l'inverse, son inhibition sensibilise ces cellules à la chimiothérapie [206]. Au niveau moléculaire, il a été montré que la kinase PIM-1 module l'activation de la pompe d'efflux de drogues BCRP, ce qui induit une résistance au docetaxel dans les modèles cellulaires de CaP étudiés[137]. Seul ce mécanisme a été décrit pour expliquer le rôle de la kinase PIM-1 dans la résistance au docetaxel, cependant son rôle régulateur de CDC25C et de Bad permet d'envisager un rôle de la kinase dans la résistance due à un défaut du checkpoint mitotique ou dans l'inhibition de l'apoptose induite par la chimiothérapie.

L'étude des mécanismes de résistance au docetaxel dans les modèles cellulaires de cancer de la prostate, puis la validation de ces nouvelles cibles dans des modèles précliniques de xénogreffes, ont permis le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses. L'évaluation au niveau clinique de ces nouvelles drogues est décrite dans le chapitre suivant.

Chapitre III

Thérapies proposées en clinique pour le traitement des CRPC chimiorésistants

Jusqu'en 2010, le docetaxel était le seul traitement thérapeutique capable d'augmenter la survie globale des patients atteints de CRPC métastatique. L'étude des mécanismes de résistance au docetaxel ont permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dont certaines ont montré leur efficacité ces dernières années. Les stratégies thérapeutiques actuellement utilisées, et en cours d'évaluation, pour le traitement des patients CRPC réfractaires au docetaxel sont décrites ci-dessous.

1. Les nouvelles hormonothérapies

L'acétate d'abiratéron est la première hormonothérapie de nouvelle génération approuvée pour le traitement du CRPC. L'efficacité thérapeutique de ce composé a été évaluée chez les patients atteints de CRPC résistants au docetaxel. L'abiratéron en association avec la prednisone améliore de façon significative la survie globale des patients atteints de CRPC réfractaires au docetaxel (augmentation de la médiane de survie de 4 à 6 mois) [207], conduisant à son approbation par la FDA en avril 2011. L'abiratéron ayant montré son efficacité chez les patients chimionatifs, cette hormonothérapie est devenue l'une des molécules essentielles dans le traitement des CRPC.

L'enzalutamide (MDV3100) est un antagoniste du AR ayant une affinité beaucoup plus forte que les anti-androgènes utilisés jusqu'à présent comme le bicalutamide. C'est un inhibiteur qui se lie à la région C-terminale du AR et qui, contrairement au bicalutamide, empêche la translocation du AR dans le noyau et par conséquent l'activation de ses gènes cibles [208]. L'essai clinique de phase III AFFIRM a démontré le potentiel de l'enzalutamide dans le traitement des CRPC progressant sous docetaxel, montrant un bénéfice de survie globale de 5 mois par rapport au placebo [209]. Ces résultats ont conduit à l'approbation de l'enzalutamide par la FDA en Août 2012 pour le traitement des patients CRPC ayant rechuté après docetaxel. L'enzalutamide est actuellement en cours d'évaluation pour le traitement des CRPC chimionatifs (NCT01212991).

L'orterone (TAK-700) est un inhibiteur de CYP17 développé pour ne pas inhiber l'activité 17 α -hydroxylase de l'enzyme, ce qui réduit théoriquement le niveau de testostérone sans diminuer le cortisol [210]. Un essai clinique de phase III évaluant le potentiel de la drogue chez les patients CRPC résistants au docetaxel est en cours (NCT01193257). Cependant, suite aux mauvais résultats observés lors des analyses intermédiaires, les différents essais utilisant la drogue ont été interrompus. D'autres hormonothérapies ont été développées (ARN-509, galatéron), mais aucun essai clinique n'est en cours pour évaluer leur potentiel sur des patients CRPC résistants au docetaxel.

2. Inhibition de l'efflux des drogues par la P-gp

2.1. Echec des thérapies ciblant la P-gp

Le ciblage thérapeutique des pompes d'efflux de drogue a été initialement évalué en associant les chimiothérapies avec des modulateurs de ces pompes tels que le verapamil, la cyclosporine A et le valsopodar. Malheureusement ces drogues ont montré une forte toxicité chez les patients ainsi que des effets imprévisibles sur la pharmacocinétique des chimiothérapies. Depuis, des modulateurs de troisième génération causant un minimum d'interférence pharmacocinétiques ont été développés. Cependant, ces inhibiteurs de la P-gp comme le laniquidar, le biricodar et l'elacridar n'ont montré qu'une efficacité modeste en phase II [211]–[213].

2.2. Développement d'agents insensibles aux pompes d'efflux

Le cabazitaxel est un taxane qui a été sélectionné pour sa faible affinité pour la P-gp. Il a notamment été montré dans des cellules exprimant la P-gp, que le cabazitaxel était plus efficace que le docetaxel. En 2010, l'essai TROPIC a évalué l'efficacité du cabazitaxel et a montré un bénéfice de survie chez les patients CRPC progressant sous docetaxel (15,1 mois contre 12,7) [214], conduisant à son approbation rapide par la FDA en juin 2010 en tant que seconde ligne de thérapie.

De nouveaux agents ciblant les microtubules ont été développés ces dernières années. Les épothilones sont des macrolides cytotoxiques qui empêchent la dépolymérisation des microtubules, causant un arrêt mitotique puis l'apoptose d'une façon similaire à celle des taxanes. De plus, les épothilones partagent le même site de liaison sur la tubuline β avec les taxanes. Les épothilones inhibent la croissance tumorale des xénogreffes de CaP de manière plus efficace que le paclitaxel [215]. Ils conservent leur activité dans certains modèles résistants aux taxanes, notamment dans des lignées et tumeurs surexprimant la P-gp ou possédant des mutations de la tubuline [216]. Cependant, chez les patients CRPC résistants au docetaxel, l'évaluation clinique de phase II de l'ixabepilone et

dupatupilone n'a montré qu'une efficacité modeste quand ces agents sont utilisés en monothérapie[217]–[219]. Une étude de phase II évaluant la combinaison de l'ixabepilone avec la mitoxantrone, induit une réponse satisfaisante chez les patients CRPC résistants au docetaxel [220]. Alors que cette association a montré des signes d'activité chez les patients CRPC réfractaires au docetaxel, aucun essai clinique de phase III n'est actuellement en cours.

3. Ciblage du microenvironnement

3.1. Inhibition de la néo-angiogénèse tumorale

Nous avons vu précédemment que la néo-angiogénèse peut contribuer à la résistance aux chimiothérapies. Paradoxalement, les thérapies ciblant l'angiogénèse pourraient présenter des effets indésirables en diminuant la distribution des drogues au site tumoral. Cependant, il a été montré dans des xénogreffes de diverses lignées cancéreuses que l'inhibition de l'angiogénèse entraîne la destruction des vaisseaux tumoraux immatures et le remodelage de la vascularisation restante [221], [222]. Ce phénomène de normalisation vasculaire donne un rationnel pour l'utilisation des inhibiteurs de l'angiogénèse en clinique.

3.1.1. Ciblage du VEGF

Les anti-angiogéniques n'ont pas ou peu d'activité lorsqu'ils sont utilisés en monothérapie, cependant certains présentent un bénéfice de survie intéressant lorsqu'ils sont utilisés en association avec la chimiothérapie. L'association du docetaxel et du bevacizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, a montré une réponse significative en phase II chez les patients atteints de CRPC résistants au docetaxel [223]. Cependant, les essais cliniques de phase III évaluant l'efficacité du bevacizumab et de l'aflibercept, un récepteur soluble qui mime le domaine de liaison du VEGFR, ont démontré l'échec thérapeutique de l'inhibition du VEGF dans le traitement des CRPC chimionaires [224], [225]. Aucun essai clinique évaluant l'utilisation des inhibiteurs de VEGF sur des patients CRPC métastatiques résistants au docetaxel n'a été réalisé à ce jour.

3.1.2. Ciblage du VEGFR

Une autre stratégie thérapeutique vise à inhiber le VEGFR. Le sunitinib est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du VEGFR et du PDGFR. Cependant, une étude de phase III récente n'a montré aucun bénéfice de survie chez les patients CRPC traités au sunitinib après échec du docetaxel [226]. Le cabozantinib (XL184) inhibe l'activité tyrosine kinase de VEGFR2 et de c-Met. Son utilisation en phase II a montré une activité anti-tumorale très prometteuse sur des patients CRPC

[227]. Un essai clinique de phase III est actuellement en cours pour déterminer le potentiel du cabozantinib chez les patients CRPC ayant progressé après docetaxel et abiratérone/enzalutamide (essai COMET-1 NCT01605227).

L'échec général des thérapies anti-angiogéniques est retrouvé dans le traitement de multiples cancers. Seul le cabozantinib a montré des résultats promoteurs, probablement dû à son activité d'inhibition de c-Met plutôt qu'à son action sur le VEGFR. Finalement, il est possible que l'inhibition de l'angiogénèse favorise l'apparition de zones d'hypoxie, entraînant la sélection de cellules tumorales plus agressives capables de progresser sous traitement.

3.2. Inactivation des cytokines inflammatoires

Le siltuximab (CNTO328) est un anticorps anti-IL-6 ayant été montré son efficacité sur l'inhibition de la croissance de xénogreffes de cellules LuCaP35 [124]. En phase II, le siltuximab n'a pas montré d'efficacité s'il est utilisé en monothérapie chez des patients CRPC ayant progressé sous docetaxel [228]. Un second essai de phase II évaluant l'effet du CNTO328 en association avec la mitoxantrone a été interrompu dû à la forte mortalité des patients traités par rapport aux patients contrôles (PFS médiane de 97 jours avec siltuximab, 228 pour le bras contrôle) [229]. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, CCL2 est une cytokine impliquée dans les métastases osseuses de CaP et dans la cytoprotection des cellules suite au traitement par docetaxel. Le carlumab (CNTO888) est un anticorps monoclonal dirigé contre CCL2, bien toléré chez les patients atteints de CaP ou d'autres tumeurs solides [230]. Cependant, l'évaluation en phase II de l'anticorps en monothérapie n'entraîne pas de réponse PSA chez les patients CRPC réfractaires au docetaxel, ni de diminution de la concentration sérique de CCL2, et ne montre aucune activité anti-tumorale [231]. L'ensemble de ces données démontrent l'inefficacité des stratégies d'inhibition des cytokines inflammatoires dans le traitement des CRPC résistants au docetaxel.

La résistance à la chimiothérapie due au microenvironnement englobe des contraintes physiques globales et des contraintes liées à la communication intercellulaire. Le ciblage de ces mécanismes n'a montré que peu ou pas d'efficacité dans le traitement des patients CRPC réfractaires au docetaxel.

4. Inhibition des protéines chaperones

La clusterine sécrétée (sCLU) est une protéine cytoprotectrice activée par le stress. Elle est associée à la résistance au traitement par inhibition de l'apoptose mitochondriale et suppression du signal de stress activé par p53. Le gène CLU est positivement régulé après suppression androgénique ou après chimiothérapie. Un oligonucléotide antisens dirigé contre la protéine sCLU, le custirsén (OGX-011), a montré une bonne tolérance en tant que simple agent en phase I. Il entraîne une sous-expression de sCLU de plus de 90% et une augmentation de l'apoptose [232]. Une étude clinique de phase II a montré un bénéfice de survie de l'association docetaxel et custirsén chez les patients ayant rechuté après docetaxel [233]. Le custirsén est actuellement évalué dans en phase III en combinaison avec le cabazitaxel dans les CRPC après rechute sous docetaxel (NCT01578655).

Des essais cliniques évaluant l'inhibition des protéines chaperones HSP90 (AT13387) et HSP27 (OGX-427) sont actuellement en cours dans le traitement des CRPC chimionatifs progressant sous abiratéron (respectivement NCT01685268 et NCT01681433). Malgré des résultats précliniques intéressants, aucun essai clinique ciblant HSP70 et HSP72 n'est en cours.

Le ciblage des protéines chaperones donne des résultats décevants dans le traitement du CRPC et peu d'essais sont en cours pour évaluer leur potentiel chez les patients progressant sous docetaxel, montrant l'échec de cette stratégie thérapeutique.

5. Régulation du programme apoptotique

5.1. Ciblage des protéines de la famille Bcl-2

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, plusieurs études *in vitro* ont démontré l'implication des membres de la famille Bcl-2 dans la résistance aux taxanes. Aucune étude ciblant la famille Bcl-2 n'est actuellement en cours chez les patients CRPC réfractaires au docetaxel. Néanmoins, des essais cliniques ont évalué le potentiel thérapeutique du ciblage de cette famille de protéines en association avec le docetaxel sur des patients CRPC chimionatifs. Dans un essai de phase II, l'inhibiteur de Bcl-2 oblimersen en association avec le docetaxel s'est révélé moins efficace que le bras docetaxel seul [234]. De même, l'utilisation en phase II d'un inhibiteur ciblant plusieurs membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Mcl1) nommé AT101, n'a pas montré de bénéfice de survie en association avec le docetaxel [235]. L'absence d'activité anti-tumorale et la toxicité des inhibiteurs des membres de la famille Bcl-2 observées en phase II n'ont pas conduit à leur évaluation

en phase III. Dans la mesure où il a été montré que l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim était positivement régulée par Bcl-2 [175], il est possible que les stratégies d'inhibition de Bcl-2 empêchent l'apoptose des cellules cancéreuses en inhibant l'expression de Bim.

5.2. Ciblage des IAP

De par leur rôle essentiel dans la régulation de l'apoptose, les protéines anti-apoptotiques IAP constituent une famille de cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes. Dans un essai de phase I, l'inhibiteur de la survivine YM155 a montré une activité anti-tumorale dans le CRPC résistant au docetaxel [236]. Cependant en phase II, l'YM155 utilisé en monothérapie n'a montré qu'un effet modeste sur la survie de patients CRPC réfractaires au docetaxel [237]. D'autres inhibiteurs d'IAP ont été évalués dans le traitement du CRPC chimionatifs, mais là encore, aucune efficacité anti-tumorale n'a été démontrée (molécules AEG35156 et LY2181308 [238]).

5.3. Inhibition de PARP

La PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase) est une enzyme impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN. Elle induit l'apoptose des cellules ayant accumulé trop de dommages à l'ADN [239]. Cibler PARP permet potentiellement de supprimer la prolifération des cellules tumorales. Un rôle potentiel des inhibiteurs de PARP en combinaison avec la radiothérapie a été proposé suite aux résultats obtenus *in vitro* sur les cellules PC3 [240]. L'Olaparib est un inhibiteur de PARP utilisé en clinique dans les cancers de l'ovaire et du sein. Son efficacité dans le CRPC résistant au docetaxel est en cours d'évaluation clinique de phase II en combinaison avec l'abiratéron (NCT01972217).

Globalement, ces résultats prouvent l'inefficacité des stratégies ciblant les protéines régulatrices de l'apoptose dans le traitement des patients CRPC réfractaires au docetaxel et chimionatifs.

6. Régulation des récepteurs aux facteurs de croissance

Les facteurs de croissance et les récepteurs associés sont surexprimés dans la plupart des cancers. L'utilité du ciblage des récepteurs des facteurs de croissance ayant été démontrée dans de nombreux types tumoraux, plusieurs essais cliniques ont été réalisés pour évaluer leur potentiel dans le traitement du CRPC progressant sous docetaxel. Cependant, la plupart des essais cliniques n'ont pas montré d'effet bénéfique sur la survie des patients et n'ont pas été poursuivis en phase III. L'utilisation du pertuzumab, un anticorps anti HER2, n'a pas montré de réponse objective chez les patients CRPC progressant sous docetaxel [241]. Le sunitinib, un inhibiteur non spécifique de PDGFR, induit une réponse PSA prometteuse chez les patients CRPC progressant sous docetaxel, associée à une augmentation de la survie sans progression mais sans amélioration de la survie globale [242]. A l'inverse, un traitement avec un autre inhibiteur non spécifique de PDGFR, le tandutinib, a été corrélé à une accélération de la progression tumorale chez les patients résistants au docetaxel [243]. Enfin, le potentiel du dovotinib, un inhibiteur des récepteurs du FGF, est actuellement étudié dans le traitement des CRPC réfractaires au docetaxel (NCT01741116).

Bien que fonctionnant pour d'autres cancers (notamment le cancer du sein), l'inhibition des récepteurs aux facteurs de croissance ne semble pas être une stratégie prometteuse dans le CaP. Par le passé, l'utilisation d'inhibiteurs de l'EGFR et d'HER2 a d'ailleurs été un véritable échec dans le traitement des patients CRPC [217], [244]–[246].

7. Ciblage de la voie PI3K/Akt/mTOR

La voie PI3K/Akt/mTOR est impliquée dans la régulation des mécanismes de survie cellulaire, elle est généralement activée dans les cancers avancés. En essai de phase II, l'inhibiteur de mTOR ridaforolimus n'a pas montré de réponse significative dans le traitement des patients CRPC progressant sous docetaxel [247]. De même, deux autres inhibiteurs de mTOR (temsirolimus et everolimus) évalués en phase II chez les patients CRPC chimionœifs n'ont montré qu'une activité modeste [248], [249]. Aucune phase III évaluant l'efficacité des inhibiteurs de mTOR dans le traitement des CRPC résistant au docetaxel ou chimionœifs n'est actuellement en cours. Ces résultats récents ne permettent cependant pas de conclure sur le potentiel du ciblage de la voie, Akt ayant d'autres substrats que mTOR.

8. Synthèse des stratégies thérapeutiques du CRPC chimio-résistant

Beaucoup de nouvelles pistes ont été évaluées en clinique pour traiter le CRPC résistant au docetaxel (tableau 3), cependant la plupart n'ont pas montré de bénéfice de survie. En dépit des avancées apportées par l'utilisation du cabazitaxel, de l'acétate d'abiratérone et de l'enzalutamide, le CRPC reste à ce jour une maladie incurable. Il existe donc un besoin urgent de découvrir et comprendre les différents mécanismes de résistance au docetaxel pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et des biomarqueurs de réponses aux différentes thérapies.

cible	agent	phase	patients	design	résultat	référence/essai
clusterine	custirsén	II	CRPC DR	OGX-011-prednisone-docetaxel/mitoxantrone	toléré, augmentation OS	233
		III	CRPC DR	cabazitaxel-prednisone +/- OGX-011	en cours	NCT01578655
Survivine	YM155	II	CRPC DR	YM155 seul	toléré, réponse modeste	236
IL-6	siltuximab	II	CRPC DR	CNT0328 seul	négatif	228
		II	CRPC DR	mitoxantrone-prednisone +/- CNT0328	negatif	229
CCL2	carlumab	II	CRPC DR	CNT0888 seul	négatif	230
VEGF	bevacizumab	II	CRPC DR	docetaxel-bevacizumab	toléré, bonne réponse PSA	223
VEGFR	sunitinib	III	CRPC DR	prednisone +/- sunitib	négatif	242
VEGFR2	cabozantinib	II	CRPC	cabozantinib VS placebo	toléré, activité antitumorale	227
		III	CRPC DR Abi/enzaR	cabozantinib VS prednisone	en cours	NCT01605227
microtubule	cabazitaxel	III	CRPC DR	prednisone-cabazitaxel/mitoxantrone	augmentation OS	214
	cabazitaxel	III	CRPC	prednisone-cabazitaxel/docetaxel	en cours	NCT01308567
	cabazitaxel	III	CRPC DR	prednisone-cabazitaxel +/- OGX-011	en cours	NCT01578655
	cabazitaxel	III	CaP localisé	anti-androgènes-radiothérapie +/- cabazitaxel	en cours	NCT01952223
	ixabepilone	II	CRPC DR	ixabepilone seul	toléré, réponse modeste	217
	ixabepilone	II	CRPC	ixabepilone seul	toléré, réponse modeste	219
	ixabepilone	II	CRPC DR	mitoxantrone-prednisone +/- ixabepilone	toléré, réponse PSA	220
	patupilone	II	CRPC DR	patupilone seul	toléré	218
HER2	pertuzumab	II	CRPC DR	pertuzumab seul	négatif	241
PDGFR	sunitib	II	CRPC DR	sunitib seul	toléré, réponse PSA observée	242
	tandutinib	II	CRPC DR	tandutinib seul	négatif	243
FGFR	dovotinib	II	CRPC DR	dovotinib seul	en cours	NCT01741116
voie du AR	abiratérone acétate	III	CRPC DR	prednisone+ abiratérone/placebo	augmentation OS	207
	orteronel	III	CRPC DR	prednisone +/- orteronel	interrompu	NCT01193257
	enzalutamide	III	CRPC DR	enzalutamide VS placebo	augmentation OS	209
	enzalutamide	III	CRPC	enzalutamide VS placebo	en cours	NCT01212991
PARP	olaparib	II	CRPC DR	olaparib +/- abiratérone	en cours	NCT01972217
mTOR	ridaforolimus	II	CRPC DR	ridaforolimus seul	toléré, pas de réponse	247

Tableau 3 : Essais cliniques dans le traitement du CRPC résistant au docetaxel.
DR : résistant au docetaxel, OS : survie globale

Chapitre IV

L'EMT, une nouvelle facette des mécanismes de résistance au docetaxel

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus biologique qui permet à une cellule épithéliale polarisée d'acquérir un phénotype mésenchymal à travers de multiples événements biochimiques. Ce phénotype est caractérisé par l'augmentation des capacités migratoires, invasives et de résistance à l'apoptose. C'est un phénomène réversible, impliqué dans des processus physiologiques comme la migration cellulaire au cours du développement et la cicatrisation, mais aussi dans des processus pathologiques comme l'invasion et la migration de cellules cancéreuses ou la fibrose. Des études publiées depuis les trois dernières années ont mis en avant son implication dans l'acquisition de la résistance à la chimiothérapie ainsi que son potentiel en tant que cible thérapeutique.

1. Mécanismes moléculaires de l'EMT

1.1. Événements précoces indépendants de la transcription de nouveaux gènes

L'EMT est induite par des voies de signalisation conduisant à l'activation de la transcription de facteurs de transcription spécifiquement impliqués dans le processus (EMT-TF). Cependant, les événements moléculaires précoces du programme d'EMT sont indépendants de l'activité de ces facteurs de transcription.

1.1.1. Perte des jonctions cellulaires épithéliales

Les jonctions cellulaires sont constituées de complexes de protéines de surface spécialisées qui garantissent l'intégrité cellulaire. Chez les vertébrés, les cellules sont en contact les unes avec les autres grâce aux jonctions serrées situées au niveau apical, aux jonctions adhérentes et aux desmosomes situés au niveau latéral (figure 12). Lors de l'initialisation de l'EMT, ces protéines sont relocalisées et dégradées dans une séquence d'événements précis et bien décrits. La dissolution des

jonctions serrées est accompagnée d'une diminution de l'expression de l'occludine et de la claudine, ainsi que la relocalisation de la protéine zonula occludens 1 (ZO-1) [250]. L'occludine est liée au récepteur de type I du transforming growth factor (TGFβRI). Le TGFβRI forme un complexe avec PAR6 et l'occludine au niveau des jonctions serrées. Après activation par le TGFβ, TGFβRII est recruté au niveau du complexe et phosphoryle PAR6 qui se lie à l'E3-ubiquitine ligase SMURF1. SMURF1 ubiquitine la Rho GTPase RhoA, provoquant sa dégradation, ce qui perturbe le cytosquelette d'actine cortical et contribue au désassemblage des jonctions serrées [251].

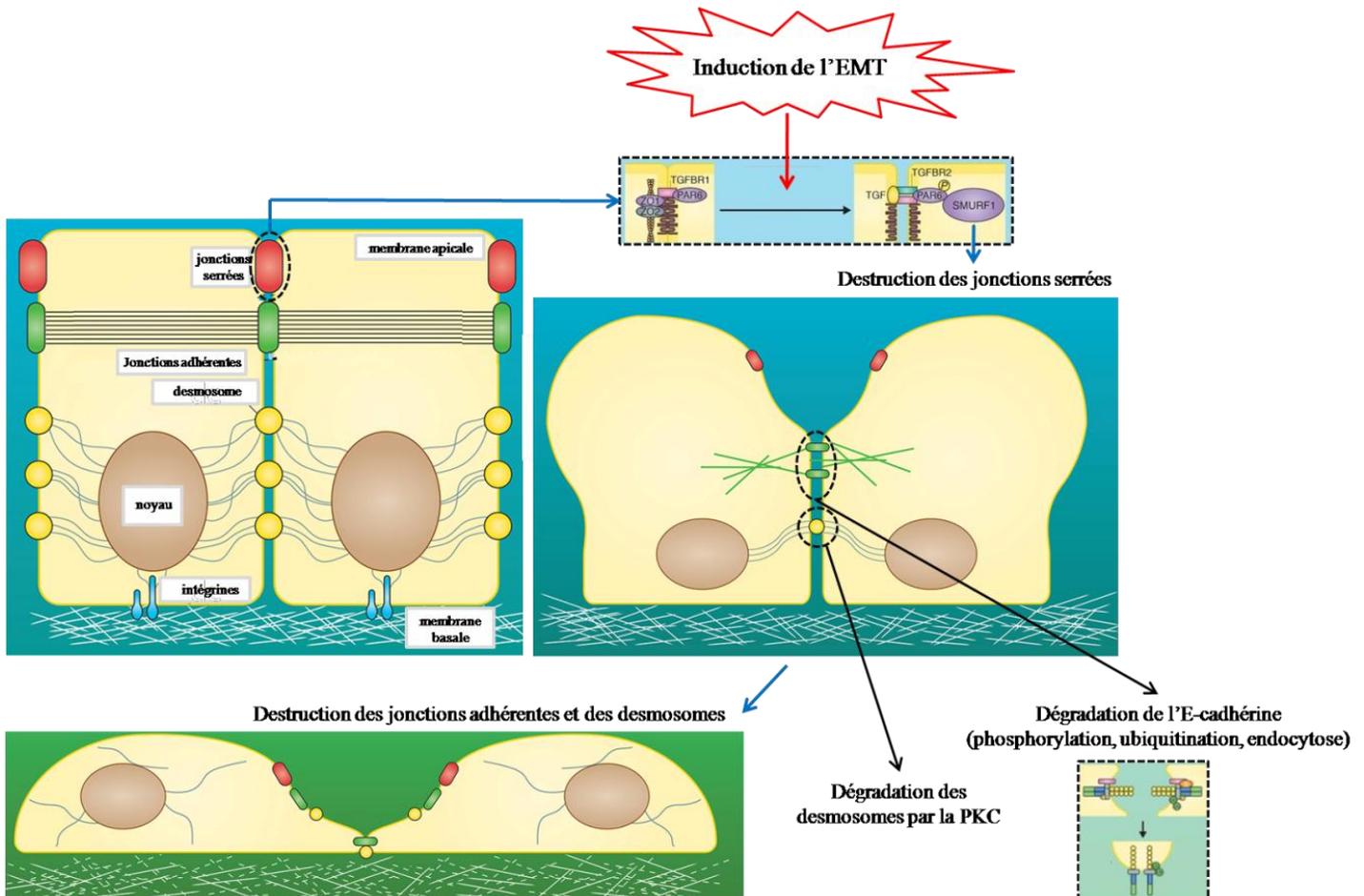


Figure 12 : Destruction des jonctions cellulaires après induction de l'EMT. Adapté de Huang 2012.

La deuxième étape est la destruction des jonctions adhérentes. Elles sont majoritairement composées d'E-cadhérine, une protéine transmembranaire assurant la liaison par interaction homotypique avec d'autres cellules exprimant la protéine. Aux jonctions, l'E-cadhérine est associée à la β-caténine qui assure la liaison au cytosquelette d'actine [252]. L'E-cadhérine peut être déstabilisée par phosphorylation sur les résidus tyrosines Tyr-86 and Tyr-654, mais également être internalisée puis dégradée selon la voie d'induction activée [253], [254]. De manière générale, après la destruction de l'E-cadhérine, la β-caténine libre est rapidement dégradée. Lorsque la GSK3β est inhibée (via l'activation de la voie WNT par exemple), la β caténine libre peut alors induire la transcription de ces gènes cibles [255]. Enfin, l'induction de l'EMT déclenche la destruction des desmosomes [256]. Ces

structures cellulaires sont composées de desmoplakine, de plakoglobine et de desmogléine, et assurent l'adhésion aux cellules adjacentes et à la membrane basale. La phosphorylation de la desmoplakine par la PKC induit la destruction du complexe protéique [257]. La perte d'expression des protéines de jonctions cellulaires dans les phases précoces de l'EMT est ensuite maintenue par régulation transcriptionnelle [258].

1.1.2 Réorganisation du cytosquelette d'actine

Les cellules qui réalisent l'EMT réorganisent leur cytosquelette cortical d'actine, permettant la formation de projections membranaires (les lamellipodes et les filopodes) qui augmentent la motilité cellulaire [259]. Les Rho GTPases jouent un rôle primordial dans la dynamique et la réorganisation du cytosquelette d'actine durant l'EMT. Cette réorganisation du cytosquelette d'actine est essentielle à l'EMT puisque l'inhibition des Rho GTPases RhoA et ROCK entraîne le blocage du processus [260].

Les différentes Rho GTPases ont des rôles variés dans la réorganisation du cytosquelette : RhoA induit la formation de fibres de stress, RAC1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) et CDC42 contrôlent principalement la formation des lamellipodes et des filopodes, ROCK active la polymérisation de l'actine au niveau cortical et prévient sa dépolymérisation via l'activation de la kinase LIM (LIMK). La caténine p120 joue un rôle essentiel dans la stabilité des adhésions cellule/cellule en inhibant l'activité de RhoA et en activant RAC1 et CDC42 [261]. Tout comme la β -caténine, la caténine p120 est associée à l'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes. La destruction de l'E-cadhérine consécutive à l'induction de l'EMT entraîne la dissociation de la caténine p120 qui s'accumule dans le cytoplasme où elle exerce son action sur les Rho GTPases.

1.2. Reprogrammation cellulaire

Lors de l'EMT, le programme d'expression des gènes est modifié afin d'altérer les adhésions cellulaires et de remanier l'architecture du cytosquelette. Cette reprogrammation est régulée par l'action des EMT-TFs, dont les membres les plus étudiés sont ZEB1 et SNAIL. Les gènes cibles de ces EMT-TFs sont listés dans le tableau 4.

facteur de transcription	gènes cibles sous-exprimés	gènes cibles surexprimés
SNAIL et SLUG	E-cadhérine, occludine, claudine, Crumbs3, PALS1, PATJ, CK, desmoplakine	fibronectine, N-cadhérine, collagen, MMP (15,2,9), TWIST, ZEB1,ZEB2
ZEB1 et ZEB2	E-cadhérine, ZO-1, Crumbs3	fibronectine, MMPs
TWIST1	E-cadhérine, occludine, claudine, desmoplakine, plakoglobine	fibronectine, N-cadhérine, intégrine $\alpha 5$
SMAD	E-cadhérine, MYC, cyclineD1	SNAIL, vimentine, MMP7, CD44

Tableau 4 : Facteurs de transcription impliqués dans l'EMT. Références utilisées [262]–[265]

1.2.1. Maintien transcriptionnel de l'inhibition des jonctions cellulaires épithéliales

L'une des étapes essentielles de l'EMT est la régulation négative de l'expression de l'E-cadhérine pour renforcer la déstabilisation des jonctions adhérentes. Les gènes codant pour les protéines de jonctions serrées et les desmosomes sont eux aussi réprimés aux cours du processus, ce qui empêche la formation de nouvelles jonctions (tableau 4) [266]. La sous-expression de l'E-cadhérine est contre-balançée par la surexpression de la N-cadhérine. Ce phénomène, appelé « cadherin switch », modifie les propriétés d'adhésion des cellules mésenchymateuses [267]. La N-cadhérine est une protéine transmembranaire partageant les fonctions de l'E-cadhérine. Elle est impliquée dans les adhésions entre cellules mésenchymateuses ainsi que dans la migration. En effet, les interactions homotypiques entre les protéines N-cadhérine sont plus faibles que celles impliquant l'E-cadhérine, facilitant la migration cellulaire et l'invasion [268]. La stabilisation de la localisation de la N-cadhérine aux sites de contact est dépendante de RhoA [269].

3.2.2. Changement d'architecture du cytosquelette

L'altération de l'expression des gènes codant pour les éléments du cytosquelette et pour les protéines responsables de la polarité cellulaire est une des caractéristiques de l'EMT. Le remodelage du cytosquelette d'actine est accompagné d'un changement de composition des filaments intermédiaires dû à la répression de l'expression des cytokératines et l'activation de l'expression de la Vimentine [250]. Les filaments intermédiaires permettent le trafic d'organelles et de protéines aux membranes, leur composition définissant la spécificité des protéines transportées. En effet, l'adressage de l'E-cadhérine à la membrane est exclusivement réalisé via des filaments de kératines [270], alors que la Vimentine est impliquée dans le trafic des intégrines [271]. Enfin, il a été montré que la surexpression de la Vimentine augmente la motilité et diminue l'adhésion des cellules épithéliales [272]. Ce phénomène est probablement dû au fait qu'elle est impliquée dans la régulation des adhésions focales, qui assurent la liaison des cellules à l'ECM [273].

Les Rho GTPases sont essentielles au maintien de la polarité au cours de l'EMT. Dans les épithéliums, les complexes PAR (partitioning-defective) et Crumbs sont localisés au niveau apical et associés aux jonctions serrées. Ensemble, ils définissent le compartiment apical alors que le complexe Scribble définit le compartiment basal. L'expression des EMT-TF provoque l'inhibition transcriptionnelle des protéines des jonctions cellulaires, mais également des protéines du complexe Crumbs PALS1, PATJ et Crumbs3 (tableau 4), ce qui provoque une perte de la polarité apicale-basale. Cependant, les cellules mésenchymateuses sont capables de recréer une polarité antéro-postérieure essentielle pour la migration directionnelle. RAC1 induit l'accumulation des intégrines et du complexe PAR au niveau antérieur alors que RhoA inhibe la formation de nouveaux complexes PAR au niveau postérieur [274].

3.2.3. Augmentation de la motilité et de l'invasion cellulaire

La dernière étape du processus d'EMT est l'acquisition de propriétés migratoires et d'invasion. Au cours de l'EMT, la destruction des jonctions entraîne une perte d'interaction avec l'ECM. Les cellules mésenchymateuses répriment alors l'expression des intégrines épithéliales et activent l'expression d'autres intégrines importante pour la progression de l'EMT. Il a notamment été montré dans des cellules de cancer de poumon que l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ augmentait l'adhésion à la fibronectine [275], un composant de l'ECM exprimé par les cellules mésenchymateuses. L'expression des intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ est augmentée par diverses voies comme la voie des SMAD et l'activation de la voie MAPK [276], [277]. L'interaction des intégrines $\alpha \beta 1$ avec le collagène de type I augmente la destruction des complexes membranaires d'E-cadhérine [278] ainsi que l'expression de la N-cadhérine [279]. La reprogrammation de l'expression des intégrines au cours de l'EMT participe donc au maintien de l'inhibition des jonctions épithéliales et augmente les capacités migratoires des cellules mésenchymateuses.

L'activation des EMT-TFs induit également la formation des invadopodes et l'expression des métalloprotéinases de la matrice (MMP) (tableau 4) [280]. Les invadopodes sont des projections cellulaires riches en actine, dont la formation est induite par TWIST1 [281]. La majorité des MMP sont localisées dans les invadopodes, où elles peuvent entrer en contact avec l'ECM et la remodeler. Ce processus est essentiel à l'invasion des cellules cancéreuses [282]. L'activation de la voie WNT/ β -caténine est liée à la surexpression de la MT1-MMP dans les cellules de fibrosarcome humain, entraînant une augmentation de la migration [283]. La surexpression de MT1-MMP pourrait être due à l'activation du facteur de transcription mésenchymateux ZEB1 [284]. Récemment, il a été montré que la surexpression de MT1-MMP *in vitro* est suffisante pour déclencher l'EMT dans une lignée de cancer de la langue [285].

La reprogrammation de l'expression des gènes au cours de l'EMT entraîne donc l'expression de nouvelles jonctions intercellulaires plus labiles, change l'architecture du cytosquelette pour augmenter la mobilité cellulaire et induit l'expression de protéines dégradant l'ECM. Ces mécanismes moléculaires sont à la base de la progression métastatique.

2. Les différents types d'EMT

L'EMT est impliquée dans des processus biologiques distincts dont les conséquences fonctionnelles sont très différentes. Les gènes impliqués dans ces processus sont majoritairement identiques mais les mécanismes qui définissent le choix d'un type d'EMT plutôt qu'une autre restent peu connus. Les différences fonctionnelles permettent cependant de définir trois types d'EMT (figure 13).

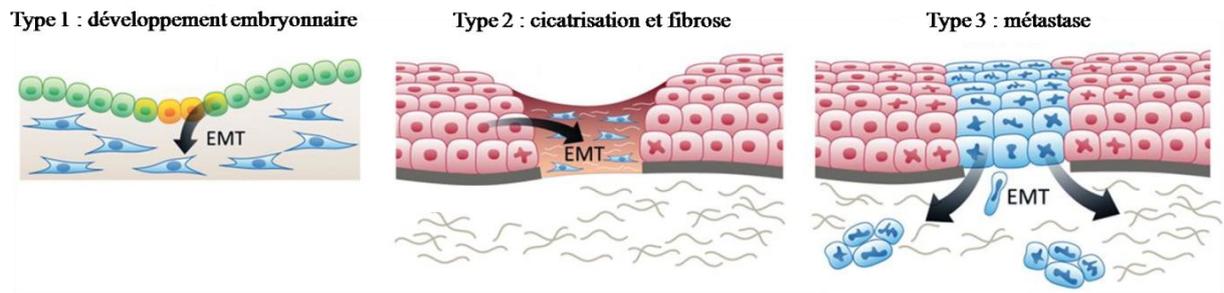


Figure 13 : Les différents types d'EMT. Adapté de Scanlon 2013[286]

2.1. EMT de type 1 dans l'embryogénèse

L'EMT est présente dans chacune des étapes du développement embryonnaire, que ce soit lors de la nidification (J0 de fécondation à J+15), de la gastrulation (J+15 à J+17) ou de la neurulation (J+18 à J+28). L'implantation de l'embryon ainsi que l'initiation du développement placentaire sont dépendantes de l'EMT des cellules externes du blastocyste. Ces cellules déclenchent une EMT pour faciliter l'invasion dans l'endomètre et permettre l'ancrage au placenta [287]. L'EMT est également primordiale dans la formation et la différenciation des feuillet embryonnaires lors de la gastrulation. L'épiblaste, le feuillet primitif, est composé de cellules épithéliales polarisées exprimant l'E-cadhérine. Grâce au processus d'EMT, les cellules de l'épiblaste acquièrent des propriétés migratoires qui permettent l'invagination du feuillet primitif, donnant naissance au mésoderme et à l'endoderme [288]. Au niveau biochimique, l'EMT associée à la gastrulation est dépendante de la voie WNT canonique, notamment WNT3 [289], [290].

Enfin, les cellules épithéliales du neurectoderme se différencient par l'intermédiaire de l'EMT pour acquérir les capacités migratoires nécessaires à la formation de la crête neurale [291]. Il a été montré que les cellules destinées à migrer expriment les gènes codant pour les facteurs de transcription SOX, SNAIL, SLUG et FOXD3 [292]. La voie BMP (appartenant à la famille du TGF β) semble être la voie prédominante de l'induction des propriétés migratoires des cellules de la crête neurale [293].

2.2. EMT de type 2 dans la régénération tissulaire et la fibrose

Les lésions des tissus épithéliaux et/ou endothéliaux déclenchent un ensemble complexe et interconnecté de programmes de cicatrisation pour restaurer l'homéostasie. La coagulation est déclenchée en premier lieu pour stopper la perte de sang, suivie par l'inflammation des tissus et l'activation du système immunitaire. Les cytokines produites par les cellules du système immunitaire activent les fibroblastes quiescents qui se différencient en myofibroblastes capables d'orchestrer l'angiogénèse et la production des composants de l'ECM. Le mécanisme impliqué dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est une EMT de type 2 [294]. Il a été montré chez la souris que l'EMT des myofibroblastes est déclenchée par le TGF β , l'EGF et le FGF2 sécrétés lors de la réponse inflammatoire [295]. Les myofibroblastes activés expriment des marqueurs mésenchymateux spécifiques tels que l' α smooth muscle actin (α -SMA) et le collagène de type I [296].

En cas de lésion aigüe ou chronique, la réponse inflammatoire exacerbée induit une activation continue des myofibroblastes ce qui entraîne un cercle vicieux de régénérations conduisant à une accumulation excessive des composants de l'ECM. Ce phénomène, appelé fibrose, est principalement retrouvé dans les tissus de rein, du foie, des poumons et de l'intestin [297]. Le lien entre la fibrose et l'EMT a été montré chez les patient atteints de fibrose rénale, dans laquelle les cellules exprimant la prolyl 4-hydroxylase, une enzyme responsable de la synthèse du collagène, expriment aussi les marqueurs mésenchymateux α -SMA et Vimentine [298]. De même, des études en IHC ont montré que les marqueurs d'EMT sont retrouvés dans les aires de fibroses du colon des patients atteints de la maladie de Crohn [299].

2.3. EMT de type 3 dans le développement de métastases

Les propriétés de migration et d'invasion acquises par les cellules mésenchymateuses ont permis d'émettre l'hypothèse que l'activation du programme d'EMT correspond au mécanisme principal de la formation des métastases lors de la progression tumorale [300]. Cette hypothèse a été appuyée par les travaux de Bussemakers *et al.*, qui ont montré que la perte de l'E-cadhérine est corrélée à la dissémination métastatique dans un modèle Dunning R-3327 [301]. Cependant, l'analyse de l'expression de *CDH1*, le gène codant pour l'E-cadhérine, par micro-array dans divers tissus de CaP a montré qu'elle était exprimée à des niveaux normaux dans les métastases de CaP, alors qu'une inhibition du gène est bien observée dans les tumeurs primaires [302]. Ces observations ont permis de proposer un nouveau modèle selon lequel la perte du phénotype épithélial est transitoire et réversible. Après avoir migré jusqu'à son site métastatique, la métastase doit initier une transition mésenchymato-épithéliale (MET) pour croître au niveau du site secondaire (figure 14). Cette hypothèse a été validée dans le modèle TSU-Pr1, pour lequel plusieurs lignées dérivées présentant des caractéristiques EMT

différentes ont été établies. L'injection intra-tibiale du clone épithélial provoque une forte croissance tumorale et un début de colonisation des tissus environnants comparé à l'injection des clones mésenchymateux [303]. Récemment, il a été montré que des cycles de passages de métastases de CaP *in vivo* augmentaient l'expression des marqueurs épithéliaux dans les métastases par rapport à l'expression de ces marqueurs dans la lignée parentale DU145 [304]. L'EMT et la MET sont donc des événements essentiels à la progression tumorale.

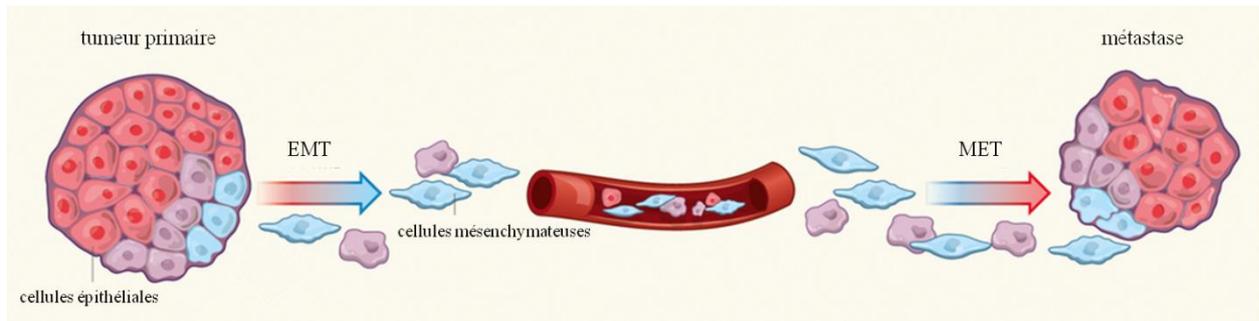


Figure 14 : Rôle de l'EMT et de la MET dans le processus métastatique. Adapté de Denderen 2013 [305]

3. Les voies d'induction de l'EMT

3.1. Le TGF β

Le TGF β est une protéine appartenant à la superfamille des TGF β (comprenant aussi les BMP) qui contrôle la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans les cellules non cancéreuses, le TGF β induit un blocage du cycle cellulaire en phase G1 par déphosphorylation de la protéine RB [306]. Lors du développement embryonnaire, le TGF β est un puissant morphogène, chez l'homme adulte, il induit la cicatrisation, la fibrose et le cancer. Son rôle dans l'EMT est bien documenté et il est l'inducteur d'EMT le plus étudié.

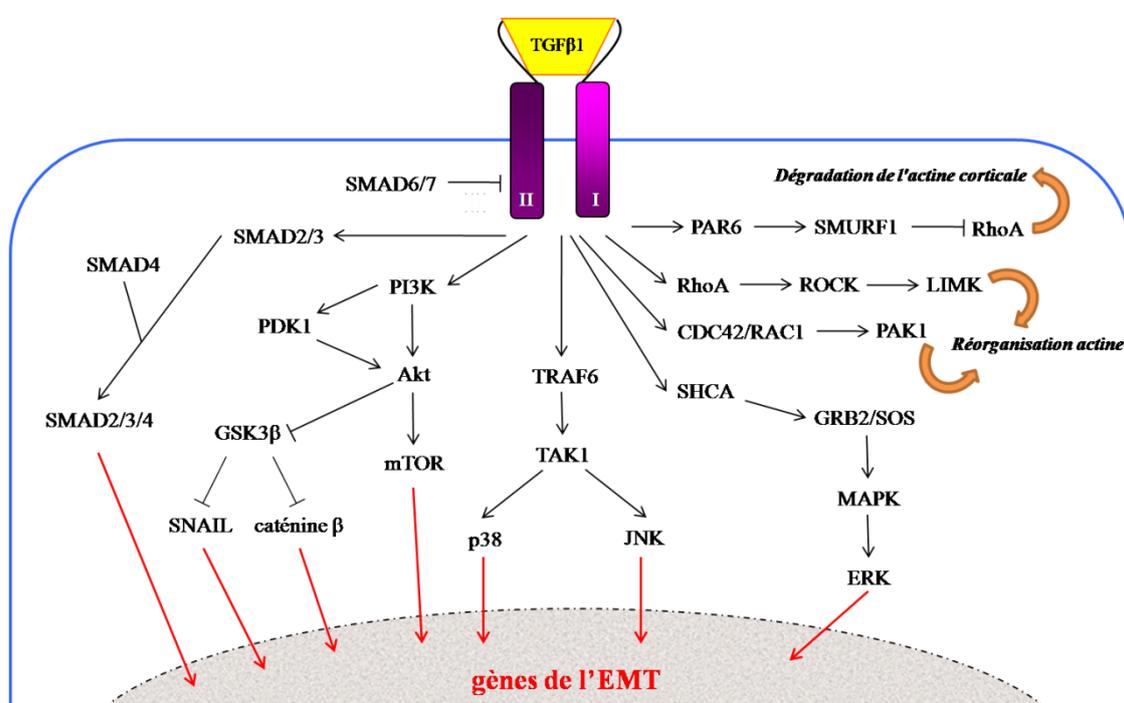


Figure 15 : Voie de signalisation du TGF β .

La voie de transduction canonique du TGF β est la voie SMAD. Le TGF β se lie à un tétramère de TGF β RII, un récepteur transmembranaire à activité sérine/thréonine kinase. L'activation du récepteur entraîne le recrutement et la phosphorylation du récepteur TGF β RI (figure 15). TGF β RI alors activé phosphoryle SMAD2 et SMAD3, qui forme un complexe avec SMAD4. Le complexe SMAD est ensuite transloqué dans le noyau où il active ou inhibe la transcription de ces gènes cibles [307]. Cette voie de signalisation est régulée négativement par SMAD6 et SMAD7 via leur liaison au TGF β RI. Il a été montré que l'expression de formes inactives de SMAD2/3/4 ou une augmentation de l'expression de SMAD7 est suffisante pour l'inhiber l'induction de l'EMT par le TGF β [308], démontrant le rôle essentiel de la voie des SMAD dans ce processus.

En plus de son action sur la voie des SMAD, le TGF β peut activer RhoA [260] et CDC42 [309]. De plus, il a été montré que l'inhibition pharmacologique de la voie PI3K/Akt prévenait l'EMT induite par le TGF β . En conditions normales, Akt inhibe GSK3 β par phosphorylation, ce qui entraîne la stabilisation du facteur de transcription SNAIL [310]. Le TGF β est aussi capable d'activer les voies ERK-MAPK, p38 et JNK. En effet, le TGF β RI phosphoryle la protéine adaptatrice SHCA en réponse au TGF β . SHCA phosphorylé devient une plateforme d'ancrage pour GRB2 et SOS, ce complexe permettant l'activation de la voie de signalisation ERK-MAPK [311]. Le complexe TGF β RI/II peut aussi s'associer à l'ubiquitine ligase TRAF6 qui active à son tour TAK1, une kinase en amont des voies p38 et JNK [312].

3.2. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance impliqués dans l'EMT agissent par l'intermédiaire de l'activation de leurs récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) respectifs. La liaison du ligand induit l'autophosphorylation des récepteurs sur leurs résidus tyrosine permettant l'activation des voies PI3K/Akt/mTOR, MAPK et la signalisation Src (figure 16). Les principaux facteurs de croissance capables d'induire l'EMT par l'intermédiaire de l'activation de leurs récepteurs sont décrits ci-après.

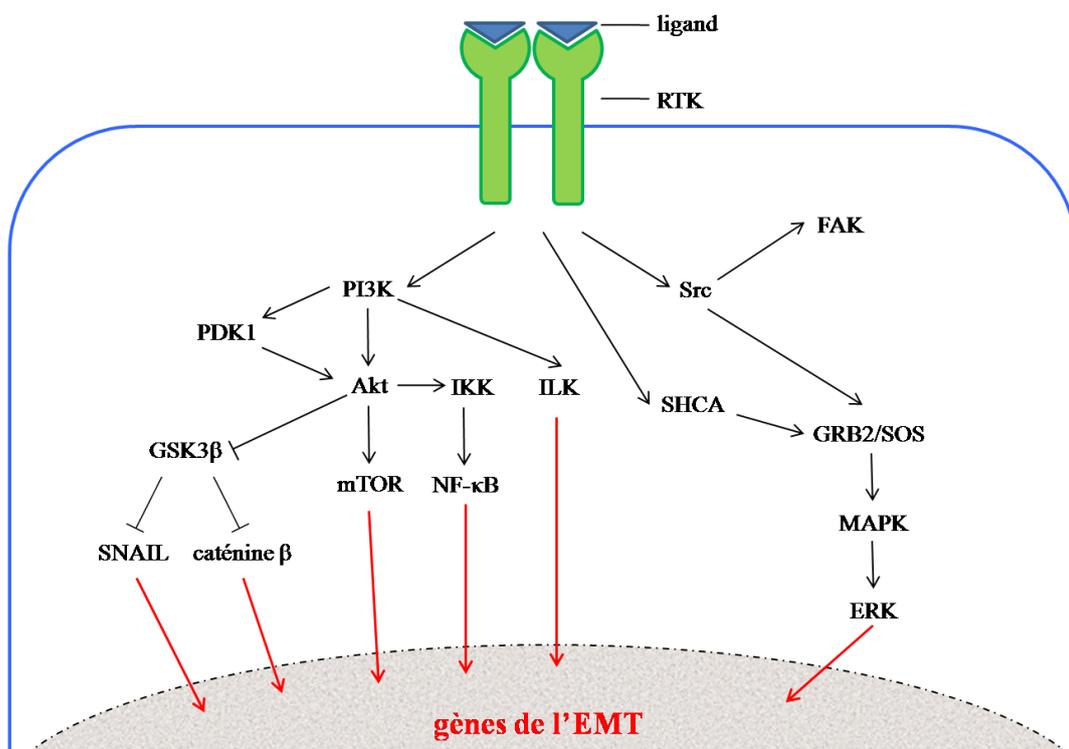


Figure 16 : Voie de signalisation des facteurs de croissance dans l'EMT

- **FGF** : Il existe 23 FGF exprimés chez l'homme, et seuls les FGF1 à 10 se lient aux récepteurs FGFR. Les FGFR activés après liaison de leur ligand régulent de nombreux processus cellulaires comme dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et la migration dans de nombreux types cellulaires [313]. Dans les cellules de cancer de la vessie, l'EMT induite par FGF1 est accompagnée de l'expression de Slug, la déstabilisation des desmosomes et l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et de MMP13 [314].
- **EGF** : *In vitro*, l'EGF induit l'endocytose de l'E-cadhérine ainsi qu'une surexpression des EMT-TFs SNAIL et TWIST [315]. Sur des explants de cellules épithéliales humaines cultivées *ex vivo*, l'EGF induit l'EMT par l'intermédiaire de l'activation de la voie ILK. Les cellules traitées par l'EGF sont caractérisées par l'augmentation de leurs capacités migratoires et invasives, notamment grâce à l'expression de MMP2 et MMP9 [316]. Enfin, l'activation de HER2 dans des modèles de tumeurs mammaires est associée à l'EMT et à l'échappement au système immunitaire [317].
- **HGF** : Le HGF agit en se fixant au récepteur c-Met et a été identifié pour la première fois grâce à sa capacité à induire la différenciation des cellules épithéliales de rein [318]. L'expression de SLUG médiée par l'HGF entraîne la déstabilisation des desmosomes et la répression du gène codant pour la desmoplakine [319].
- **VEGF** : Le VEGF induit l'angiogénèse mais également l'EMT par l'intermédiaire du facteur de transcription SNAIL. Dans les cellules de cancer du sein, l'induction de l'EMT par le VEGF induit la stabilisation de SNAIL par l'intermédiaire de l'inhibition de la kinase GSK3 β [320].
- **IGF** : L'activation du récepteur l'IGF-1R induit l'EMT dans des cellules épithéliales de sein, entraînant la perte d'expression d'E-cadhérine et le gain d'expression de la N-cadhérine, de la Vimentine et de la fibronectine. Dans ces cellules, l'augmentation de SNAIL en réponse à l'IGF1 dépend de NF- κ B [321]. Dans le modèle ARCaP, le traitement avec l'IGF1 est accompagné de l'expression de Zeb1 [322].

3.3. Interactions entre les intégrines et la matrice extracellulaire

L'ECM est impliquée dans différents processus biologiques comme la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'activation de voies de signalisation. Les interactions entre l'ECM et les cellules sont principalement médiées par les intégrines. Les intégrines peuvent induire l'EMT selon deux voies de signalisation distinctes, par l'intermédiaire des kinases FAK et ILK. L'interaction de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ avec l'ECM entraîne l'activation d'ILK, une kinase capable d'activer Akt et d'inhiber

GSK3 β [323]. Plusieurs travaux ont démontré le rôle essentiel de la kinase ILK dans l'EMT dans des modèles de cancer colorectal, de vessie et de la langue [324]–[326]. L'ILK est aussi impliquée dans l'EMT des cellules de CaP exprimant le gène de fusion *TMPRSS2/ERG* [327], la protéine codée par ce gène de fusion étant capable de se lier au promoteur de *ZEB1* et d'activer sa transcription [328]. De même, il a été montré dans la lignée DU145 que la signalisation FAK/Src participe à l'EMT et que l'activation de la kinase FAK augmente la capacité d'invasion de ce modèle [329].

Au vu de leur localisation membranaire, les intégrines constituent des cibles thérapeutiques potentielles pour bloquer l'EMT dans les cellules cancéreuses. Dans ce sens, il a été montré *in vivo* que l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique des intégrines α_v (GLPG0187) inhibe la formation des métastases osseuses de CaP en perturbant l'EMT [330].

3.4. Les voies de signalisation du développement embryonnaire

3.4.1. La voie WNT

L'activation des récepteurs spécifiques de la voie WNT, les récepteurs Frizzled (FZD), entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisations. Ces voies sont regroupées en deux catégories, la voie canonique qui implique la β -caténine, et les voies non canoniques qui agissent indépendamment de ce facteur de transcription (figure 17).

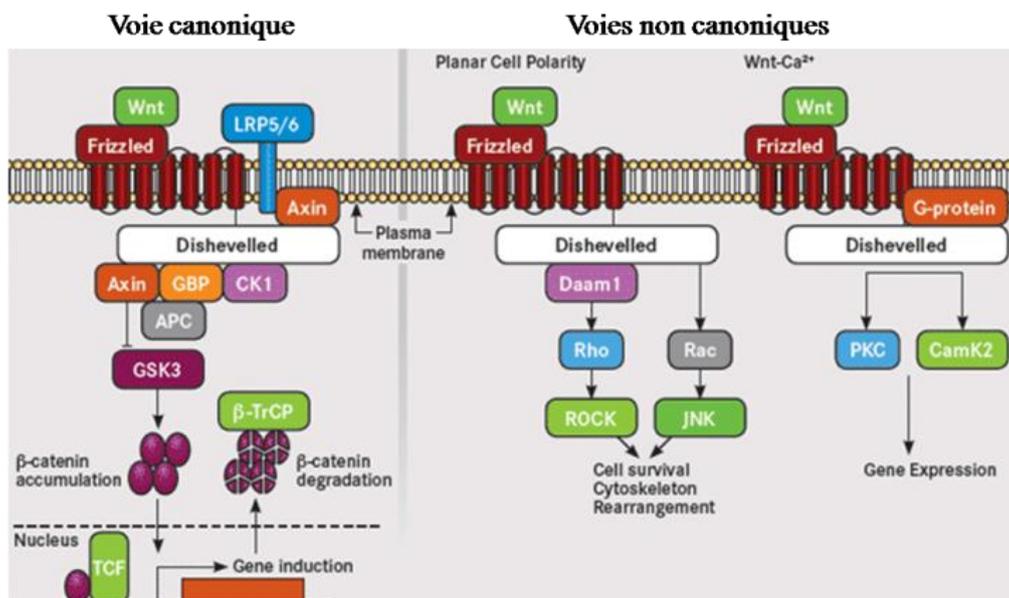


Figure 17 : Description des voies WNT canonique et non canoniques

3.4.1.1. La voie WNT/ β -caténine

Le rôle de la voie canonique dans l'induction de l'EMT est le plus étudiée. La voie canonique est caractérisée par l'activation de la β -caténine. La β -caténine cytoplasmique libre agit comme un facteur de transcription, qui active la transcription de ses gènes cibles en s'associant avec les facteurs de transcription LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor 1) et les membres de la famille TCF (T-cell factor) [331]. L'activation de cette voie nécessite la liaison des récepteurs FZD au co-récepteur LRP5/6 [332]. En l'absence de stimulation par les ligands WNT, la kinase GSK3 β inhibe la β -caténine cytoplasmique par phosphorylation ce qui conduit à son ubiquitination par TrCP1 puis sa dégradation par le protéasome [333]. Le complexe FZD-LRP5/6 activé par la liaison d'un ligand WNT phosphoryle Dishevelled (DSH), ce qui conduit à l'inhibition de la GSK3 β par phosphorylation sur sérine 9 et empêche la dégradation de la β -caténine.

La β -caténine permet la transcription de gènes codant pour des protéines essentielles dans le processus d'EMT tels que SNAIL, SLUG mais aussi la Vimentine et la fibronectine [334], [335]. Dans les cellules de cancer du sein et de la prostate, il a été montré que l'EMT pouvait être déclenchée par l'activation de la voie WNT/ β -caténine [336]. *In vivo*, l'activation de la voie WNT/ β -caténine est impliquée dans la progression tumorale de xénogreffes de cellules de CaP murines [337]. Chez les patients, la localisation nucléaire de la β -caténine est associée à 40% des métastases de CaP [338], démontrant le rôle de cette voie dans la progression métastatique.

3.4.1.2. Les voies WNT non canoniques

Parmi les voies WNT non canoniques, la voie WNT/Calcium et WNT/PCP sont les mieux caractérisées. Les voies non canoniques sont activées par des ligands spécifiques. A ce jour, seul WNT5A a montré un rôle exclusif dans l'activation des voies non canoniques. L'activation de la voie WNT/PCP entraîne le recrutement et l'activation de DAAM1. DAAM1 active ensuite les petites protéines G Rho et Rac1, et induit la réorganisation du cytosquelette d'actine [339].

L'activation de la voie WNT/Calcium nécessite l'interaction de FZD avec le co-récepteur ROR1/2. Le complexe active ensuite la phospholipase C et entraîne la production d'IP3 et de DAG à partir du PIP2 lié à la membrane [340]. L'IP3 déclenche le relargage du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique, ce qui active la CaMKII (calmoduline kinase II) et la calcineurine. Les deux enzymes stabilisent respectivement les facteurs de transcription NF- κ B et NFAT. De plus, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium permet l'activation DAG dépendante de la PKC. Les PKC appartiennent à une famille de kinases ayant de nombreux substrats comme les intégrines, GSK3 β , RhoA, EGFR, leur permettant de réguler la motilité et la différenciation cellulaire.

Peu d'études traitent du rôle des voies WNT non canoniques sur l'induction de l'EMT. Cependant, il a été montré que WNT5A est capable d'induire l'EMT dans les cellules de cancer du pancréas [341] et de cancer gastrique [342]. Il est possible que WNT5A induise l'EMT via son action régulatrice sur la CaMKII. En effet, il a été montré dans des lignées de prostate normales et tumorales que l'activation de CamKII par WNT5A entraîne la réorganisation du cytosquelette d'actine et augmente la migration des cellules [343]. Ces résultats sont cohérents avec les données obtenues chez les patients atteints de CaP métastatique, chez qui les cellules tumorales circulantes expriment WNT5A ainsi que d'autres gènes liés à l'EMT [344]. Malgré son rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine, aucune étude n'a rapporté d'association entre la voie WNT/PCP et l'induction de l'EMT.

3.4.2. La voie Hedgehog

La voie de signalisation Hedgehog (Hh) est un régulateur majeur du développement embryonnaire. Chez l'adulte, la voie Hh est impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules souches ainsi que dans la réparation et la régénération tissulaire. La famille Hh comprend 3 membres, Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog et Desert Hedgehog [345]. Dans les cellules eucaryotes, la grande majorité des composants de la voie sont localisés dans une structure cellulaire particulière, le cil primaire [346]. Il s'agit d'une structure capable de lier une grande variété de ligands extracellulaires, agissant comme une antenne cellulaire. En l'absence de ligand Hh, Patched (PTCH) inhibe l'activité de Smoothened (SMO), le récepteur transmembranaire capable de transduire le signal de Hh. Lorsque SMO est inactif, le facteur de transcription GLI (glioma-associated oncogene family zinc finger) est séquestré dans le cytoplasme par le complexe Fused/SUFU (supressor of protein fused) ce qui empêche la transcription des gènes cibles de la voie Hh (figure 18). La liaison des ligands Hh au récepteur PTCH induit l'adressage de SMO à la membrane du cil et son activation. L'activation de SMO entraîne la dissociation du complexe Fused/SUFU et la libération du facteur de transcription GLI pour activer ses gènes cibles.

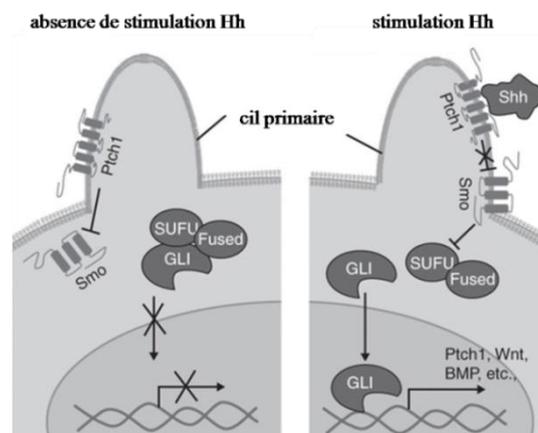


Figure 18 : La voie de signalisation Hedgehog. Adapté de Eggenschwiler 2007

L'expression ectopique de GLI induit l'expression de SNAIL et la perte de l'E-cadhérine dans un modèle cellulaire de rein [347]. De plus, l'inhibition pharmacologique de la signalisation Hh dans des cellules de NSCLC entraîne la réversion du phénotype mésenchymateux, caractérisée par la réduction de l'expression de ZEB1 et de la fibronectine, ainsi que l'augmentation de l'expression de l'E-cadhérine [348].

2.4.3. La voie Notch

Les mammifères expriment 4 récepteurs transmembranaires Notch et 5 ligands canoniques (DLL1/3/4 et Jagged-1/2). La spécificité de liaison entre les différents ligands et récepteurs est contrôlée par la glycosylation du récepteur. Le contact cellule/cellule est généralement nécessaire à l'activation de la voie Notch. Après liaison du ligand, le récepteur est clivé par la metalloprotéinase ADAM10 au niveau extracellulaire (figure 19). Le domaine extracellulaire du récepteur lié au ligand est ensuite endocytosé par la cellule exprimant le ligand. Le domaine intracellulaire de Notch (NIC) est ensuite clivé au niveau intracytoplasmique par la γ -sécrétase ce qui provoque sa libération dans le cytoplasme. NIC est ensuite transloqué dans le noyau où il recrute le co-activateur MAML. Le complexe ainsi formé est capable d'activer la transcription des gènes cibles de la voie Notch [349].

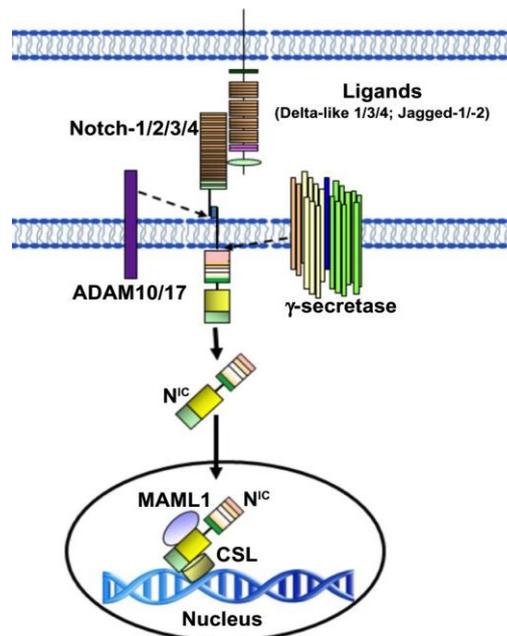


Figure 19 : La voie de signalisation Notch. Adapté de Espinoza 2013

Il a été montré que la signalisation Notch est un fort inducteur de l'EMT. *In vitro*, la surexpression de Notch-1 induit l'expression de SNAIL ainsi que la répression de l'E-cadhérine dans des lignées endothéliales [350]. De plus, il a été montré que SLUG est un gène cible de la voie Notch [351]. Notch-1 est fortement exprimé dans les métastases osseuses de CaP par rapport aux tumeurs

primaires [352]. De même, il a récemment été montré que le ligand Jagged-1 était fortement exprimé dans les tumeurs de CaP de haut grade et dans les métastases par rapport aux tumeurs primaires [353]. Ces données suggèrent que la voie Notch pourrait être impliquée dans l'EMT, et donc dans la progression tumorale du CaP et la formation des métastases osseuses.

3.5. La voie de signalisation du récepteur des androgènes

Plusieurs études ont montré le rôle de la signalisation du AR dans l'induction de l'EMT. Cependant, certains résultats sont contradictoires et bouleversent certaines certitudes concernant l'expression du AR. Cai *et al.* ont montré pour la première fois que la co-expression de Src et du AR dans les épithéliums prostatiques murins provoquait l'expression de marqueurs mésenchymateux [354]. Cette étude montre que l'EMT serait due à l'activation constitutive de la voie des MAPK induite par la surexpression simultanée du AR et de Src. De plus, la signalisation du AR est nécessaire à l'EMT induite par le TGF β dans les cellules BPH-1 [355]. Enfin, Zhu *et al.* ont montré que l'administration de DHT induit l'EMT dans les cellules PC3 et LNCaP [356]. Il est possible que l'EMT-TF impliqué dans l'EMT induite par les androgènes soit ZEB1. En effet, il a été montré dans des cellules de cancer du sein que la signalisation du AR active la transcription de ZEB1 [357]. Deux études récentes ont montré que la signalisation du AR est impliquée dans la transcription des EMT-TFs ZEB1 et ZEB2. En effet, il a récemment été montré que la stimulation de cellules LNCaP par les androgènes entraîne la surexpression de ZEB2 [358]. De plus, le promoteur du gène ZEB1 possède des éléments de réponse aux androgènes (ARE) [359]. Dans cette étude, les cellules androgéno-indépendantes DU145 transfectées avec un gène rapporteur contrôlé par les ARE de ZEB1 répondent au traitement par les androgènes. Ces résultats expliquent ceux obtenus par Zhu *et al.* sur le modèle PC3, et suggèrent que la présence d'ARE sur le promoteur du gène ZEB1 pourrait être suffisante pour induire l'EMT suite aux traitements par les androgènes. Des investigations supplémentaires sont cependant nécessaires pour comprendre ce mécanisme.

4. Régulation de l'EMT par les microARNs

Les microARNs (miRs) inhibent de façon spécifique l'expression des gènes en se liant aux ARNs messagers, inhibant ainsi leur traduction ou favorisant leur dégradation. Il a été montré que les miRs sont notamment impliqués dans la régulation des EMT-TFs. Par exemple, miR-29b régule l'EMT en inhibant la N-cadhérine, TWIST et SNAIL dans les cellules PC3 [360]. De plus, miR-1/miR-200b et SLUG forment une boucle de régulation négative, les miRs réprimant l'expression de SLUG, et SLUG inhibant l'expression des miRs [361]. Le même phénomène a été identifié entre miR-203 et SNAIL [362]. Les membres de la famille miR-200 (comprenant miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c et miR-429) sont particulièrement importants dans le contrôle de l'EMT. La famille miR-200 et les protéines ZEB sont impliquées dans une boucle de régulation négative [363]. Il a été montré que l'expression ectopique de miR-200b était capable d'inhiber l'EMT induite par le TGF β ainsi que l'expression de la fibronectine en inhibant l'expression de ZEB1 et ZEB2 [364]. Enfin, l'expression des miRs de la famille miR-200 est associée à la restauration des caractéristiques épithéliales dans les lignées cellulaires DU145 [304]. Dans le CaP, les miR-203 et miR-205 sont sous-exprimés à la fois dans les lignées cellulaires mais aussi dans les biopsies [365], [366]. Les miRs sont eux-mêmes régulés par l'activation des voies d'induction de l'EMT. Par exemple, l'activation de la voie du PDGF réduit l'expression de miR-200, entraînant l'expression des facteurs mésenchymateux ZEB1, ZEB2 et SLUG [367]. De manière intéressante, il a été montré que le maintien du phénotype mésenchymateux due à l'expression autocrine du TGF β est associé à la méthylation réversible du promoteur du gène codant miR-200 [368].

En plus de leur action inhibitrice sur les facteurs de transcriptions spécifiques de l'EMT, les miRs ciblent aussi les protéines Rho GTPases. En effet, il a été montré *in vivo* que miR-31 cible RhoA, entraînant une diminution de la dissémination des cellules de cancer du sein [369]. MiR-124 est également impliqué dans l'inhibition de l'invasion via son action régulatrice sur la kinase ROCK, un effecteur cytoplasmique de la signalisation de RhoA [370]. Enfin, le miR-194 peut inhiber l'expression de la N-cadhérine. Cependant, alors que les auteurs ont démontré que l'ARNm de la N-cadhérine possède un site de liaison pour ce miR, il ne peut pas être exclu que cet effet soit dû à son action sur les facteurs de transcription de l'EMT [371].

Au vu de ces données, il est clair que l'activité des miRs est essentielle au maintien du phénotype épithélial et qu'elle intervient dans le contrôle de la transition vers le phénotype mésenchymateux.

L'étude des mécanismes de l'EMT est complexe. En effet, de nombreux phénomènes de signalisation croisée existent entre les différentes voies d'induction dont certains exemples ont été présentés. La voie du TGF β reste la plus complexe de ce point de vue. Elle est notamment impliquée dans la signalisation croisée avec la voie des intégrines [372], avec la signalisation du AR via l'action des facteurs SMAD [373], également avec les voies Hedgehog et Notch [374], [375]. L'EMT participe également aux mécanismes de résistance aux taxanes, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

5. Participation de l'EMT dans la résistance aux taxanes

5.1. Relations entre CSC et EMT

De nombreuses études montrent que le phénotype des cellules mésenchymateuses et des CSC est très similaire [376]. Cette relation peut être en partie expliquée par l'interconnexion de ces processus lors du développement embryonnaire. En effet, lors de la gastrulation les cellules souches épithéliales de l'épiblaste se différencient en réalisant une EMT pour permettre l'invagination du feuillet embryonnaire et la formation du mésoderme [377]. De manière intéressante, ces mêmes cellules donnent naissance à des cellules mésenchymateuses, caractérisées par une balance des cadhérines et une forte l'expression de la Vimentine quand elles sont remises en culture [378]. L'activation des voies de signalisation du développement et du TGF β sont primordiales pour le maintien du phénotype mésenchymateux et des CSC. Tout comme les lignées mésenchymateuses, les CSC de cancer du sein expriment fortement le TGF β 1 et le TGF β RII et il a été montré que l'inhibition de cette voie de signalisation du TGF β entraîne la réversion des CSC vers un phénotype épithélial [379]. Les voies de signalisation WNT, Notch et hedgehog sont également impliquées dans l'auto-renouvellement des CSC. Il a été montré que la voie WNT est suractivée dans les CSC de colon [380]. La voie Notch est à la fois impliquée dans l'EMT et dans la formation des CSC. Il a été montré que les CSC de gliome exprimant fortement ABCG2 et potentiellement résistantes aux drogues, sont caractérisées par une forte expression de Notch-1 [381].

Le rôle des voies du développement dans la résistance au docetaxel a récemment été démontré par les travaux de Domingo-Domenech *et al.* En effet, les auteurs ont montré que les cellules 22RV1 et DU145 résistantes au docetaxel sont caractérisées par l'expression du marqueur de CSC CD44 et l'activation constitutive des voies Notch et Hedgehog. De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique de ces voies *in vivo* entraîne une diminution de la croissance tumorale [382]. Ces résultats montrent la relation entre l'EMT et les CSC, deux phénotypes cellulaires impliqués dans la progression métastatique et la rechute.

5.2. Description des mécanismes de résistance liés à l'EMT

La résistance aux drogues associée à l'EMT a été décrite pour la première fois en 2006. Dans un modèle de NSCLC, Witta *et al.* ont démontré que la surexpression de l'E-cadhérine sensibilisait les cellules aux inhibiteurs d'EGFR. Ce phénomène a été démontré dans la résistance aux taxanes en utilisant des lignées de cancer du sein résistantes au docetaxel et au paclitaxel [383]. Les lignées résistantes utilisées sont caractérisées par la perte de l'E-cadhérine, l'expression de la Vimentine et du facteur de transcription SLUG. La surexpression du TGF β RII associée à celle de SMAD3 indique que le phénotype mésenchymateux acquis par ces lignées est dû à l'activation constitutive de la voie canonique du TGF β . Cette voie est aussi impliquée dans la résistance au docetaxel des cellules PC3 et DU145 [384]. En effet, l'analyse des profils d'expression géniques entre les lignées résistantes et parentales a permis d'identifier plusieurs gènes dérégulés appartenant à cette voie comme le TGF β RII, TGF β RIII, l'intégrine β 2 et le LTBP2 (latent TGF β binding protein 2). Le prétraitement des cellules parentales avec le TGF β 1 augmente la survie des cellules traitées par docetaxel, démontrant le rôle de l'activation de cette voie d'induction de l'EMT dans la résistance au docetaxel.

D'autres travaux rapportés très récemment confirment ce concept. En effet, il a été montré en 2013 que l'expression de ZEB1 est critique pour le maintien du phénotype mésenchymateux et la résistance au docetaxel des lignées de NSCLC [385]. Le rôle des facteurs de transcription ZEB est également essentiel pour la résistance des cellules de CaP. Le maintien de l'expression de ZEB1 dans les PC3 et DU145 résistantes au docetaxel est assuré par l'inhibition constitutive des miR-200c et miR-205 [386]. De manière intéressante, les auteurs associent le contrôle des facteurs de transcriptions spécifiques de l'EMT par les miRs aux caractéristiques de CSC de ces cellules. En effet, près de 56% des cellules PC3 résistantes et 45% des cellules DU145 résistantes expriment les marqueurs CD44⁺/CD24⁻. Ce phénomène est retrouvé dans plusieurs modèles de cancer, il a notamment été montré que l'expression ectopique de SNAIL et de TWIST entraîne l'induction de l'EMT dans un modèle de cancer du sein et que ces cellules sont caractérisées par le phénotype CD44⁺/CD24⁻ [387]. Ces données montrent qu'il pourrait être intéressant d'utiliser les stratégies thérapeutiques qui ciblent les CSC pour traiter les tumeurs présentant des signes d'EMT, et ainsi inhiber la progression métastatique et la rechute.

Matériels et Méthodes

Culture cellulaire

Les cellules IGR-CaP1, PC3, LNCaP et 22RV1 sensibles et résistantes au docetaxel sont cultivées en milieu RPMI1640 supplémenté avec 10% SVF (sérum de veau fœtal). Afin de maintenir le phénotype des lignées résistantes, les cellules sont traitées une fois par mois au docetaxel à la dose maximale tolérée par chaque lignée (IGR-CaP1-R : 100nM, PC3-R : 12nM, LNCaP-R : 12nM, 22RV1-R : 100nM). Les cellules HEK-293 sont maintenues en milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF.

Plasmides et réactifs

Le vecteur d'expression du cluster miR-141/200c a été acheté chez System Biosciences (réf. PMIRH200c-141PA-1). La séquence de SHISA3-Flag a été conçue au laboratoire en insérant l'étiquette Flag après le nucléotide 258 (acide aminé 86). La séquence codante de SHISA3-Flag a été insérée en amont du promoteur EF1a par clonage dans le vecteur d'expression lentiviral pLv-2028 (fourni par D. Compagno, IQIBICEN-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Argentina). Le vecteur pLv-SHISA3-Flag exprime la GFP comme gène rapporteur. Les constructions ont été vérifiées par séquençage. Le vecteur d'expression TGFβRII-HA a été fourni par N. Théret (Inserm U620, Rennes, France). Le docetaxel a été obtenu à la pharmacie de Gustave Roussy (Taxotère en solution injectable, 160mg/8ml). Pour les études *in vitro*, le docetaxel est dilué dans le milieu de culture, *in vivo* le docetaxel est dilué dans une solution de 0,9% NaCl supplémentée avec 5% de glucose. La protéine recombinante humaine TGFβ1 (R&D systems) a été reconstituée dans une solution stérile de 4mM HCl contenant 1mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA, Euromedex). L'inhibiteur LY2157299 (AbMole Biosciences) a été resuspendu dans le DMSO.

Production d'un anticorps polyclonal anti-SHISA3

Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la partie C-terminale de la protéine SHISA3 humaine a été développé au laboratoire et produit par Eurogentec. Cet anticorps est dirigé contre le peptide C-terminal FAYPLQQEPPLPGKSC (épitope 217-232). D'autres anticorps polyclonaux anti-SHISA3 ont été achetés par la suite, l'anti-SHISA3 dirigé contre l'épitope 158-186 (Abgent) et l'anticorps antiSHISA3 dirigé contre l'épitope120-166 (Sigma).

Transfection de siARN et de vecteur d'expression

Les cellules sont transitoirement transfectées avec 10nM de siARN (petit ARN interférent) ciblant les gènes d'intérêts ou des contrôles négatifs (Stealth siRNA, Invitrogen) en utilisant la lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Les siARNs dirigés contre SHISA3 utilisés dans ce travail sont les siSHISA3-94 (réf. HSS152694), siSHISA3-95 (réf. HSS152695) et siSHISA3-96 (réf. HSS152696), le contrôle utilisé est le siARN Medium GC. Les siARNs et la lipofectamine sont mis en solution dans le milieu OPTI-MEM (Gibco) puis ajoutés au milieu de culture. Le milieu est changé après 6h de transfection. Les cellules sont transitoirement transfectées avec 1µg de vecteur d'expression en utilisant le kit jetPRIME transfection reagent (Ozyme) selon le protocole du fournisseur. La solution est ajoutée au milieu de culture pendant 16-24h. Le milieu est remplacé à la fin du temps d'incubation.

Extraction des ARNs totaux et des miRs

Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits, puis lysées avec 1ml de TRIzol reagent (lifer technologies). Pour l'extraction des ARNs provenant de xéno greffes, les échantillons congelés sont placés dans un tube eppendorf de 2ml préalablement remplis avec 1ml de TRIzol reagent. Une bille d'acier stérile est ajoutée (Qiagen) puis les tissus sont lysés mécaniquement à froid (-80°C) en utilisant le Tissue Lyser II (Qiagen). Les ARNs sont ensuite purifiés avec le kit RNeasy Micro (Qiagen) selon le protocole fournis par le fabricant. L'intégrité des ARNs (RIN) est mesurée en utilisant le Bioanalyzer 2100 (Agilent). Les ARNs issus de lignées cellulaires ayant un RIN>9, et les ARNs issus des xéno greffes ayant un RIN>7, sont utilisés pour la préparation des ADN complémentaires. Le protocole d'extraction des miRs est identique à celui utilisé pour les ARNs totaux.

PCR quantitative en temps réel sur ARN totaux

La transcription reverse des ARNs totaux est réalisée sur 1µg d'ARN, avec le kit GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems). La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) est réalisée avec le système Vii7 (Applied Biosystems) en utilisant 5µl d'ADN complémentaire dilué au 1/20ème dans un volume final de 25µl. Les amorces des gènes de référence et des gènes d'intérêt (primer TaqMan, Applied Biosystems) sont utilisées selon le protocole du fournisseur (tableau 5A). La quantité des ARNs transcrits est normalisée par l'amplification d'un contrôle endogène (*GAPDH*). La méthode du $\Delta\Delta C_t$ a été utilisée pour quantifier les transcrits. Afin d'étudier l'expression d'un gène entre plusieurs lignées, les valeurs $\Delta\Delta C_t$ sont calculées en fonction de l'expression du gène dans un ARN contrôle universel (Applied Biosystems).

PCR quantitative en temps réel sur miRs

- Etude des contrôles endogènes : La transcription reverse des miRs est réalisée de façon individuelle à partir de 10ng d'ARN total à l'aide du kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) suivie d'une RT-qPCR en utilisant les TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, réf. assay miR-24 : 000402, réf. assay RNU6B : 001093). L'amplification des transcrits est mesurée avec le système Viia7. Les valeurs de Ct sont déterminées par le logiciel du système et sont utilisées comme mesure de l'expression pour la détermination des contrôles endogènes.

- Etude haut-débit : La transcription reverse de l'ensemble des miRs est réalisée avec le kit Megaplex Primer Pools A (Applied Biosystems) à partir d'1µg d'ARN total. La RT-qPCR utilise les cartes à micro-réseaux de faible densité « TLDA » (TaqMan Array Human Micro RNA A Cards v2.0, Applied Biosystems) qui contiennent les amorces de 377 miRs cibles et de 4 contrôles endogènes. La RT-qPCR est réalisée à l'aide du réactif Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), l'amplification des transcrits est quantifiée par le système 7900HT et analysée avec le logiciel SDS (Applied Biosystems). Des triplicats biologiques indépendants sont réalisés pour chaque lignée cellulaire. Dans chaque condition, un miR est caractérisé par 3 valeurs de Ct (cycle threshold) correspondant à la mesure de son expression dans les triplicats biologiques. Si une valeur est manquante, elle est ajustée selon la méthode mathématique des k plus proches voisins. Si 2 ou 3 valeurs manquent, le miR est supprimé. Les valeurs ΔCt obtenues pour chaque triplicat de miRs sont rapportées sur un graphe à 3 axes. Le nuage de points obtenus permet de tracer une droite de projection qui permet l'estimation d'une unique valeur de ΔCt par triplicat, permettant le calcul des fold change (FC). L'étude de la distribution des points nous a permis d'observer que les valeurs de Ct supérieures à 32 ne suivaient plus une distribution linéaire. Les miRs dont les valeurs sont supérieures à 32 Ct à la fois dans les triplicats de cellules résistantes et dans les triplicats sensibles ont donc été écartés des analyses, ces miRs étant trop peu exprimés pour que les différentiels d'expression soient fiables.

PCR quantitative en temps réel sur tissus humains

Les ADN complémentaires de 48 tissus humains et de 19 tissus tumoraux ont été fournis par les TissueScan Human Normal and TissueScan Human Cancer cDNAArrays (Origene). La RT-qPCR gène *SHISA3* et du contrôle endogène *GAPDH* a été quantifiée en utilisant les sondes décrites dans le tableau 5A et le système Viia7 selon le protocole décrits pour les ARNs totaux. La méthode du $\Delta\Delta Ct$ a été utilisée pour quantifier les transcrits.

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été utilisée pour déterminer l'expression des marqueurs de CSC CD44 et CD133. Les cellules ne sont pas perméabilisées afin de déterminer l'expression des protéines de surface. Les anticorps conjugués CD44-FITC (eBiosciences, réf. 57.0441.82) et CD133-APC (Miltenyi-Biotec, réf. 130.092.395) ont été utilisés. Les anticorps contrôles d'isotypes correspondants ont été inclus dans chaque analyse. Les cellules ont été analysées à l'aide du cytomètre FACS Calibur (Becton Dickinson).

Extraction de protéines et Western Blot

Les extraits cellulaires sont préparés en tampon RIPA (Cell Signaling) complété avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma). La lyse s'effectue sur glace pendant 4h afin d'assurer la solubilisation de SHISA3. Concernant l'extraction des protéines issues de xénogreffes, les tumeurs congelées sont incubées dans du tampon RIPA, selon un rapport 10:1 (10µl de RIPA pour 1mg de tumeur). Les tumeurs sont ensuite lysées mécaniquement à froid en utilisant le système PreCelllys (Bertin Technologies). Les lysats sont dosés à l'aide du kit Micro BCA Protein Assay (Pierce,) et 50µg de lysats sont utilisés pour les analyses en Western Blot. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur membranes de nitrocellulose (Invitrogen) puis saturées en tampon Tris Buffered Saline (Euromedex) supplémenté avec 0,01% de Tween 20 (TBS-T) et avec 5% de BSA. Les anticorps primaires sont dilués dans une solution de TBS-T + 1% BSA et incubés sur la nuit à 4°C avec agitation. Après trois lavages en TBS-T, les membranes sont incubées à température ambiante pendant 1h avec les anticorps secondaires conjugués à la HRP (Horseradish peroxidase) dilués en TBS-T + 1% BSA. La révélation est réalisée avec le kit enhanced chemoluminescence-based detection (Pierce), puis est mesurée avec la caméra Chemidoc XRS+ (Biorad). Les anticorps utilisés sont référencés dans le tableau 5B.

Immunofluorescence

Les cellules sontensemencées sur lamelles de verre stérile. Pour les études n'impliquant pas de traitement, les cellules sont cultivées pendant deux jours avant fixation. Pour les études impliquant un traitement par une drogue, une transfection de siARN ou de vecteur d'expression, les cellules sont cultivées pendant 24h pour permettre leur adhésion au support avant traitement. La fixation est réalisée à l'aide de paraformaldéhyde 4% (Euromedex). Les cellules fixées sont perméabilisées et saturées avec une solution de blocage composée de Phosphate Buffered Saline (PBS) supplémentée avec 0,2% de Triton X-100 (Sigma) et 2% de sérum de chèvre (Sigma). Les cellules sont incubées 1h30 à

température ambiante avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage. Après lavages en PBS/0,2% Triton X-100, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaire conjugués à des fluorochromes dilués dans la solution de blocage, pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les lamelles sont ensuite montées sur lame de verre en utilisant le milieu de montage Vectashield contenant du DAPI (Vector). Les lames sont séchées 1h à température ambiante à l'abri de la lumière puis scellées. Les anticorps utilisés sont référencés dans le tableau 5B. Les images sont prises au microscope à épifluorescence (Zeiss Axioplan 2) ou au microscope confocal (Leica TCS SPE). Les données obtenues sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health), les reconstitutions tridimensionnelles sont obtenues à l'aide du logiciel Imaris (Bitplane).

Induction de l'EMT *in vitro*

$2,5 \cdot 10^4$ cellules IGR-CaP1 et $5 \cdot 10^4$ cellules PC3 sontensemencées dans des puits de plaques 6 puits. Après 24h, les cellules sont transfectées avec 10nM de siARN ou traitées avec 10ng/ml de TGF β 1. Un autre traitement est réalisé après 36h pour maintenir l'induction pendant 5 jours nécessaires à l'expression des marqueurs mésenchymateux. Le milieu est renouvelé 6h après chaque transfection par siARN, et lors de chaque traitement par TGF β 1. La lyse des cellules et l'extraction des protéines sont réalisées en tampon RIPA 5 jours après la première transfection.

Test de Migration cellulaire

$2 \cdot 10^5$ cellules IGR-CaP1 et $4 \cdot 10^5$ cellules PC3 sontensemencées dans des puits de plaques 6 puits. Les cellules sont traitées par siARN afin d'induire l'EMT selon le protocole décrit précédemment. Les blessures sont réalisées après 5 jours, le milieu est remplacé par du milieu non supplémenté en SVF pour inhiber la prolifération cellulaire. Les images sont prises à 0h, 12h et 24h à température ambiante en utilisant un microscope inversé (EVOS AMEX1200, Life Technologies). L'aire entre les bords de la blessure est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

Cryolyse et co-immunoprécipitation

La cryolyse est une technique efficace pour conserver les complexes protéiques sans l'ajout d'agents pontant [388], qui peuvent interférer avec les études en spectrométrie de masse. Pour chaque co-immunoprécipitation, une flasque T150 de cellules confluentes a été utilisée. Les cellules sont trypsinées puis la réaction enzymatique est interrompue par l'ajout de milieu froid contenant 10% SVF. Les cellules sont ensuite lavées en PBS froid, puis centrifugées à 4°C 5min à 1200 tours/min. Le

culot cellulaire obtenu est resuspendu dans une solution maintenue à 4°C contenant 20mM d'HEPES à pH 7,5, 1,2% de polyvinilpyrrolidone et des inhibiteurs de protéases. La suspension cellulaire est ajoutée goutte à goutte dans de l'azote liquide. Les billes obtenues sont lysées mécaniquement à l'aide d'une bille d'acier et agitation au Tissue Lyser. Sept cycles de 2min à la fréquence de 30hertz sont nécessaires à l'obtention d'une cryopoudre. Entre chaque cycle, les portoirs et les échantillons sont refroidis dans l'azote liquide. Les protéines sont ensuite extraites à partir de la cryopoudre à l'aide d'un tampon non stringent (120mM NaCl, 20mM HEPES, 1mM EDTA, 5% glycérol, 1% Brij97, et inhibiteurs de protéases) sur une roue maintenue à 4°C pendant 30min. Les extraits sont ensuite centrifugés 5min à 10000 tours par minute à 4°C pour éliminer les débris cellulaires.

Les co-immunoprécipitations sont réalisées immédiatement après obtention des extraits cellulaires. Des billes magnétiques Dynabeads recouvertes de protéine A (Life Technologies, réf. 10001D) sont préalablement incubées avec l'anticorps immunoprécipitant (rotation pendant 1h à 4°C). Les billes couplées aux anticorps sont ensuite ajoutées aux extraits cellulaires puis incubées sous rotation à 4°C pendant 30min. Enfin, les complexes protéiques sont élués à l'aide d'un tampon contenant du LDS 2x et du DTT (Novex).

Mesure de la sécrétion de TGFβ1

$2 \cdot 10^4$ cellules sontensemencées en plaque 96 puits. La concentration du TGFβ1 est mesurée après 24h, 48h et 72h de culture à l'aide du kit Human TGF-beta 1 Quantikine ELISA (R&D systems). Les concentrations sont calculées selon la méthode de la courbe standard.

Test de viabilité cellulaire et IC50

Pour les tests de résistance au docetaxel après induction de l'EMT, les cellules ont été préalablement traitées en plaque 6 puits comme décrit précédemment. Les cellules sont ensuite trypsinées etensemencées en plaque 96 puits (5000 cellules sensibles et 10000 cellules résistantes). 24h aprèsensemencement, les cellules sont traitées avec une gamme de concentration de docetaxel. La viabilité cellulaire est déterminée 72h après traitement à l'aide du WST1 reagent (Roche) puis mesurée avec le système Victor X4 (Perkin Elmer). La viabilité cellulaire des cellules traitées au docetaxel a été comparée aux cellules non traitées pour calculer la fraction des cellules survivantes. L'IC50 est estimée à l'aide du logiciel Graphpad Prism. L'IC50 des cellules IGR-CaP1-R vivo a été obtenu selon le même protocole (5000 cellules parentales, 10000 cellules IGR-CaP1-R vivo).

Test de clonogénicité

1000 cellules IGR-CaP1 parentales et 2000 cellules IGR-CaP1-R sont ensemencées en plaque 6 puits. Après 24h, les cellules ont été traitées avec 25 μ M de LY2157299 ou avec le véhicule. 72h après le prétraitement, les cellules sont co-traitées avec le docetaxel (12nM pour les cellules sensibles, 100nM pour les cellules résistantes) et le LY2157299. Après 2 semaines de culture, les clones sont fixés et colorés au crystal violet (25% méthanol, 0.05% crystal violet). Les clones sont comptés à l'aide du logiciel ImageJ.

Test statistique

Le test de Student a été utilisé pour évaluer la significativité des résultats. Les astérisques représentent la puissance statistique des résultats : p <0,05 : * ; p <0,005 : ** ; p <0,0005 : ***.

Etablissement de modèle in vivo de cancer de la prostate résistant au docetaxel

Des souris athymiques Nude (NC-nu/nu) de 6 semaines ont été utilisées en accord avec les conditions européennes sur l'expérimentation animale. 1.10⁶ cellules IGR-CaP1/megix et 1.10⁷ cellules IGR-CaP1-R12, R25 et R50 resuspendue dans du PBS stérile ont été injectées en sous-cutané sur le flanc droit des souris sans anesthésie. 2.10⁶ cellules IGR-CaP1-R vivo ont été injectées en sous-cutanée sur le flanc droit des souris avec ajout de matrigel (Corning). La croissance tumorale est suivie par mesure du volume au pied à coulisse (Mitutoyo) ou par mesure de la bioluminescence. La bioluminescence est mesurée après injection de 2mg dans 100 μ l de luciférine (Promega) par voie intrapéritonéale. Après 15min d'incubation, la bioluminescence est quantifiée à l'aide du système Ivis® Lumina II (Caliper) en utilisant les paramètres d'acquisition suivants : Temps d'acquisition : 3 min ; Binning : Large ; Incidence : latérale).

Mise en culture de xénogreffes

Les xénogreffes issues des tumeurs résistantes au docetaxel (P5) ont été découpées en morceaux de 2mm³, puis placées dans des plaques 6 puits. Les tumeurs sont incubées à sec 1h à 37°C, 5% de CO₂, la déshydratation permettant aux explants d'adhérer au support, puis les tumeurs sont incubées en milieu RPMI 1640. L'expansion des cellules tumorales est suivie au microscope optique. Au moment du premier passage, les cellules épithéliales qui n'ont pas encore adhéré sont récupérées dans le surnageant 30 min après ensemencement. Ce processus permet d'enrichir la population des cellules

tumorales en éliminant les fibroblastes qui adhèrent rapidement au support plastique. Il est renouvelé deux fois. La contamination éventuelle des cellules tumorales par les cellules stromales est évaluée par cytométrie en flux selon les critères de taille et de granularité.

A)		B)					
Gène	Référence du test	Antigène	Hôte	Référence	dilution WB	dilution IF	dilution IP
CDH1	Hs01023894_m1	Calnexine	souris	Santa Cruz, Clone E-10, sc-46669		1/50	
CDH2	Hs00983056_m1	E-cadherine	souris	BD Biosciences, Clone 36, 610181	1/2000	1/1000	
EPCAM	Hs00158980_m1	EGFR	lapin	Cell Signaling, Clone D38B1, #4267			1/100
VIM	Hs00185584_m1	FLAG	souris	Sigma, M2, F3165- 2MG	1/1000	1/500	3µg
CD133	Hs01009261_m1	GSK-3β	souris	Cell Signaling, Clone 3D10, #9832	1/1000		
CD44	Hs01075861_m1	N-cadherine	souris	BD Biosciences, Clone 32, 610921	1/250	1/100	
ZEB1	Hs00232783_m1	occludine	souris	Life Technologies, Clone OC-3F10, 33-1500	1/500	1/200	3µg
SNAIL	Hs00195591_m1	Phospho-GSK3β (Ser9)	lapin	Cell Signaling, Clone 5B3, #9323	1/1000		
SHISA2	Hs01590823_m1	Phospho-GSK3β (Y216)	souris	BD Biosciences, Clone 13A, 612312	1/1000		
SHISA3	Hs01380806_m1	plakoglobin	souris	Sigma-Aldrich, Clone 15F11, P8087	1/1000	1/500	
SHISA4	Hs00411448_m1	SHISA3 (C-term)	lapin	Abgent, AP11797b	1/500	1/200	
SHISA5	Hs01579127_m1	SHISA3 custom (C-term)	lapin	anticorps polyclonal de lapin, obtenu après immunisation par le peptide FAYPLQEQPPLPGKSC	1/200	1/100	
SHISA6	Hs00416822_m1	Slug	lapin	Cell Signaling, Clone C19G7, #9585	1/250		
SHISA7	Hs00942185_s1	Snail	lapin	Cell Signaling, Clone C15D3, #3879	1/500		
SHISA8	Hs00962991_m1	TGFβRII	souris	Santa Cruz, Clone E-6, sc-17792			3µg
SHISA9	Hs00930416_m1	Twist	lapin	Cell Signaling, #4119	1/250		
GAPDH	4352934E	ubiquitine	souris	Santa Cruz, Clone P4D1, sc-8017	1/200		
		Vimentine	souris	BD Biosciences, Clone RV202, 550513	1/500		
		ZEB1	lapin	Cell Signaling, Clone D80D3, #3396	1/500	1/200	
		ZO-1	lapin	Cell Signaling, #5406	1/1000		
		ZO-1 (N-term)	lapin	Zymed, 40-2300		1/200	
		α-tubuline	souris	Santa Cruz, Clone TU-02, sc-8035		1/1000	
		β-actine	souris	Sigma-Aldrich, Clone AC-15, A5441	1/1000		
		β-catenine	souris	Santa Cruz, Clone 12F7, sc-59737	1/500	1/100	
		β-tubuline	souris	Sigma-Aldrich, Clone 2-28-33, T5293	1/1000	1/1000	

Tableau 5 : Liste des amorces et des anticorps utilisés. WB : western blot, IF : immunofluorescence, IP : immunoprécipitation

Résultats

Gène	numéro d'accension	description du gène	FC moyen
TFPI2	NM_006528	Tissue factor pathway inhibitor 2	34.6
RUNDC3B	NM_138290	RUN domain containing 3B, transcript variant 1	33.0
FAM110C	NM_001077710	Family with sequence similarity 110, member C	18.3
PURG	NM_013357	Purine-rich element binding protein G, transcript variant A	17.5
ABCB1	NM_000927	ATP-binding cassette, sub-family B, member 1	15.8
BIRC3	NM_001165	Baculoviral IAP repeat containing 3, transcript variant 1	14.4
CXCL2	NM_002089	Chemokine ligand 2	13.2
TNF	NM_000594	Tumor necrosis factor	10.9
MCTP1	NM_024717	Multiple C2 domains, transmembrane 1, transcript variant L	10.4
FAM111A	NM_022074	Family with sequence similarity 111, member A	9.1
OAS3	NM_006187	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	9.0
CDH16	NM_004062	Cadherin 16, KSP-cadherin, transcript variant 1	8.7
C2orf55	NM_207362	Chromosome 2 open reading frame 55	8.7
AKR1C1	NM_001353	Aldo-keto reductase family 1, member C1	8.3
ITGB8	NM_002214	Integrin, beta 8	8.0
---	THC2682885	Q6BEA3_RAT WDNM1 homolog, partial (33%)	8.0
GNG11	NM_004126	Guanine nucleotide binding protein, gamma 11	7.7
UBXN10	NM_152376	UBX domain protein 10	7.5
DCLK1	NM_004734	Doublecortin-like kinase 1, transcript variant 1	-7.6
OLR1	NM_002543	Oxidized low density lipoprotein receptor 1, transcript variant 1	-7.7
ZAR1	NM_175619	Zygote arrest 1	-8.5
GAL	NM_015973	Galanin prepropeptide	-8.6
CD44	NM_000610	CD44 molecule, transcript variant 1	-8.7
LHFP	NM_005780	Lipoma HMGIC fusion partner	-9.8
SOX9	NM_000346	SRY-box 9	-10.2
AK4	NM_001005353	Adenylate kinase 4, nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 5	-10.2
GJC1	NM_005497	Gap junction protein, gamma 1, 45kDa, transcript variant 1	-10.3
RXFP1	ENST00000448688	Relaxin/insulin-like family peptide receptor 1	-10.5
SHISA9	NM_001145205	Shisa homolog 9, transcript variant 2	-10.8
TM4SF1	NM_014220	Transmembrane 4L six family member 1	-10.9
THSD7A	NM_015204	Thrombospondin, type 1, domain containing 7A	-11.6
SLC16A10	NM_018593	Solute carrier family 16, member 10	-11.6
CGNL1	NM_032866	Cingulin-like 1, transcript variant 2	-11.9
SMPDL3A	NM_006714	Sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	-13.3
GALNT14	NM_024572	UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14	-13.4
PLAT	NM_000930	Plasminogen activator, tissue, transcript variant 1	-14.0
PDE1A	NM_001003683	Phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent, transcript variant 2	-15.5
SLC10A4	NM_152679	Solute carrier family 10, member 4	-16.0
CXCR4	NM_001008540	Chemokine receptor 4, transcript variant 1	-16.4
SMAD9	NM_001127217	SMAD family member 9, transcript variant a	-17.0
SLC39A8	NM_022154	Solute carrier family 39, member 8, transcript variant 1	-17.5
PLCXD3	NM_001005473	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3	-18.2
SLCIA3	NM_004172	Solute carrier family 1, member 3, transcript variant 1	-18.9
KANK4	NM_181712	KN motif and ankyrin repeat domains 4	-22.0
LPAR3	NM_012152	Lysophosphatidic acid receptor 3	-24.2
SLC16A12	NM_213606	Solute carrier family 16, member 12	-26.9
TMEM47	NM_031442	Transmembrane protein 47	-27.4
ITGA2	NM_002203	Integrin, alpha 2	-33.1
FAM198B	NM_016613	Family with sequence similarity 198, member B, transcript variant 2	-40.0
SHISA3	NM_001080505	Shisa homolog 3	-187.4

Tableau 6 : Signature des gènes de résistance au docetaxel de la lignée IGR-CaP1. Les gènes sont extraits de la signature 209 et représentent les gènes les plus fortement modifiés dans les cellules résistantes (FC>7,5 ; p value <10⁻¹⁰) [133].

Objectifs du projet de thèse

Les mécanismes de résistance à la chimiothérapie dans le CaP sont complexes et l'étude de ces mécanismes est techniquement difficile dans les tumeurs issues de patients. En effet, contrairement à de nombreux cancers, le CaP est caractérisé par le développement de microfoyers tumoraux. Les biopsies diagnostiques contiennent généralement très peu de matériel tumoral. De plus, le tropisme des cellules métastatiques pour l'os complexifie l'obtention de biopsies, celles-ci étant très douloureuses pour le patient. L'extraction de matériel biologique à partir des biopsies osseuses est peu fiable, la décalcification du tissu osseux pouvant dégrader les échantillons. Enfin, l'ablation de la prostate dans les stades précoces du traitement du cancer ne permet pas l'étude des mécanismes mis en place dans la résistance aux thérapies à partir de la tumeur. Il est donc nécessaire d'utiliser des modèles de CaP pour identifier et étudier les mécanismes impliqués dans la résistance à la chimiothérapie par docetaxel.

Des modèles cellulaires résistants au docetaxel ont donc été établis au laboratoire par pression pharmacologique à long terme sur quatre lignées de CaP. L'équipe a ainsi obtenu deux lignées androgéno-indépendantes et 2 lignées androgéno-dépendantes résistantes au docetaxel. Les lignées IGR-CaP1-R, PC3-R, LNCaP-R et 22RV1-R sont respectivement résistantes à 100nM de docetaxel, 12nM, 12nM et 100nM. De manière intéressante, les modèles IGR-CaP1 et 22RV1 sont capables d'acquérir une résistance à de très fortes doses de docetaxel (supérieures à 1mM pour les IGR-CaP1-R, et plus de 200nM pour les 22RV1-R). Des analyses transcriptomiques ont été réalisées sur les clones résistants au docetaxel en comparaison avec les lignées parentales sensibles respectives. Trois signatures de résistance au docetaxel ont été établies (Fold change >2 ; pvalue <10⁻¹⁰). L'expression de 209 gènes est significativement modifiée dans les cellules IGR-CaP1-R, 459 gènes dans les cellules PC3-R, et 856 gènes dans les cellules LNCaP-R. La signature de 209 gènes obtenue dans le modèle IGR-CaP1-R a récemment été publiée par l'équipe (tableau 6) [133]. Le modèle 22RV1-R, obtenu plus tardivement, n'a pas fait l'objet de telles analyses. Les miRs potentiellement impliqués dans la résistance à la chimiothérapie du modèle IGR-CaP1 ont initialement été identifiés par micro-array. Une signature de 65 miRs différentiellement exprimés entre la lignée IGR-CaP1 résistante au docetaxel et la lignée parentale a ainsi été obtenue (FC>1,75 ; pvalue <0,1).

L'objectif de mon travail de thèse était de sélectionner de nouvelles cibles thérapeutiques en s'appuyant sur les résultats des analyses micro-array de gènes et de miRs obtenus par le laboratoire, puis d'étudier le mécanisme d'action de ces cibles dans les modèles cellulaires résistants au docetaxel établis au laboratoire. Le second objectif de ma thèse fut d'établir un modèle *in vivo* de CaP résistant au docetaxel qui permettrait d'étudier l'effet du ciblage de ces cibles *in vivo* et constitueraient les preuves de nos concepts.

Résultats I

Identification de nouvelles cibles dans le cancer de la prostate résistant au docetaxel par intégration de données de criblage

L'identification de nouvelles cibles d'intérêt nécessite l'utilisation de technique de criblage haut-débit. Les micro-array ont permis au laboratoire d'établir des signatures de gènes de résistance au docetaxel dans les modèles cellulaires IGR-CaP1 et PC3. Cependant, le grand nombre de gènes identifiés ne permettait pas la sélection précise de nouvelles cibles. Les miRs ayant montré un rôle important dans la résistance au docetaxel, nous avons entrepris d'étudier leur expression dans les modèles cellulaires résistants établis au laboratoire. L'intégration des données issues des deux techniques de criblage devrait permettre une sélection robuste des nouveaux candidats.

1. Etablissement des profils d'expression différentiels des miRs entre les cellules parentales et les cellules résistantes au docetaxel

1.1. Détermination des contrôles endogènes

La détermination précise de l'expression des miRs requiert une normalisation robuste des données, l'identification de miRs de référence est donc essentielle. Il a été montré entre des tissus sains et tumoraux de poumon que l'expression des miR-191 et miR-103 est mieux conservée que les gènes de ménage généralement utilisés comme l'ARN ribosomique 5S ou l'ARN nucléaire U6 (RNU6B) [389]. Il est donc nécessaire d'identifier, dans le système étudié, les miRs ou autres petits ARN dont l'expression reste inchangée entre les différentes conditions expérimentales. Enfin, il est important d'utiliser des contrôles ayant des niveaux d'expression différents, ce qui permet une normalisation plus précise quelque soit le niveau d'expression des miRs.

IGR-CaP1				PC3			
microRNA	FC VS RNU6B	FC VS miR-24	FC moyen	microRNA	FC VS RNU6B	FC VS miR-24	FC moyen
miR-31	44,5	46,2	45,3	miR-9	12772,6	13178,4	12975,5 *
miR-181a	8,3	8,6	8,4	miR-486-5p	94,2	59,7	77,0
miR-145	6,1	6,6	6,3	miR-140-3p	12,8	14,4	13,6
miR-143	4,2	4,3	4,3	miR-146a	9,8	6,7	8,2
miR-10b	4,0	3,9	4,0	miR-455-5p	8,3	5,7	7,0
miR-628-5p	3,4	3,5	3,4	miR-361-5p	7,3	5,1	6,2
miR-218	3,3	3,3	3,3	miR-491-5p	6,9	4,4	5,7
miR-194	3,0	3,0	3,0	miR-140-5p	6,4	4,9	5,7
miR-95	2,9	2,9	2,9	miR-494	4,5	3,1	3,8
miR-139	2,7	2,7	2,7	miR-210	3,9	3,6	3,8
miR-532	2,5	2,6	2,5	miR-625	3,5	3,8	3,7
miR-140	2,5	2,5	2,5	miR-218	3,5	2,7	3,1
miR-449a	2,5	2,5	2,5	miR-132	3,7	2,4	3,1
miR-660	2,2	2,2	2,2	miR-31	3,3	2,8	3,1
miR-574-3p	2,1	2,0	2,1	miR-320	3,5	2,5	3,0
miR-20a	-2,1	-2,0	-2,0	miR-146b-5p	3,5	2,5	3,0
let-7b	-2,2	-2,1	-2,1	miR-26a	2,8	2,1	2,4
miR-141	-2,2	-2,3	-2,2	miR-21	2,5	2,2	2,4
miR-190	-2,5	-2,4	-2,4	miR-628-5p	2,5	2,1	2,3
miR-494	-2,6	-2,5	-2,6	miR-181a	2,4	2,1	2,3
miR-302b	-2,6	-2,6	-2,6	miR-130a	2,7	1,7	2,2
miR-302a	-2,8	-2,8	-2,8	let-7b	2,6	1,8	2,2
miR-331-5p	-2,9	-2,8	-2,8	miR-374b	2,5	1,7	2,1
miR-135a	-3,0	-3,1	-3,0	miR-574-3p	2,4	1,9	2,1
miR-200c	-3,1	-3,3	-3,2	miR-195	2,5	1,7	2,1
miR-367	-4,0	-4,1	-4,0	miR-125b	2,0	2,1	2,1
				miR-340	2,5	1,7	2,1
				miR-95	2,2	1,8	2,0
				miR-182	2,4	1,7	2,0
				miR-15b	-1,9	-2,2	-2,0
				miR-18a	-2,4	-3,4	-2,9
				miR-301a	-2,7	-3,6	-3,1
				miR-139-5p	-3,6	-5,5	-4,6
				miR-148a	-4,5	-6,6	-5,6
				miR-152	-8,0	-8,8	-8,4
				miR-335	-9,1	-13,2	-11,1
				miR-133a	-9,4	-13,7	-11,6
				miR-135b	-9,7	-13,8	-11,7
				miR-126	-18,8	-22,3	-20,5
				miR-365	-18,9	-29,8	-24,3
				miR-203	-185,9	-269,6	-227,7
				miR-375	-2956,2	-2865,2	-2910,7 *
				miR-205	-6037,3	-5757,8	-5897,6 *
				miR-200a	-7747,3	-7508,7	-7628,0 *
				miR-200b	-9770,0	-12059,2	-10914,6 *
				miR-429	-14591,5	-14142,2	-14366,8 *

LNCaP			
microRNA	FC VS RNU6B	FC VS miR-24	FC moyen
miR-486-5p	2641,3	1911,4	2276,3 *
miR-139-5p	38,9	29,3	34,1
miR-618	5,1	4,2	4,6
miR-34a	2,7	2,2	2,5
miR-221	2,4	2,0	2,2
miR-660	2,5	1,8	2,2
miR-222	1,9	2,2	2,1
miR-138	-2,3	-3,0	-2,6
miR-9	-4,1	-5,1	-4,6
miR-196b	-8,3	-10,2	-9,3
miR-598	-1699,8	-2085,2	-1892,5 *

Tableau 7 : Profils d'expression différentielle des miRs dans les trois modèles de CaP résistants au docetaxel. Les valeurs représentent les FC obtenus en normalisant par les contrôles miR-24 et RNU6B. Les valeurs des Δ Ct de chaque triplicat ont été obtenues par une analyse bioinformatique tridimensionnelle des données expérimentales. Les miRs ayant des valeurs de Ct>32 ont été éliminés de l'analyse. Les astérisques identifient les miRs non exprimés dans une des conditions (lignée sensible ou résistante). Dans ce cas, la valeur de Ct de 40 a été attribuée pour le calcul des FC. Les miRs colorés en jaune sont surexprimés dans les cellules résistantes et les miRs colorés en bleu sont sous-exprimés.

IGR-CaP1		
microRNA	FC TLDA	FC micro-array
miR-181a	8,4	6,0
miR-145	6,3	2,5
miR-10b	4,0	1,87
miR-20a	-2,0	-2,02
miR-141	-2,2	-2,1
miR-302b	-2,6	-1,9
miR-302a	-2,8	-2,9
miR-200c	-3,2	-2,7

Tableau 8 : Validation des candidats de micro-array par PCR quantitative. Comparaison des profils d'expression de miRs obtenus par micro-array et TLDA. Les miRs colorés en jaune sont surexprimés dans les cellules résistantes et les miRs colorés en bleu sont sous-exprimés.

La stratégie d'identification des miRs contrôles que nous avons employée est similaire à celle récemment décrite par Tonge *et al.*[390]. L'expression globale des miRs préalablement obtenue par micro-array miR Agilent a permis d'identifier les miRs de ménages potentiels miR-1274b, miR-720 et miR-24, sur la base de leur expression entre les clones IGR-CaP1 résistants au docetaxel et la lignée parentale ($\leq 15\%$ de variation entre les différentes conditions). L'étude de l'expression de ces miRs et des contrôles endogènes utilisés classiquement a été réalisée par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Nous avons observé que l'expression de RNU6B et miR-24 ne varie pas entre les différentes conditions (figure 20). Ces contrôles sont particulièrement intéressants du fait de leur différentiel d'expression (Ct entre 28 et 30 pour RNU6B, Ct entre 22 et 26 pour miR-24).

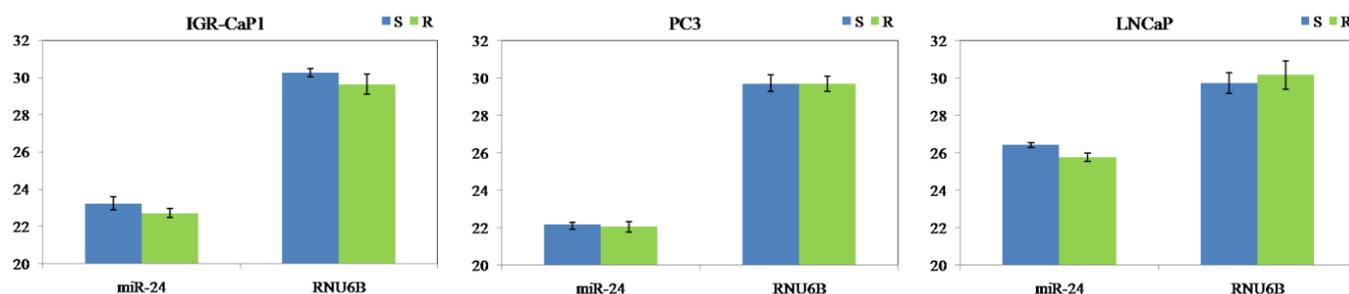


Figure 20 : Validation des contrôles endogènes. L'expression a été évaluée par RT-qPCR dans les lignées IGR-CaP1, PC3 et LNCaP sensibles et résistantes au docetaxel. Les valeurs représentent la moyenne Ct obtenus dans des triplicats biologiques.

1.2. Profils d'expression des miRs potentiellement impliqués dans la résistance

Les Taqman Low Density Array (TLDA) ont été utilisées afin de valider les hits de la signature micro-array. Cette technologie utilise la RT-qPCR pour mesurer l'expression de 377 miRs à partir d'un seul échantillon, ce qui permet une validation rapide, précise et fiable de la majorité des hits (56 des 66 miRs de la signature sont présents sur la carte). Les études ont été réalisées sur des triplicats biologiques de cellules IGR-CaP1, PC3 et LNCaP sensibles et résistantes au docetaxel.

L'analyse bioinformatique des cartes TLDA a permis d'obtenir les profils d'expression des miRs dérégulés dans les lignées résistantes au docetaxel IGR-CaP1, PC3 et LNCaP. Trois signatures ont été établies ($FC > 2$), comprenant 25 miRs pour la lignée IGR-CaP1, 45 miRs pour les PC3 et 10 pour les LNCaP (tableau 7). De façon surprenante, nous n'avons identifié dans cette approche que 8 des 65 miRs préalablement identifiés par micro-array (tableau 8). Nous avons considéré la détermination par RT-qPCR plus robuste et quantitative que l'approche transcriptomique. La lignée LNCaP partage peu de miRs avec les autres lignées : miR-486-5p est fortement surexprimé dans les lignées LNCaP-R et PC3-R, le miR-660 est également exprimé dans la lignée IGR-CaP1-R mais à un FC proche du seuil de non significativité ($FC = 2,2$). Les signatures IGR-CaP1 et PC3 présentent plus de miRs communs. On observe que plusieurs miRs impliqués dans la résistance aux taxanes sont

dérégulés dans les cellules résistantes, notamment les miR de la famille miR-200 (comprenant miR-141, miR-429 et les miR-200a/b/c) et le miR-145 qui sont associés à la résistance au paclitaxel [391][392] et miR-20a dont l'expression est associée à la réponse au docetaxel chez les patients CRPC [393]. Dans les signatures IGR-CaP1 et PC3, on observe la surexpression de miR-181a, miR-628-5p, miR-218, miR-95, miR-574-3p et miR-31. Ce dernier est particulièrement intéressant puisqu'il est associé, en partenariat avec le cluster miR-141/200c, à la régulation de l'EMT et à la progression métastatique [394].

2. Identification de l'EMT dans le mécanisme de résistance au docetaxel

2.1. Intégration des données issues des signatures de gènes et de miRs

La famille des miR-200, fortement sous-exprimée dans les modèles résistants, est un acteur critique de l'EMT suggérant que ce processus est impliqué dans la résistance au docetaxel dans les lignées étudiées. Ce processus est associé à la résistance aux taxanes et à d'autres chimiothérapies. Tous les miRs impliqués dans l'EMT décrits dans la littérature ont été recherchés dans nos signatures. L'étude bibliographique des différents miRs de nos signatures montrent que la régulation de l'expression des miRs correspond à l'induction et au maintien d'un phénotype mésenchymateux dans les trois lignées résistantes (tableau 9A).

A)

microARN	données littérature	données expérimentales	cible dans l'EMT
miR-210		PC3	
miR-10b		IGR-CaP1	
miR-125b		PC3	
miR-146a		PC3	zeb1
miR-146b-5p		PC3	
miR-200a		PC3	
miR-200b		PC3	zeb1
miR-21		PC3	
miR-221		LNCaP	pten
miR-222		LNCaP	trps1
miR-26a		PC3	HMGA2
miR-31		IGR-CaP1 PC3	satb2
miR-361-5p		PC3	
miR-9		PC3 LNCaP	
hsa-let-7b		PC3 IGR-CaP1	
miR-132		PC3	zeb2
miR-138		LNCaP	vim et zeb2
miR-141		IGR-CaP1	zeb1
miR-143		IGR-CaP1	
miR-145		IGR-CaP1	
miR-148a		PC3	MET et snail
miR-15b		PC3	
miR-181a		IGR-CaP1 PC3	twist
miR-194		IGR-CaP1	BMI-1
miR-200c		IGR-CaP1	zeb1
miR-203		PC3	slug
miR-205		PC3	
miR-218		IGR-CaP1 PC3	
miR-34a		LNCaP	
miR-375		PC3	shox2
miR-429		PC3	

B)

Lignée cellulaire	Gènes surexprimés	Gènes sous exprimés
IGR-CaP1 R VS S	SRGN, LOX, IGFBP3, COL5A1, VCAN, TPM1	TPD52L1, ADRB2, PKP2, S100P
PC3 R VS S	LOX, SPOCK1, SYNE1, FGFR1, COL5A1	S100P, CXADR, ZNF165, TMEM30B, CXCL16, CDS1, KLK10, GJB3, SLPI, SMPDL3B, LSR, MAP7, CD24, BIK, OCLN, SYK, EPHA1, LAD1, MPZL2, FXYP3, OVOL2, CDH1, EPCAM
LNCaP R VS S	SPOCK1, RGS4	ANK3, TPD52L1, S100P

Tableau 9 : Intégration des données issues des analyses d'expression de gènes et de miRs. Le tableau A représente l'expression des miRs lors de l'EMT (données issues de la littérature) et l'expression observée dans nos lignées résistantes. La couleur orange représente une surexpression et le bleu une sous-expression. Le tableau B indique les gènes impliqués dans l'EMT retrouvés dans les 3 lignées résistantes au docetaxel.

De plus, les profils d'expression différentielle de gènes préalablement obtenus par le laboratoire ([133] et données non publiées) ont été comparés à une signature correspondant à la méta-analyse des gènes de l'EMT [395], dans laquelle l'expression des gènes a été étudiée après traitement au TGF β sur de multiples modèles cellulaires. Treize des 130 gènes décrits sont retrouvés dans la signature de gènes de résistance au docetaxel de la lignée IGR-CaP1, 31 dans la signature PC3 et 11 dans la signature LNCaP. De manière générale, les gènes identifiés dans les signatures IGR-CaP1 et PC3 sont exprimés de manière identique à la signature d'EMT de référence (en terme de sur ou sous-expression), suggérant que les lignées IGR-CaP1-R et PC3-R expriment les gènes du phénotype mésenchymateux. Concernant le modèle LNCaP, seuls 5 gènes sur les 11 identifiés sont régulés de façon adéquate. Des études complémentaires seront nécessaires pour conclure sur le phénotype des cellules LNCaP-R. Le détail des gènes modulés de manière identique à la signature d'EMT proposée par Groger *et al.* est représenté dans le tableau 9B.

2.2. Morphologie des cellules résistantes

L'intégration des analyses haut-débit obtenues sur les modèles IGR-CaP1-R, PC3-R et LNCaP-R suggère que les cellules réalisent une EMT pour résister au docetaxel. Les cellules mésenchymateuses sont caractérisées par la perte de jonctions cellulaires ainsi que l'acquisition d'une morphologie de type fibroblastique importante pour la migration cellulaire. Comme on peut le voir dans la figure 21, ce changement morphologique est particulièrement visible dans les cellules PC3-R en comparaison à la lignée parentale. Les cellules PC3-R sont individualisées et présentent un phénotype fibroblastique caractéristique. Au contraire, les cellules LNCaP-R prolifèrent en amas cellulaires et semblent moins fusiformes que les cellules parentales, ces résultats étant cohérents avec ceux obtenus sur l'expression des gènes dans cette lignée. Enfin, le modèle IGR-CaP1-R ne semble pas morphologiquement différent de la lignée parentale, l'augmentation de la taille des cellules constitue la seule différence observable entre les deux lignées.

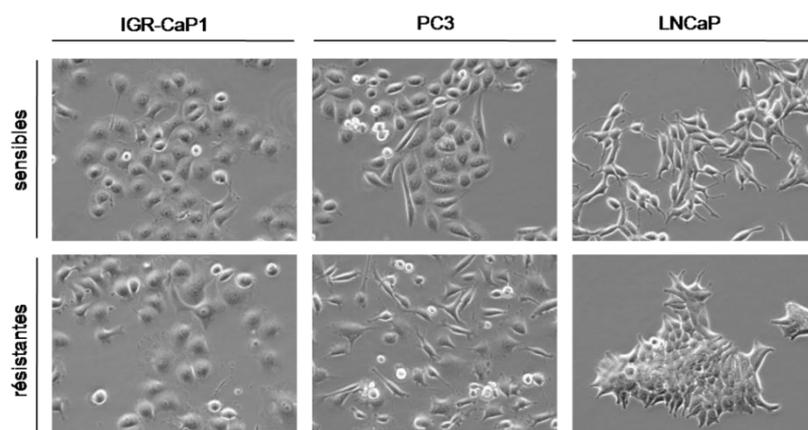


Figure 21 : Morphologie des cellules résistantes au docetaxel comparée aux cellules parentales. Les photos ont été prises en contraste de phase au grossissement 40X .

2.3. Le rôle du cluster miR-141/200 dans l'EMT des cellules IGR-CaP1-R

MiR141/200c est l'un des clusters le plus sous-exprimé dans les lignées IGR-CaP1-R et PC3-R. Il a été montré que ce cluster régule l'expression de ZEB1, un des facteurs de transcription essentiel de l'EMT dans les cellules de cancer du sein et du cancer colorectal [368], [396]. Une expérience préliminaire a permis de montrer que les lignées PC3 et LNCaP parentales n'expriment que très peu ZEB1 par rapport à la lignée IGR-CaP1 (figure 22A). De plus, on observe une augmentation de l'expression du facteur ZEB1 dans la lignée résistante IGR-CaP1-R, suggérant que ces cellules réalisent effectivement une EMT. Les cellules IGR-CaP1 sensibles et résistantes ont donc été utilisées pour valider l'effet fonctionnel du cluster miR141/200c sur l'expression de ZEB1. Après transfection transitoire du cluster miR-141/200c, nous observons une diminution de l'expression de ZEB1 dans les deux lignées (figure22B). Ces données suggèrent que la sous-expression du cluster miR141/200c observée dans les cellules résistantes au docetaxel est responsable de la levée d'inhibition de ZEB1, et pourrait entraîner l'induction de l'EMT.

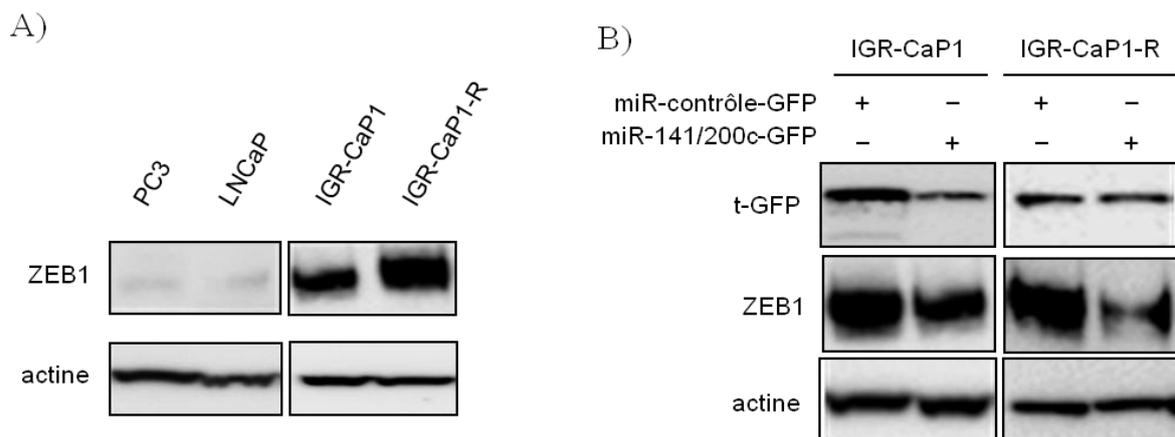


Figure 22 : Régulation de l'expression de ZEB1 par le cluster miR-141/200c. L'expression des protéines a été étudiée par western blot, l'actine est utilisée en tant que témoin de charge. L'expression de ZEB1 a été mesurée dans les lignées PC3, LNCaP et IGR-CaP1 (A). (B) Expression ectopique du cluster miR-141/200c dans les lignées IGR-CaP1 sensibles et résistantes au docetaxel. La GFP, exprimée par les vecteurs d'expression, est utilisée comme témoin de transfection.

3. Discussion

Les études génomiques haut-débit dans nos 3 modèles cellulaires de CaP résistants au docetaxel ont permis d'obtenir des signatures robustes de gènes potentiellement impliqués dans la résistance. Ces données ont été complétées par l'établissement d'une signature d'expression des miRs dans le modèle IGR-CaP1. Le premier objectif de ma thèse a consisté à obtenir les profils d'expressions des miRs dans ces trois lignées afin de pouvoir intégrer ces données aux profils d'expression de gènes et permettre d'identifier une nouvelle cible impliquée dans la résistance au docetaxel. L'utilisation des cartes TLDA a permis de pointer les limites de la technologie des micro-arrays dans l'étude des miRs, puisque seuls 8 miRs sur 65 ont été validés. Ce différentiel entre les deux techniques pourrait s'expliquer par le fait que les lignées cellulaires expriment moins de miRs que les tissus. Il semblerait que les micro-arrays, basées sur l'hybridation des miRs, soient peu sensibles dans la détection de miRs faiblement exprimés contrairement à la PCR quantitative, pour laquelle le matériel biologique est soumis à des cycles d'amplification [397]. Les profils d'expression obtenus par TLDA ont donc été considérés comme des signatures de miRs plus fiables.

L'étude des signatures TLDA a permis l'identification de plusieurs miRs dérégulés dans les cellules résistantes, notamment la sous-expression du cluster miR-141/200c. Ce cluster est essentiel à l'EMT via son action régulatrice sur ZEB1. De manière intéressante, une grande majorité des miRs identifiés dans les signatures de résistance au docetaxel ont été associées à l'EMT très récemment. MiR-10b par exemple, est essentiel pour la formation de métastases osseuses induites par la surexpression de TWIST dans le cancer du sein [398]. MiR-148a, quant à lui, inhibe l'EMT en ciblant l'expression du récepteur c-Met [399]. Le miR le plus surexprimé dans les cellules IGR-CaP1-R, miR-31, a récemment été impliqué dans l'induction de l'EMT dans les cellules de cancer colorectal [400]. Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus dans le cancer du sein puisque l'expression de miR-31 est inversement corrélée aux risque de développer des métastases [369]. Cependant, il a récemment été montré que la signalisation du AR régule négativement miR-31, probablement via la méthylation du promoteur du gène codant pour ce miR [401]. Il est possible que dans les lignées IGR-CaP1-R et PC3-R n'exprimant pas le AR, miR-31 ne soit pas réprimé, ce qui pourrait entraîner sa surexpression et son rôle dans l'EMT de ces lignées.

L'intégration des données d'expression de gènes et de miRs a permis l'identification d'un axe de régulation de l'EMT dans les cellules de CaP résistantes au docetaxel qui implique le cluster miR-141/200c et sa cible, le facteur de transcription mésenchymateux ZEB1. Ces résultats ont fait l'objet d'une présentation par poster au congrès international de l'American Association for Cancer Research en 2012 (Abstract [402]). La même année, le groupe de Z. Culig a montré que miR-200c était sous-exprimé dans les lignées PC3 et DU145 résistantes au docetaxel présentant des caractéristiques

mésenchymateuses. L'inhibition de l'expression de ce miR dans les lignées parentales induit une EMT et l'augmentation de leurs capacités invasives [386]. La publication de ces résultats nous a amené à orienter notre étude du rôle de l'EMT dans la résistance au docetaxel des cellules de CaP en dehors du contexte des miRs.

Résultats II

Dissection du mécanisme d'EMT induit dans les cellules de cancer de la prostate résistantes au docetaxel

1. Caractérisation de l'EMT dans les modèles cellulaires résistants au docetaxel

Afin de caractériser le phénotype mésenchymateux associé à la résistance au docetaxel, nous avons étudié quatre lignées résistantes développées au laboratoire : les cellules IGR-CaP1-R, PC3-R et LNCaP-R décrites précédemment, ainsi que la lignée 22RV1-R.

1.1. Expression des marqueurs d'EMT dans les cellules résistantes au docetaxel

L'expression de gènes marqueurs d'EMT entre les lignées résistantes au docetaxel et les lignées parentales a été évaluée par PCR quantitative. Comme on peut le voir sur la figure 23, une diminution de l'expression du gène *CDH1*, codant pour l'E-cadhérine, est observée dans les quatre modèles cellulaires résistants au docetaxel. Cette diminution est corrélée à la baisse d'expression d'*EPCAM*, excepté pour LNCaP-R, suggérant que les quatre modèles résistants au docetaxel ont perdu leurs caractéristiques épithéliales. L'expression des marqueurs mésenchymateux a été évaluée en mesurant l'expression de *VIM* et de *CDH2*, codant respectivement pour la Vimentine et la N-cadhérine. *VIM* est surexprimé dans les modèles IGR-CaP-R, PC3-R et LNCaP-R alors qu'elle est sous-exprimée dans la lignée 22RV1-R. La balance d'expression entre *CDH1* et *CDH2* n'est observée que dans le modèle PC3-R. On remarque néanmoins que les cellules 22RV1-R surexpriment le gène *CDH2* alors que son expression n'est pas détectée dans les lignées IGR-CaP1-R et LNCaP-R. Ces résultats suggèrent que les lignées résistantes ont un phénotype mixte, excepté les cellules PC3-R qui présentent les caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

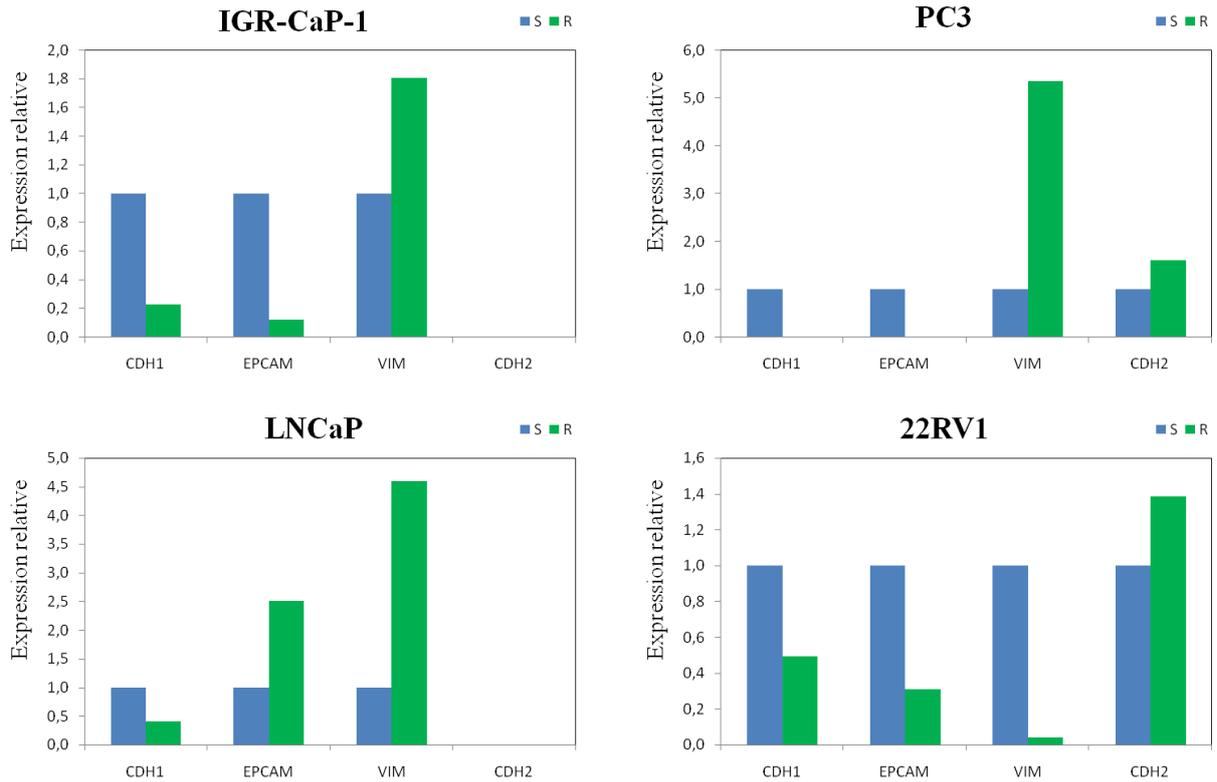


Figure 23 : Expression des gènes spécifiques de l'EMT dans les lignées sensibles et résistantes au docetaxel. Les données sont représentées comme un rapport d'expression entre les lignées résistantes et sensibles.

Afin de valider les résultats d'expression de gène, l'expression protéique de l'E-cadhérine et de la Vimentine a été analysée dans les quatre modèles cellulaires par western blot. La diminution d'expression du marqueur épithélial n'a été observée que dans les cellules IGR-CaP-R et PC3-R (figure 24). De plus, seuls ces modèles présentent une augmentation de l'expression de la Vimentine. Ces résultats montrent que seuls les modèles résistants androgéno-indépendants ont réalisé une EMT.

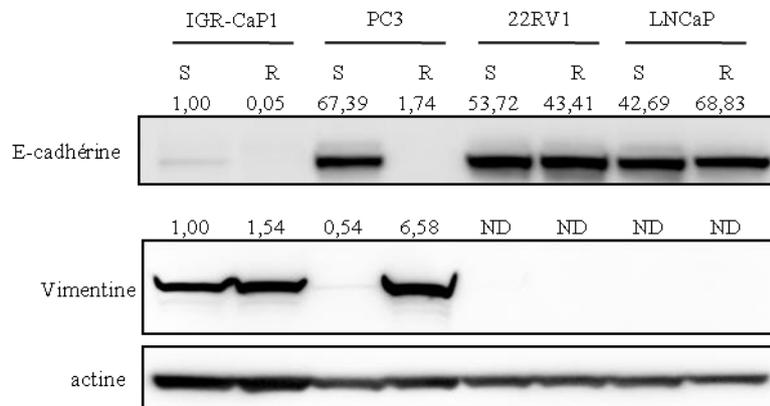


Figure 24 : Expression des marqueurs d'EMT dans les lignées sensibles et résistantes au docetaxel. L'actine sert de témoin de charge. Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ.

1.2. Expression des marqueurs de CSC dans les cellules résistantes au docetaxel

Afin d'étudier le caractère souche de nos lignées résistantes au docetaxel, l'expression des gènes *CD44* et *CD133* a été mesurée. Une surexpression de *CD44* a été observée dans les lignées IGR-CaP1-R, PC3-R et 22RV1-R (figure 25). Cependant, l'autre marqueur de CSC *CD133* semble sous-exprimé dans les deux lignées androgéno-indépendantes et n'est pas détecté dans les lignées 22RV1 et LNCaP.

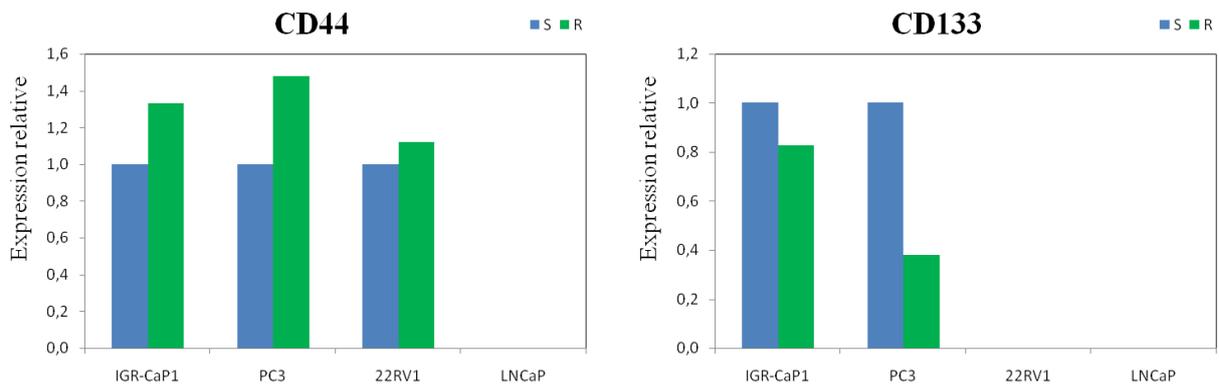


Figure 25 : Expression des gènes de CSC dans les lignées sensibles et résistantes au docetaxel. Les données sont représentées comme un rapport d'expression entre les lignées résistantes et sensibles.

Afin de confirmer ce résultat, une analyse de l'expression protéique de CD44 et CD133 a été réalisée par cytométrie en flux. De manière intéressante, l'expression du marqueur CD44 permet de distinguer deux populations dans les cellules PC3 parentales, une population qui n'exprime pas le marqueur et l'autre qui l'exprime (figure 26). Le même phénomène est observé dans les cellules IGR-CaP1 sensibles mais avec le marqueur CD133. Nous pouvons remarquer que dans les lignées résistantes respectives, seule subsiste la population exprimant les marqueurs de CSC. Ces résultats suggèrent que lors de l'établissement des lignées résistantes, les cellules exprimant les marqueurs de CSC ont été sélectionnées (CD44 pour les PC3 et CD133 pour les cellules IGR-CaP1). Ces données confirment les résultats précédemment obtenus au laboratoire qui montraient que les clones issus des cellules parentales présentant une forte expression de CD44 et CD133 étaient plus résistants au docetaxel ([13] et données non publiées).

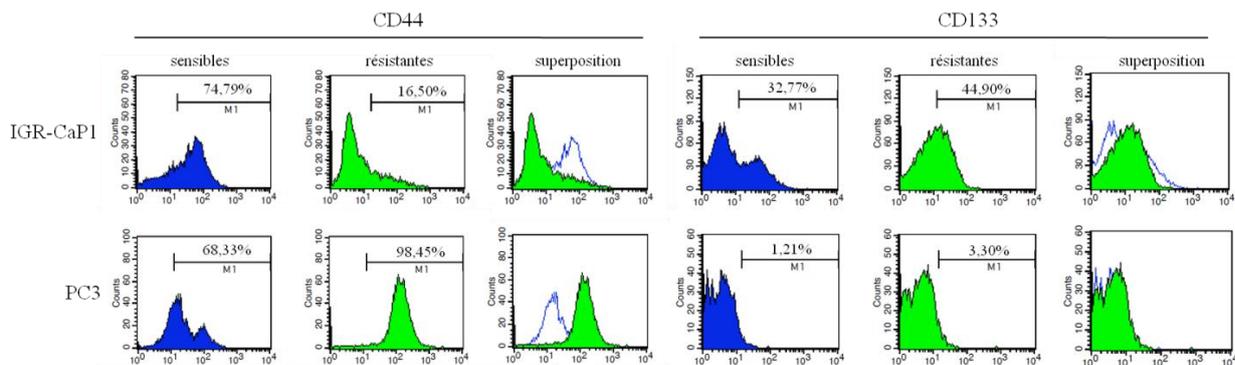


Figure 26 : Expression des marqueurs CSC. La quantité de CD44 et CD133 a été quantifiée par cytométrie en flux. Les marqueurs sont placés en fonction du signal obtenu avec une immunoglobuline contrôle (valeur du contrôle 1%).

1.3. Nature des jonctions cellulaires dans les modèles résistants au docetaxel

Les cellules résistantes issues des lignées androgéno-dépendantes ne présentent pas le phénotype méenchymateux ou cellule souche attendus, ce qui confirme les résultats de morphologie observés avec les cellules LNCaP. Ces résultats suggèrent que ces cellules ont développé d'autres mécanismes de résistance au docetaxel. Dans ce travail de thèse, nous poursuivrons notre investigation des mécanismes de l'EMT dans les modèles IGR-CaP1 et PC3.

1.3.1. Jonctions serrées

Comme décrit dans l'introduction, la perte des jonctions serrées est un événement précoce et caractéristique de l'EMT. Deux marqueurs ont été utilisés pour étudier les jonctions serrées dans nos modèles cellulaires, l'occludine et ZO-1. Une diminution de l'expression de l'occludine est observée dans les deux modèles cellulaires résistants (figure 27A). Dans les cellules PC3-R, cette diminution est associée à la sous-expression de ZO-1. L'observation de la localisation cellulaire de l'occludine permet de valider ces résultats dans les deux lignées (figure 27B). De manière intéressante, on peut observer que la localisation cellulaire de l'occludine diffère entre les deux modèles parentaux, les cellules IGR-CaP1 exprimant la protéine sur l'ensemble de la membrane plasmique alors que la protéine semble concentrée dans certaines zones de contact pour les cellules PC3. Ces résultats suggèrent que les cellules résistantes au docetaxel ne forment plus de jonctions serrées.

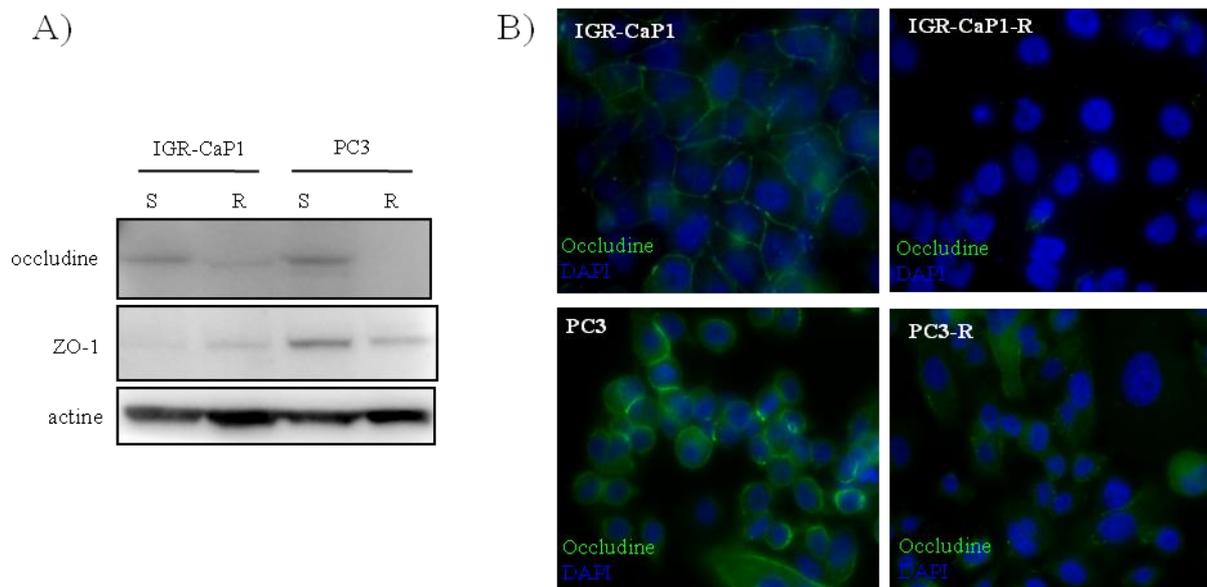


Figure 27 : Expression des marqueurs de jonctions serrées dans les modèles résistants au docetaxel. Détection par western blot des protéines de jonctions serrées dans les lysats cellulaires totaux, l'actine est utilisée comme témoin de charge (A). Localisation cellulaire de l'occludine par immunofluorescence. Les images ont été prises à l'objectif 63x avec les mêmes réglages (B).

1.3.2. Jonctions adhérentes et desmosomes

L'EMT est caractérisée par la perte des jonctions adhérentes et des desmosomes. La perte de ces jonctions d'ancrage permet le détachement des cellules de la membrane basale et leur migration. La balance entre l'E-cadhérine et la N-cadhérine est observée dans les deux modèles cellulaires résistants au docetaxel (figure 28A). La balance des cadhérines est associée à une diminution de l'expression de la plakoglobine, un constituant des desmosomes (figure 28B).

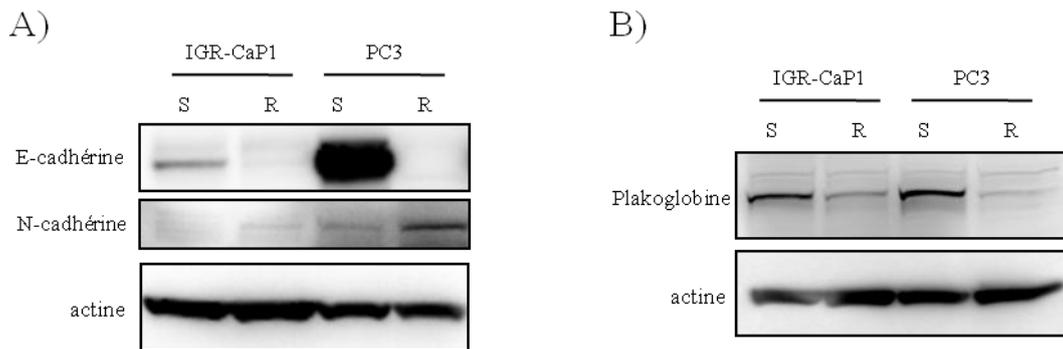


Figure 28 : Expression des protéines de jonctions adhérentes et des desmosomes. Détection par western blot des protéines des cadhérines (A) et de la plakoglobine (B) dans les lysats cellulaires totaux, l'actine est utilisée comme témoin de charge.

L'étude de la localisation cellulaire de ces protéines par immunofluorescence a permis de valider ces résultats dans les deux lignées, seule l'expression de la N-cadhérine dans la lignée IGR-CaP1-R n'est pas détectée (figure 29). De manière intéressante, aucune baisse significative de l'intensité de fluorescence de l'E-cadhérine n'est visible entre les cellules IGR-CaP1 et IGR-CaP1-R. La différence observée se faisant au niveau de la localisation intracellulaire de la protéine. En effet, l'E-cadhérine est localisée au niveau des jonctions cellulaires dans les cellules parentales alors qu'elle est exprimée au niveau périnucléaire dans les cellules résistantes.

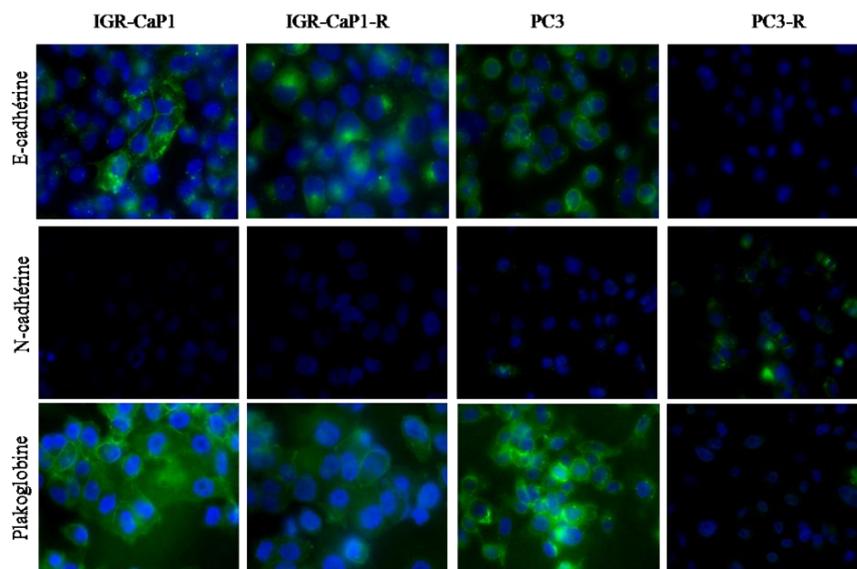


Figure 29 : Localisation cellulaire des protéines de jonctions adhérentes et du desmosome. Les protéines d'intérêts sont marquées en vert, les noyaux en bleu (DAPI).

1.4. Expression des facteurs de transcriptions de l'EMT

L'expression des EMT-TF a été étudiée dans les lignées résistantes et sensibles au docetaxel. On observe une surexpression de la protéine ZEB1 dans les deux lignées résistantes (figure 30A). De manière intéressante, la lignée IGR-CaP1 sensible exprime ZEB1 au niveau basal. Ce résultat, en plus de l'expression de la Vimentine observée précédemment, suggère que la lignée IGR-CaP1 parentale possède un phénotype mixte. La surexpression de ZEB1 a été validée en immunofluorescence dans la lignée PC3-R, où on observe un fort marquage nucléaire de ZEB1 (figure 30B). Cependant, l'imagerie par immunofluorescence ne permet pas d'observer de différence de signal entre la lignée IGR-CaP1-R et la lignée parentale. SNAIL et SLUG sont également surexprimés mais uniquement dans le modèle IGR-CaP1. Aucun changement de l'expression de TWIST n'est observé dans les lignées résistantes, on remarque cependant que les cellules parentales expriment ce EMT-TF au niveau basal. L'étude de l'expression des gènes *ZEB1* et *SNAIL* par RT-qPCR confirme les résultats obtenus en western blot, et démontre la forte expression de ZEB1 dans les cellules résistantes au docetaxel (figure 30C).

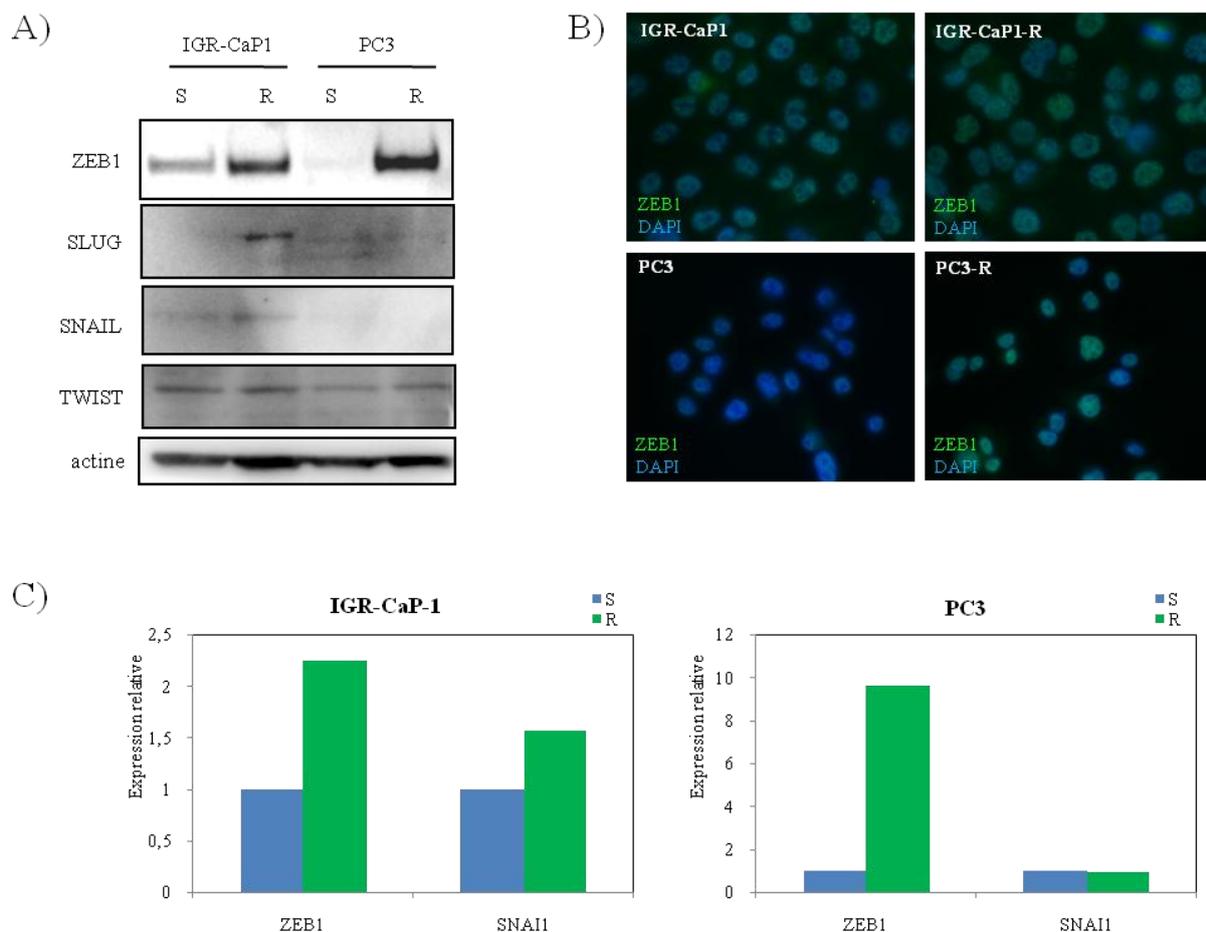


Figure 30 : Expression des EMT-TF dans les cellules résistantes au docetaxel. Détection par western blot des EMT-TF dans les lysats cellulaires totaux, l'actine est utilisée comme témoin de charge (A). ZEB1 est marquée en vert, les noyaux en bleu (DAPI) (B). Les données sont représentées comme un rapport d'expression entre les lignées résistantes et sensibles (C).

2. Identification des inducteurs impliqués dans l'EMT des cellules résistantes au docetaxel.

2.1. Voies de signalisation régulées dans les cellules résistantes

Afin de déterminer quelle voie d'induction de l'EMT est préférentiellement mise en jeu dans nos modèles cellulaires, les signatures de gènes de résistance au docetaxel des IGR-CaP1 et PC3 ont été analysées avec le logiciel Ingenuity. Ce logiciel utilise les données de la littérature pour distinguer les réseaux d'interactions entre les candidats, les voies de signalisations régulées, les processus cellulaires mis en place etc... Le tableau 10 présente les voies canoniques les plus significativement régulées dans les cellules IGR-CaP1-R (10A) et PC3-R (10B). Parmi ces voies, quatre sont communes aux deux lignées résistantes (en gras dans les tableaux). Parmi elles, seule la voie WNT/ β -caténine est impliquée dans l'induction de l'EMT. Cette analyse suggère que la voie d'induction de l'EMT dans nos lignées de CaP résistantes au docetaxel est la voie de signalisation WNT canonique.

2.2. Expression des gènes cibles de la voie WNT

En comparant les données issues de nos signatures à une liste des gènes cibles de la voie WNT, 7 gènes dans les IGR-CaP1-R et 5 gènes dans les PC3-R ont pu être identifiés (figure 31). La comparaison des données de la littérature et des données d'expression en micro-array est présentée dans la figure 31. On observe que l'expression de ces gènes est cohérente avec une activation de la voie WNT/ β -caténine dans les modèles résistants des deux lignées.

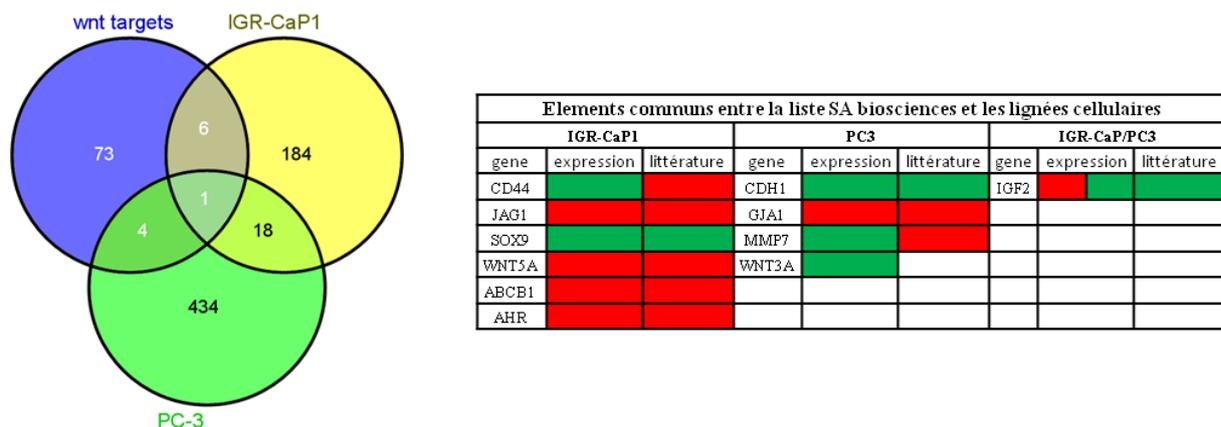


Figure 31 : Identification des gènes cibles de la voie WNT/ β -caténine exprimés dans les signatures de résistance au docetaxel. Le diagramme de Venn représente le croisement des gènes de nos signatures micro-array avec une liste de gènes cibles de la voie WNT/ β -caténine (source : SA Biosciences). Les carrés de couleur représentent la transcription des gènes après activation de la voie WNT/ β -caténine, les carrés rouges représentent l'activation de la transcription du gène cible, les carrés verts son inhibition. Les données ont été obtenues par revue bibliographique (références utilisées : [403]–[409]).

Voies de signalisation	p-value	Molécules
Axonal Guidance Signaling	3,63E-04	FZD8, GNG11, NRP2, ADAMTS1, ADAM22, CXCR4, BDNF, ITGA2, SEMA3B, PLXNA2, ROBO3, PRKD3, WNT5A
Methylglyoxal Degradation III	4,27E-03	AKR1C1/AKR1C2, AKR1C3
Xenobiotic Metabolism Signaling	4,37E-03	ABCB1, MGST1, NQO1, PPP2R2C, UGT8, PRKD3, TNF, AHR
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	6,17E-03	FZD8, SMAD9, ITGA2, SFRP1, BIRC3, TNF, WNT5A
Wnt/β-catenin Signaling	6,92E-03	FZD8, CD44, PPP2R2C, SOX9, SFRP1, WNT5A
Bile Acid Biosynthesis, Neutral Pathway	7,24E-03	AKR1C1/AKR1C2, AKR1C3
RhoGDI Signaling	7,94E-03	GNG11, ITGA2, CD44, RHOU, CDH16, ARHGDI8
Cardiac β-adrenergic Signaling	1,07E-02	AKAP12, GNG11, PPP2R2C, PDE4B, PDE1A
Virus Entry via Endocytic Pathways	1,23E-02	CD55, ITGA2, ITGB8, PRKD3
Glutamate Receptor Signaling	1,86E-02	GNG11, GLS, SLC1A3
Tec Kinase Signaling	1,95E-02	GNG11, ITGA2, RHOU, PRKD3, TNF
Glutamine Degradation I	2,00E-02	GLS
Induction of Apoptosis by HIV1	2,14E-02	CXCR4, BIRC3, TNF
Sperm Motility	2,69E-02	SLC16A10, PDE4B, PDE1A, PRKD3
Growth Hormone Signaling	3,09E-02	IGF2, IGFBP3, PRKD3
TNFR2 Signaling	3,16E-02	BIRC3, TNF
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	3,31E-02	MGST1, NQO1, DNAJC15, PRKD3, ENC1
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	3,63E-02	CD55, ITGA2, ITGB8
ILK Signaling	3,63E-02	RHOU, PPP2R2C, ITGB8, TMSB10/TMSB4X, TNF
Airway Inflammation in Asthma	3,98E-02	TNF
Creahine-phosphate Biosynthesis	3,98E-02	CKB
NAD Biosynthesis III	3,98E-02	NMNAT2
VDR/RXR Activation	4,27E-02	IGFBP3, SEMA3B, PRKD3
AMPK Signaling	4,37E-02	PFKFB4, ADRA2C, AK4, PPP2R2C
Relaxin Signaling	4,47E-02	GNG11, RXFP1, PDE4B, PDE1A
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	4,57E-02	MGST1, NQO1, TNF, AHR
Coagulation System	4,79E-02	PROS1, PLAT
tRNA Splicing	4,79E-02	PDE4B, PDE1A
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	4,79E-02	TNFSF13, IL15, TNF
NAD Salvage Pathway III	4,90E-02	NMNAT2
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	5,01E-02	TNFSF13, IL15, TNF

Voies de signalisation	p-value	Molécules
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	2,34E-05	IL1R2, CXCL16, ITGB2, MMP7, MMP23B, MMP3, PF4, IL36RN, MMP10, ITGA1, CLDN7, CXCL5, IL1R1
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	4,37E-05	MMP7, MMP3, PF4, MMP10, IL1R1, CXCL5, CLDN7, ITGB2, CXCL16, MMP23B, IL36RN, ITGA1, ACTG2
LXR/RXR Activation	1,45E-04	IL1R2, APOE, MLXIPL, C3, IL36RN, SERPINA1, ARG2, IL1R1, CLU, RBP4, ITGB2, TIMP4, MMP7, MMP23B, MMP3, MMP10, ITGA1, MAPK13, CLDN7, ACTG2, DLC1, ARHGAP8, RR5-ARHGAP8
Leukocyte Extravasation Signaling	4,68E-04	RR5-ARHGAP8
Atherosclerosis Signaling	6,31E-04	ITGB2, APOE, MMP3, PLA2G10, IL36RN, COL2A1, SERPINA1, CLU, RBP4
Inhibition of Matrix Metalloproteases	8,51E-04	TIMP4, MMP7, MMP23B, MMP3, MMP10
Urea Cycle	5,50E-03	ASS1, ARG2
Bladder Cancer Signaling	7,08E-03	CDH1, MMP7, MMP23B, MMP3, MMP10, FGF13
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	1,07E-02	ITGB2, APOE, STON2, SERPINA1, ACTG2, SH3GL2, CLU, FGF13, RBP4
IL-10 Signaling	1,10E-02	IL1R2, IL36RN, ARG2, MAPK13, IL1R1
Nicotine Degradation III	1,17E-02	UGT2B7, UGT1A6, CYP2J2, CYP1B1
Thyroid Hormone Metabolism II (via Conjugation and/or Degradation)	1,41E-02	UGT2B7, UGT1A6, DIO2
HIF1 Signaling	1,45E-02	MMP7, MMP23B, MMP3, MMP10, MAPK13, TCEB2
Melatonin Degradation I	1,48E-02	UGT2B7, UGT1A6, CYP2J2, CYP1B1
Methylglyoxal Degradation III	1,58E-02	AKR1B10, AKR1B1
Nicotine Degradation II	1,82E-02	UGT2B7, UGT1A6, CYP2J2, CYP1B1
VDR/RXR Activation	1,82E-02	IGFBP5, VDR, CYP27B1, CST6, CALB1
Reelin Signaling in Neurons	2,00E-02	ITGB2, APOE, LCK, ARHGEF16, ITGA1
Superpathway of Melatonin Degradation	2,04E-02	UGT2B7, UGT1A6, CYP2J2, CYP1B1
Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	2,19E-02	EPN3, CDH1, GUCY1A3, CGN, MAPK13, CLDN7, ACTG2, OCLN
FXR/RXR Activation	2,51E-02	APOE, MLXIPL, SLC51A, IL36RN, FBP1
Role of IL-17A in Psoriasis	2,63E-02	S100A9, CXCL5
p38 MAPK Signaling	2,75E-02	IL1R2, PLA2G10, IL36RN, MAPK13, IL1R1, CREB5
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	2,88E-02	LCK, API M2, SYK, API S2, PPP2R2C
Superpathway of Citrulline Metabolism	3,02E-02	ASS1, ARG2
Coagulation System	3,16E-02	SERPINA1, PLAU, BDKRB1
IL-17A Signaling in Fibroblasts	3,16E-02	LCN2, MAPK13, CXCL5
Tight Junction Signaling	3,16E-02	F2RL2, CRB3, CGN, PPP2R2C, CLDN7, ACTG2, OCLN
Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling	3,63E-02	KCNJ12, KCNJ8, GUCY1A3, PPP1R1B, ADCY1, PPP2R2C, CREB5
Choline Degradation I	3,89E-02	CHDH
Aggrin Interactions at Neuromuscular Junction	4,37E-02	ITGB2, ITGA1, ERBB3, ACTG2
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	4,57E-02	APOE, SERPINA1, MAPK13, IL23A, CLU, RBP4
Wnt/β-catenin Signaling	4,79E-02	GJA1, CDH1, MMP7, WNT3A, WNT10A, PPP2R2C, KREMEN2

Tableau 10 : Voies de signalisation régulées dans les cellules résistantes au docetaxel. Les tableaux présentent les voies modulées dans les cellules IGR-CaP1-R (A) et PC3-R (B) d'après le logiciel Ingenuity. Le seuil de significativité est placé à 5%. Les voies communes aux deux lignées sont en gras, les voies en rouge représentent les voies impliquées dans l'EMT décrites dans la littérature. Paramètres d'analyse Ingenuity : espèce humaine, tous tissus et lignées cellulaires.

2.3. Etat d'activation de la voie WNT/ β -caténine dans les cellules résistantes au docetaxel

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 4 de l'introduction, la kinase impliquée dans la dégradation de la β -caténine est la GSK3 β . Lorsque la voie est activée, la GSK3 β est inactivée par phosphorylation sur la sérine 9, ce qui stabilise la β -caténine et permet la transcription de gènes cibles. Une augmentation de la phosphorylation sur sérine 9 de la GSK3 β est observée dans les cellules résistantes au docetaxel et aucune différence n'est observée au niveau de la phosphorylation activatrice en tyrosine 216 (figure 32). Ces données suggèrent que la voie WNT/ β -caténine est constitutivement activée dans les cellules IGR-CaP1-R et PC3-R. Compte tenu du fait que la voie WNT canonique peut participer à l'EMT, il est possible que cette voie soit impliquée dans l'induction de l'EMT dans nos modèles résistants.

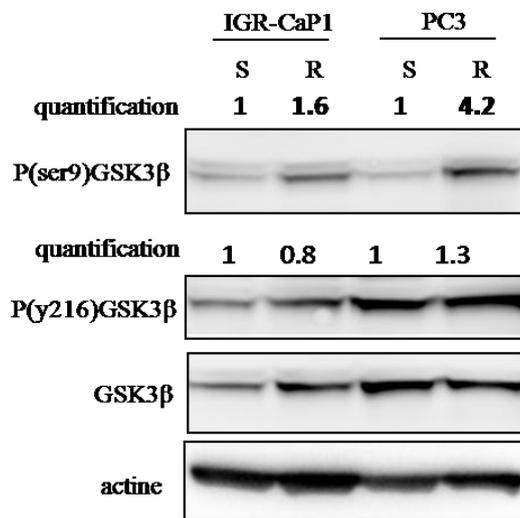


Figure 32 : Etat d'activation de la kinase GSK3 β . Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et normalisées par la valeur de la protéine totale GSK3 β .

3. Discussion

Au cours de ces travaux, nous avons montré que les cellules résistantes au docetaxel ne présentent pas toutes les marqueurs d'EMT. Les lignées androgéno-dépendantes 22RV1 et LNCaP résistantes au docetaxel expriment fortement les marqueurs épithéliaux et n'expriment pas le EMT-TF *ZEB1* (Ct > 38, données non présentées). Nous avons évoqué en introduction la possibilité que la signalisation du AR peut induire l'EMT dans les cellules de CaP. Cependant, plusieurs travaux cités montrent que l'induction de l'EMT est plus importante dans les lignées androgéno-indépendantes. En effet, les travaux de Jacob *et al.* montrent que le traitement des lignées PC3 et DU145 par les androgènes induit une surexpression de *ZEB2* plus importante comparé à celle obtenue dans la lignée LNCaP. De même, Zhu *et al.* ont montré dans la lignée LNCaP que l'inhibition partielle du AR augmente leur capacité à déclencher une EMT suite au traitement à la DHT. Ces résultats permettent de proposer l'hypothèse qu'une faible expression du AR augmente la sensibilité à l'induction de l'EMT par les androgènes. Nos résultats ne permettent pas de répondre au problème posé, cependant elles apportent un nouvel exemple de ce paradoxe dans un contexte de réponse à la chimiothérapie.

Nos travaux ont montré que les cellules IGR-CaP1-R et PC3-R expriment les marqueurs de CSC CD44 ou CD133, alors que les lignées androgéno-dépendantes n'expriment pas ces marqueurs (excepté CD44 pour les lignées 22RV1 et 22RV1-R). De manière intéressante, une sous-population de ces cellules est retrouvée dans les lignées sensibles. Il semblerait donc que le traitement au docetaxel sélectionne le phénotype CSC. Ces résultats sont cohérents avec les données publiées dans la littérature, et démontrent l'étroite relation entre le phénotype mésenchymateux et le phénotype CSC.

La caractérisation de l'EMT dans les cellules IGR-CaP1 parentales a montré que ces cellules expriment certains des marqueurs mésenchymateux comme la Vimentine et *ZEB1*. Il est possible que les cellules exprimant les marqueurs mésenchymateux correspondent à la population de cellules qui exprime CD133. En effet, dans des cellules primaires de poumons, il a été montré que *ZEB1* est surexprimé dans les cellules positives pour CD133 [410]. Ce phénotype mixte pourrait expliquer pourquoi le modèle résistant issu de cette lignée a été obtenu plus rapidement que les autres.

L'étude bioinformatique de la signature a permis de proposer la voie WNT/ β -caténine comme la voie possible d'induction de l'EMT dans les cellules résistantes. Il a été montré que la destruction des jonctions adhérentes par l'acide lysophosphatidique déclenche une relocalisation de l'E-cadhérine au niveau d'endosomes de recyclage périnucléaires [411]. Dans ce cas, la β -caténine reste liée à l'E-cadhérine dans les endosomes de recyclage puis est transloquée rapidement dans le noyau. Les auteurs ont montré que l'activation de la voie WNT/ β -caténine consécutive à la destruction des jonctions adhérentes entraîne une augmentation de la transcription de ses gènes cibles par rapport à la transcription observée après stimulation des cellules possédant leurs jonctions. Ces données suggèrent

que la localisation de l'E-cadhérine dans les endosomes de recyclage augmente la sensibilité aux stimuli de la voie WNT/ β -caténine. La localisation cellulaire de l'E-cadhérine au niveau périnucléaire dans les cellules IGR-CaP1-R pourrait donc suggérer une hypersensibilité à la signalisation WNT/ β -caténine. Enfin, l'inhibition de la kinase GSK3 β que nous observons dans les cellules résistantes suggère une activation constitutive de la voie WNT/ β -caténine. La GSK3 β est classiquement utilisée dans l'étude de l'activation de la voie WNT/ β -caténine, cependant elle possède également un rôle dans la régulation de la voie Notch. Toutefois, l'inactivation de GSK3 β induit une inhibition de la voie Notch [412], [413], ce qui n'est pas cohérent avec le phénotype EMT observé dans nos cellules résistantes au docetaxel.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'EMT induite dans nos lignées est due à une activation constitutive de la voie WNT/ β -caténine. Cela nous a conduit à rechercher les gènes régulateurs de cette voie dans les signatures de résistance au docetaxel. *SHISA3*, le gène le plus sous-exprimé dans les cellules IGR-CaP1-R (tableau 6), est décrit comme un inhibiteur des récepteurs FZD et FGFR ayant un rôle critique dans le développement embryonnaire du xénope. Puisque ces deux voies de signalisation sont impliquées dans l'induction de l'EMT, nous avons pensé que *SHISA3* pourrait intervenir dans l'EMT de nos modèles résistants.

Résultats III

SHISA3, un nouveau régulateur de la transition épithélio-mésenchymateuse

1. Contexte bibliographique

1.1. Les gènes SHISA et leur expression au cours du développement

SHISA3 fait partie de la famille des gènes *SHISA*, comprenant 9 membres. Cette famille de gènes est exclusivement exprimée chez les vertébrés, le gène *SHISA1* n'étant pas exprimé chez les mammifères [414]. Ces gènes codent pour des protéines adaptatrices de taille variable, toutes caractérisées par un domaine transmembranaire, un peptide signal, un domaine riche en cystéines en position N-terminale et un domaine riche en prolines dans la partie C-terminale (figure 33). L'analyse bioinformatique des séquences protéiques de cette famille dans de multiples espèces suggère que les protéines SHISA correspondent à des protéines transmembranaires ayant leur région C-terminale dans le compartiment cytosolique [415]. *SHISA1* a été décrit pour la première fois chez le xénope en 2005 [416]. L'expression de ce gène est augmentée au cours de la gastrulation, une étape embryonnaire essentiellement régulée par la voie WNT. L'inhibition de *SHISA1* au stade quatre cellules entraîne des malformations de la tête du xénope. Chez le poulet et la souris, *SHISA1* possède le même profil d'expression. Il est exprimé dans l'endoderme antérieur viscéral, les somites et le cerveau antérieur, des tissus qui sont reconnus pour être modulés par les voies WNT et FGF [417]. De manière intéressante, le profil d'expression de *SHISA1* et de *SHISA2* est totalement opposé, *SHISA1* étant impliqué dans le développement de la région antérieure du xénope et *SHISA2* au niveau postérieur [418]. *SHISA3* a été étudié pour la première fois chez la souris, où il est exprimé lors du développement du rein, des intestins et du mésencéphale. Les souris Knock-out pour *SHISA3* donnent naissance à des individus normaux, suggérant l'existence de mécanismes de compensation avec d'autres membres de la famille ou avec d'autres régulateurs des voies WNT et FGF [414]. L'étude de l'expression des différents gènes *SHISA* au cours du développement montre que leur expression est tissu-spécifique.

1.2. SHISA3 dans l'inhibition des voies WNT et FGF

Les données publiées chez le xénope montrent que SHISA1 interagit avec les formes immatures des récepteurs FZD8 et FGFR1, et empêche leur maturation en les séquestrant dans le réticulum endoplasmique. SHISA2 et SHISA3 possèdent la même fonction d'inhibition sur les voies WNT et FGF, et agirait selon un mécanisme similaire à celui décrit pour SHISA1 [419]. Selon les prédictions obtenues par l'étude bioinformatique des séquences des gènes SHISA, les membres de la famille peuvent être divisés en sous-groupes en fonction de leurs domaines d'interaction et leurs modifications post-traductionnelles. Les gènes SHISA1-5 possèdent plusieurs résidus cystéines susceptibles de constituer un site de modification lipidique (domaine C, figure 33), comme la palmitoylation, pour permettre leur localisation vers différents microdomaines membranaires.

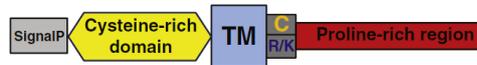


Figure 33 : Structure des protéines de la famille SHISA. Source Pei 2012

Les gènes SHISA3-8 contiennent un motif PY dans au niveau de leur région C-terminale. Ces motifs permettent l'interaction avec des protéines contenant un domaine WW, tels que les E3 ubiquitine ligase de la famille NEDD4 contenant des domaines HECT. Les protéines SHISA3-8 pourrait donc servir de protéines adaptatrices pour réguler l'ubiquitination de protéines cibles. De manière intéressante, les protéines SHISA1-2 et 9 ne possèdent pas ce motif. De plus, SHISA1-2 et SHISA6-9 possèdent un domaine d'interaction PDZ, absent des protéines SHISA3-5. Ces domaines permettent l'interaction avec d'autres domaines d'interaction tels que les domaines SH3. Ces hypothèses issues d'études bioinformatiques ont été démontrées *in vitro* pour la protéine SHISA9. En effet, SHISA9 désensibilise le récepteur AMPA dans le gyrus denté selon un mécanisme indépendant de l'ubiquitination du récepteur. Récemment, il a été montré que l'interaction des partenaires de SHISA9 via le domaine PDZ est essentielle à sa fonction [420]. Ces données suggèrent que contrairement à ce qui a été décrit chez le xénope, SHISA1-2 et SHISA3 pourraient agir selon un mécanisme différent. Les mécanismes potentiels de régulation des cibles des protéines SHISA sont décrits en figure 34.

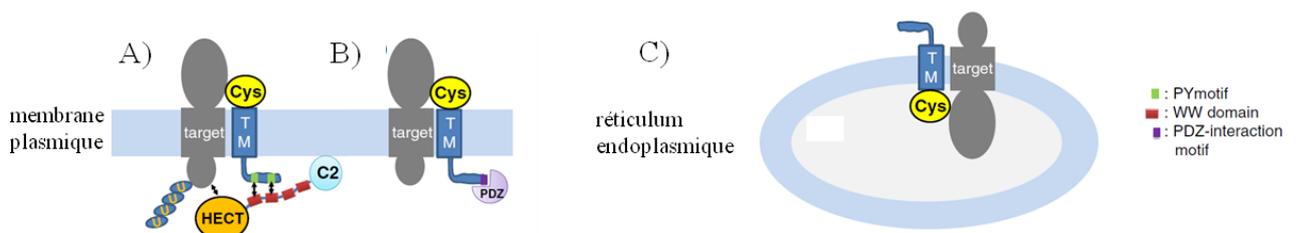


Figure 34 : Mécanismes d'action potentiels des protéines SHISA. Adapté de Pei 2012. A) Mécanisme d'inhibition des récepteurs cibles en partenariat avec les E3 ubiquitine ligases à domaine HECT. B) Mécanisme impliqué dans la désensibilisation du récepteur AMPA par SHISA9. C) Séquestration des récepteurs cibles dans la membrane du réticulum endoplasmique.

1.3. Expression de SHISA3 chez l'homme

Il existe très peu de données concernant l'expression de SHISA3 chez l'homme, SHISA3 ayant principalement été étudié chez le xénope. Bien que la lignée cellulaire utilisée pour valider la fonction de la protéine sur la régulation des voies WNT et FGF soit un modèle humain (HEK-293 : human embryonic kidney) [416], [419], seules des expériences de surexpression ont été réalisées, et aucune information sur l'expression endogène de la protéine n'est disponible. Les sources les plus importantes concernant l'expression de SHISA3 sont les bases de données publiques qui rassemblent les résultats de différentes études haut-débit. Ces données montrent que chez l'Homme, SHISA3 est particulièrement exprimé dans les tissus urogénitaux (glandes surrénales, rein et dans une plus faible mesure les testicules et la prostate), le poumon, le cœur et le colon (figure 35). Il est important de noter que cette étude ne constitue pas une vue exhaustive, une forte expression du gène ayant aussi été observée dans les tissus nerveux (projet BioGPS : <http://biogps.org/>). De manière intéressante, ce profil d'expression correspond à celui observé lors du développement embryonnaire de la souris décrit précédemment.

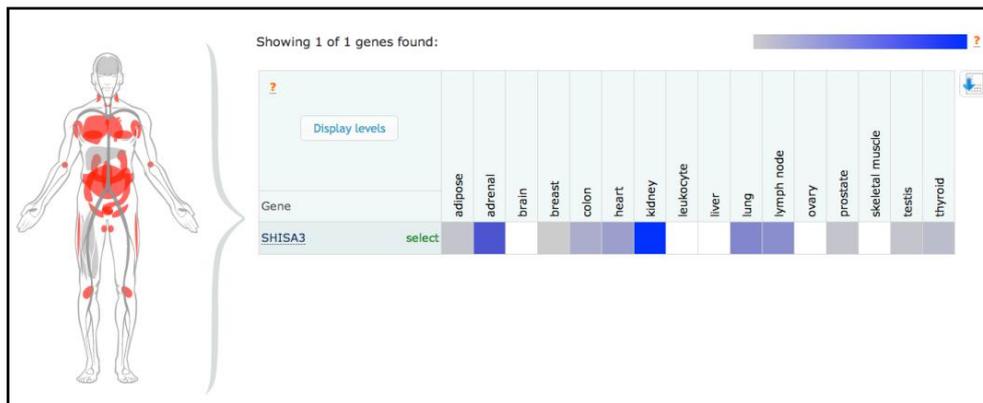


Figure 35 : Profil d'expression de SHISA3 chez l'homme par tissu. Source EMBL-EBI

Finalement, au moment où nous avons débuté l'étude de SHISA3 chez l'homme, aucune bibliographie, ni aucun outil moléculaire n'existait pour ce gène. Cependant, au vu de son rôle dans les voies du développement liées à l'EMT et du fait qu'il correspondait au gène le plus sous-exprimé de nos lignées résistantes présentant un phénotype mésenchymateux, nous avons choisi d'étudier le rôle de SHISA3 dans l'EMT.

2. Expression de SHISA3 dans les modèles résistants au docetaxel

2.1. Expression des gènes de la famille SHISA dans le modèle IGR-CaP1

L'expression des gènes de la famille *SHISA* (*SHISA2* à *9*) a été quantifiée dans les lignées IGR-CaP1 sensibles et résistantes au docetaxel (figure 36). La sous-expression de *SHISA3* est validée dans la lignée résistante (Ct = 22 dans les cellules parentales, Ct = 28 dans les cellules résistantes). De manière intéressante, les gènes *SHISA2*, *SHISA4* et *SHISA5* sont surexprimés dans la lignée IGR-CaP1-R, les gènes *SHISA6* à *SHISA9* sont quant à eux peu ou pas exprimés dans les deux lignées. La perte d'expression de *SHISA3* est un événement précoce dans l'établissement de la résistance au docetaxel. En effet, la sous-expression du gène est déjà observée dans les clones résistants à 5nM de docetaxel et maintenue au cours des traitements successifs (figure 37).

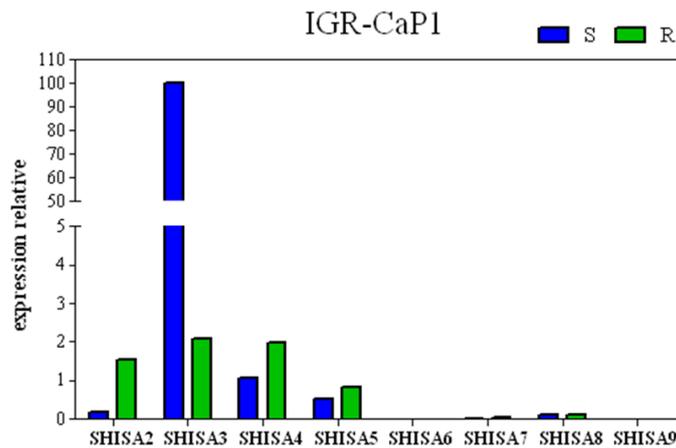


Figure 36 : Expression des gènes de la famille *SHISA* dans les lignées IGR-CaP1 sensibles et résistantes au docetaxel. L'expression du gène est mesurée par PCR quantitative. Les valeurs sont normalisées par l'expression du gène *SHISA3* dans la lignée sensible.

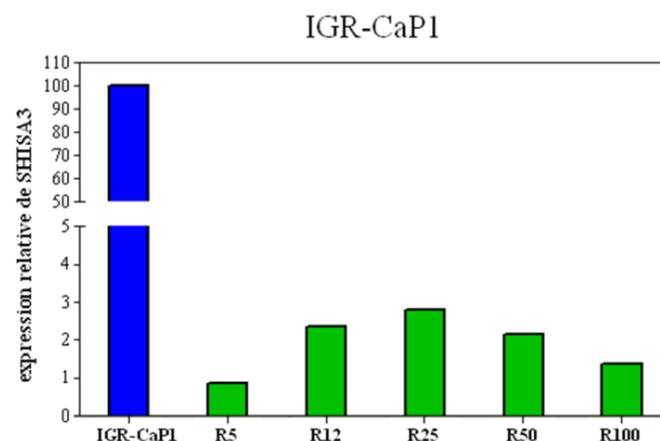


Figure 37 : Expression de *SHISA3* dans les clones IGR-CaP1 résistants à des doses croissantes de docetaxel. Les valeurs sont normalisées par l'expression du gène *SHISA3* dans la lignée sensible. Les clones IGR-CaP1-R sont résistants aux doses de 5, 12, 25, 50 et 100nM de docetaxel.

2.2. Expression de SHISA3 dans les lignées de CaP sensibles et résistantes au docetaxel

L'expression de SHISA3 a été quantifiée dans l'ensemble des modèles résistants obtenus au laboratoire. On remarque une diminution importante de l'expression de SHISA3 dans les cellules IGR-CaP1-R et PC3-R (respectivement de 12,8 et 12,3 fois) comparé aux lignées parentales (figure 38A). Les lignées 22RV1 et LNCaP et leurs dérivés résistants expriment le gène à des taux très faible comparé aux lignées androgéno-indépendantes, une diminution de l'expression SHISA3 est cependant observée mais beaucoup moins marquée (2,2 et 2,4 fois respectivement). Il est intéressant de noter que cette différence de ratio (R/S) de l'expression de SHISA3 permet de distinguer les cellules exprimant ou non le AR. La sous-expression des ARNm de SHISA3 est corrélée à la diminution de l'expression de la SHISA3 correspondante dans les cellules IGR-CaP1-R et PC3-R (figure 38B). Aucun signal n'est observé pour les cellules androgéno-sensibles (données non montrées).

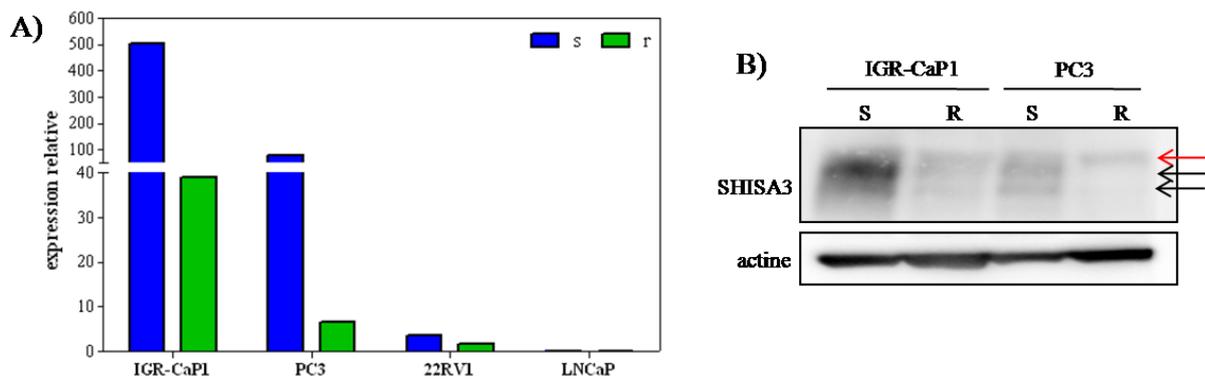


Figure 38 : Expression de SHISA3 dans les lignées résistantes au docetaxel. L'expression du gène est mesurée par PCR quantitative et normalisée par l'ARN universel. L'immunoblot de SHISA3 montre trois bandes au niveau du poids théorique (25,8 kDa) de la protéine, les deux flèches noires correspondent aux deux bandes spécifiques, la flèche rouge indique une bande non spécifique.

3. Caractérisation de l'expression de SHISA3 dans les lignées cellulaires et les tissus humains

3.1. Expression de SHISA3 dans les lignées humaines

Aucune donnée n'existe concernant l'expression de SHISA3 dans les lignées cellulaires. Des lignées cellulaires issues de différents tissus ont été analysées : des cellules de prostate, de rein, de sein, et de peau. Les lignées de prostate IGR-CaP1, PC3, 22RV1 et V-CaP expriment le gène SHISA3, les lignées cellulaires de rein HEK-293 et Caki-1 également (figure 39). Pour les lignées issues d'autres tissus, seules les cellules MDA-MB-231 et HTB-73 expriment le gène de façon détectable. Ces résultats confirment les données obtenues dans les bases de données, où une forte expression du gène est observée dans les tissus urogénitaux.

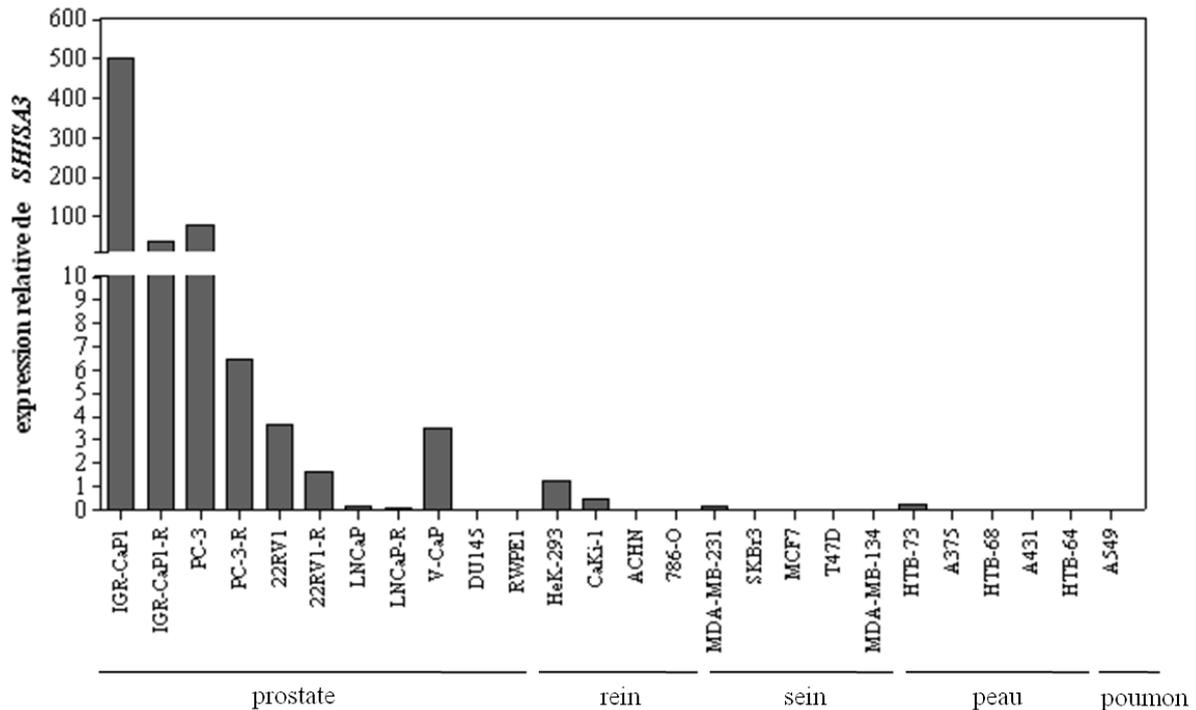


Figure 39 : Expression de SHISA3 dans un panel de lignées cellulaires. L'expression du gène est mesurée par PCR quantitative et normalisée par l'ARN universel.

2.2. Expression de SHISA3 dans les tissus humains

Afin de déterminer le profil d'expression de SHISA3 chez l'Homme, nous avons réalisé un criblage sur des ADN complémentaires obtenus à partir de tissus normaux et tumoraux. L'étude de l'expression de SHISA3 dans les tissus sains nous permet d'observer une forte expression de SHISA3 dans les tissus gastro-intestinaux (intestin, estomac et colon), les ganglions lymphatiques, le cœur ainsi que les tissus urogénitaux (vésicules séminales, urètre, rectum, rein, ...) (figure 40). La comparaison des données d'expression de SHISA3 obtenues sur des tissus tumoraux et des tissus sains permet d'observer une diminution globale de l'expression du gène dans les tumeurs uro-génitales et gastro-intestinales (figure 41, boîtes violettes et oranges respectivement). Le différentiel le plus important est retrouvé dans le rein et le poumon.

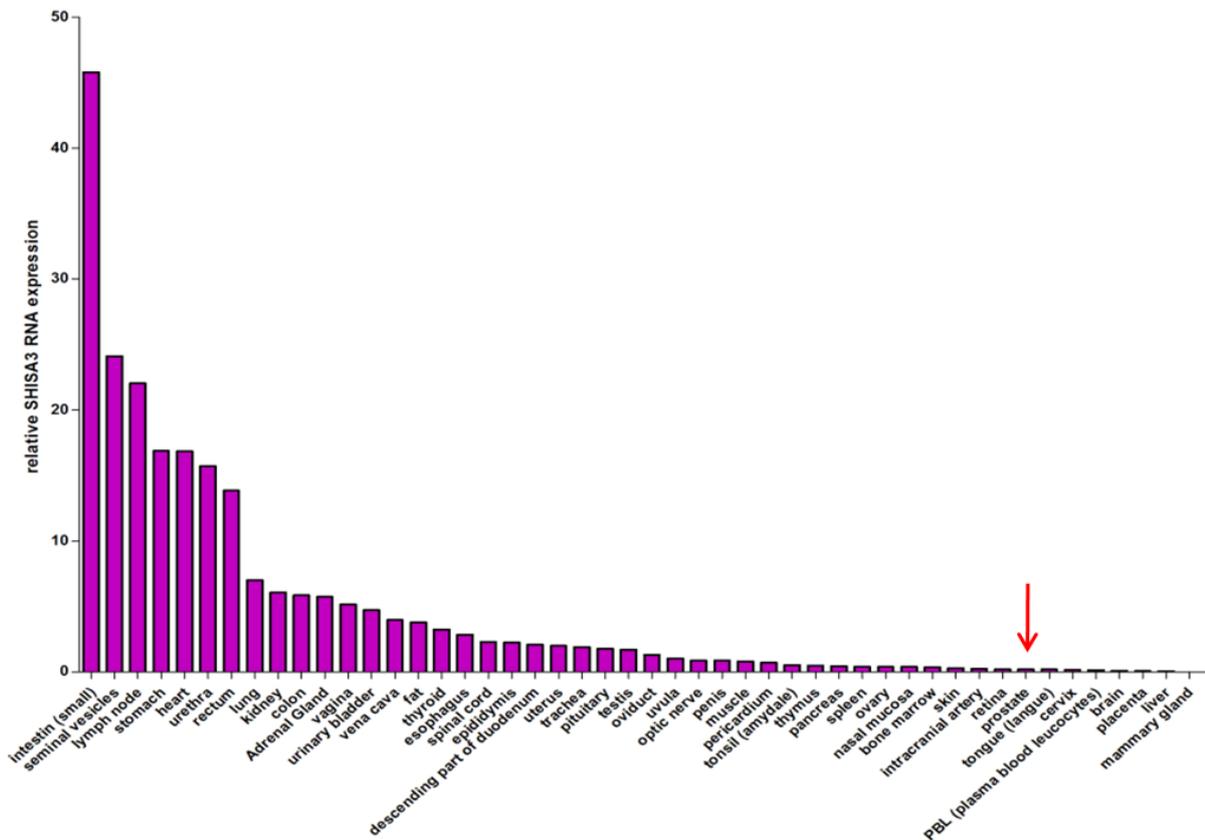


Figure 40 : Expression de *SHISA3* dans un panel de tissus humains normaux. L'expression du gène est mesurée par PCR quantitative en utilisant le kit TissueScan cDNA Arrays. La flèche indique l'expression de *SHISA3* dans la prostate.

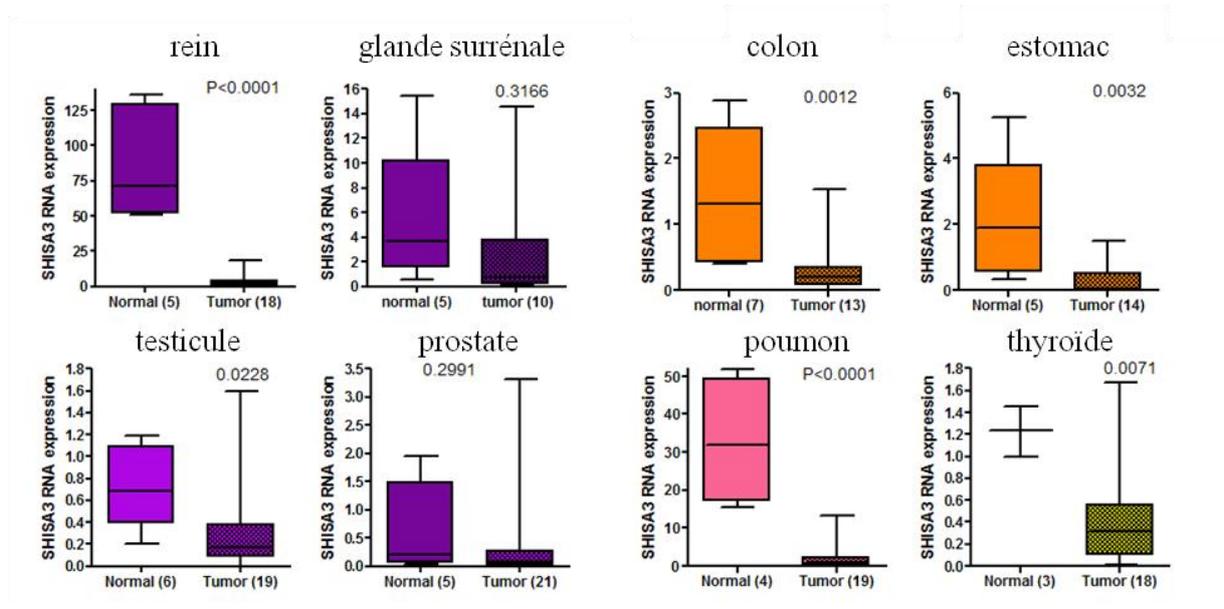


Figure 41 : Comparaison de l'expression de *SHISA3* entre les tissus normaux et tumoraux. L'expression du gène est mesurée par PCR quantitative en utilisant le kit TissueScan Cancer cDNA Arrays. Les barres représentent la moyenne \pm l'écart type. La valeur P a été calculée par un test de Student.

2.3. Localisation cellulaire de SHISA3

Afin de déterminer la localisation cellulaire de SHISA3, nous avons surexprimé une protéine SHISA3 recombinante contenant une séquence FLAG dans les cellules HEK-293. Deux localisations distinctes sont observées, une localisation périnucléaire semblable à celle décrite pour SHISA1, et un faible marquage au niveau membranaire (figure 42A). La reconstitution tridimensionnelle des images de microscopie confocale confirme la localisation membranaire de SHISA3 sous la forme d'agrégats qui ne sont pas répartis de façon uniforme (figure 42B). De plus, on observe que le marquage périnucléaire semble composé d'un amas de vésicules. Dans les cellules PC3, la localisation cellulaire de SHISA3 semble identique, le marquage à la membrane plasmique est cependant absent (figure 42C). Alors que chez le xénope, SHISA1 est localisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE), nous n'observons pas de co-localisation entre le marquage de SHISA3 et le marqueur du RE calnexine. Ceci est particulièrement visible un niveau des amas de vésicules périnucléaires (figure 42D).

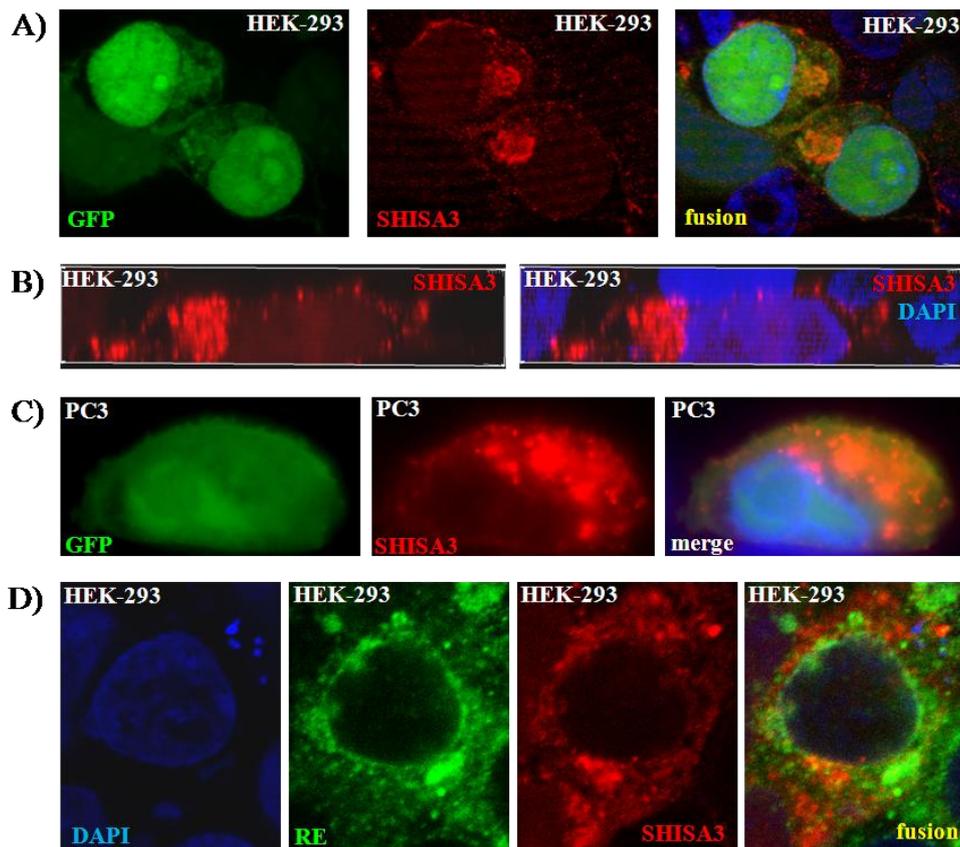


Figure 42 : Localisation intracellulaire de SHISA3. SHISA3 est surexprimée par transfection du vecteur SHISA3-flag exprimant la GFP (promoteur IRES) dans les cellules HEK-293 (A) et PC3 (C). Les cellules transfectées sont visualisées par la GFP, SHISA3 (rouge) est révélé par un anticorps polyclonal et les noyaux sont marqués par le DAPI. La fusion représente la superposition des signaux. Les images ont été prises au microscope confocal à l'objectif 63x. La reconstitution 3D des images de microscopie confocale a été réalisée avec le logiciel Imaris (B). (D) Co-marquage de SHISA3 et du RE (vert) par la calnexine.

3. Rôle fonctionnel de l'inhibition de SHISA3 dans l'EMT

Le gène SHISA3, qui est décrit comme un inhibiteur de la voie WNT, est très fortement sous-exprimé dans nos modèles résistants au docetaxel. Nos résultats décrits précédemment montrent que la résistance est liée à l'EMT. La perte de SHISA3 dans les lignées résistantes pourrait donc induire une activation incontrôlée de la voie WNT qui entrainerait l'apparition du phénotype mésenchymateux. Pour étudier cette hypothèse, les effets fonctionnels de la perte d'expression de SHISA3 ont été étudiés dans les lignées IGR-CAP1 et PC3 sensibles au docetaxel.

3.1. Changement morphologique induit par l'inhibition de SHISA3

Afin de déterminer la fonction de SHISA3 dans l'EMT, l'expression de la protéine a été inhibée par ARN interférence dans les cellules sensibles. L'EMT est un processus cellulaire complexe et long à mettre en place. Deux transfections consécutives de siARN ont donc été utilisées pour maintenir une inhibition constante de la protéine SHISA3 durant 5 jours (figure 43A). Un changement morphologique important est observé dans les cellules transfectées avec le siSHISA3 comparé au contrôle siNT, particulièrement dans les cellules PC3 (figure 43B). Les cellules s'individualisent et sont moins réfringentes au niveau des jonctions intercellulaires suggérant une perte des protéines constituanes de ces jonctions. De plus, la taille des cellules apparaît plus importante. Il est important de noter que les changements morphologiques ne sont visibles qu'à partir de 72h de transfection. Enfin, on remarque que l'expression de SHISA3 augmente entre les conditions 2 jours et 5 jours dans les cellules contrôles siNT, suggérant que l'expression de la protéine est dépendante de la confluence.

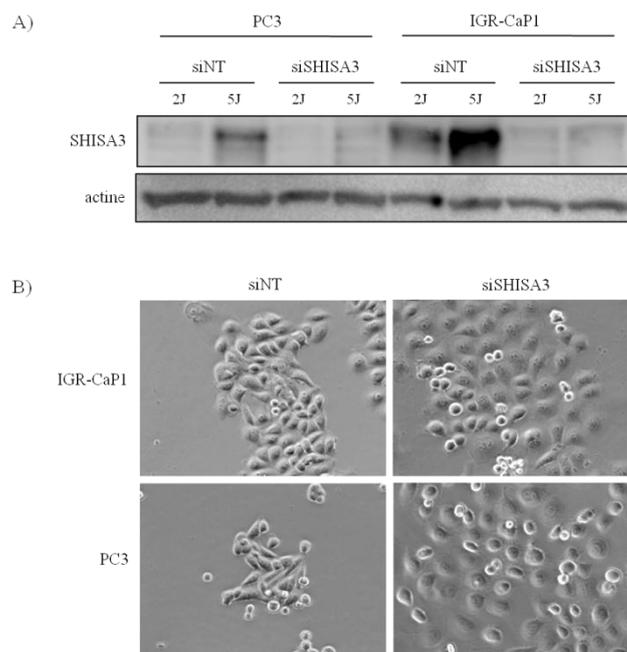


Figure 43 : Morphologie des cellules IGR-CaP1 et PC3 après extinction de SHISA3. (A) Les extraits cellulaires totaux ont été réalisés 48h après la première transfection des siARN (2J) et après les 2 transfactions siARN (5J). Les images ont été prises à 5jours au microscope EVOS (contraste de phase, objectif 40x) (B).

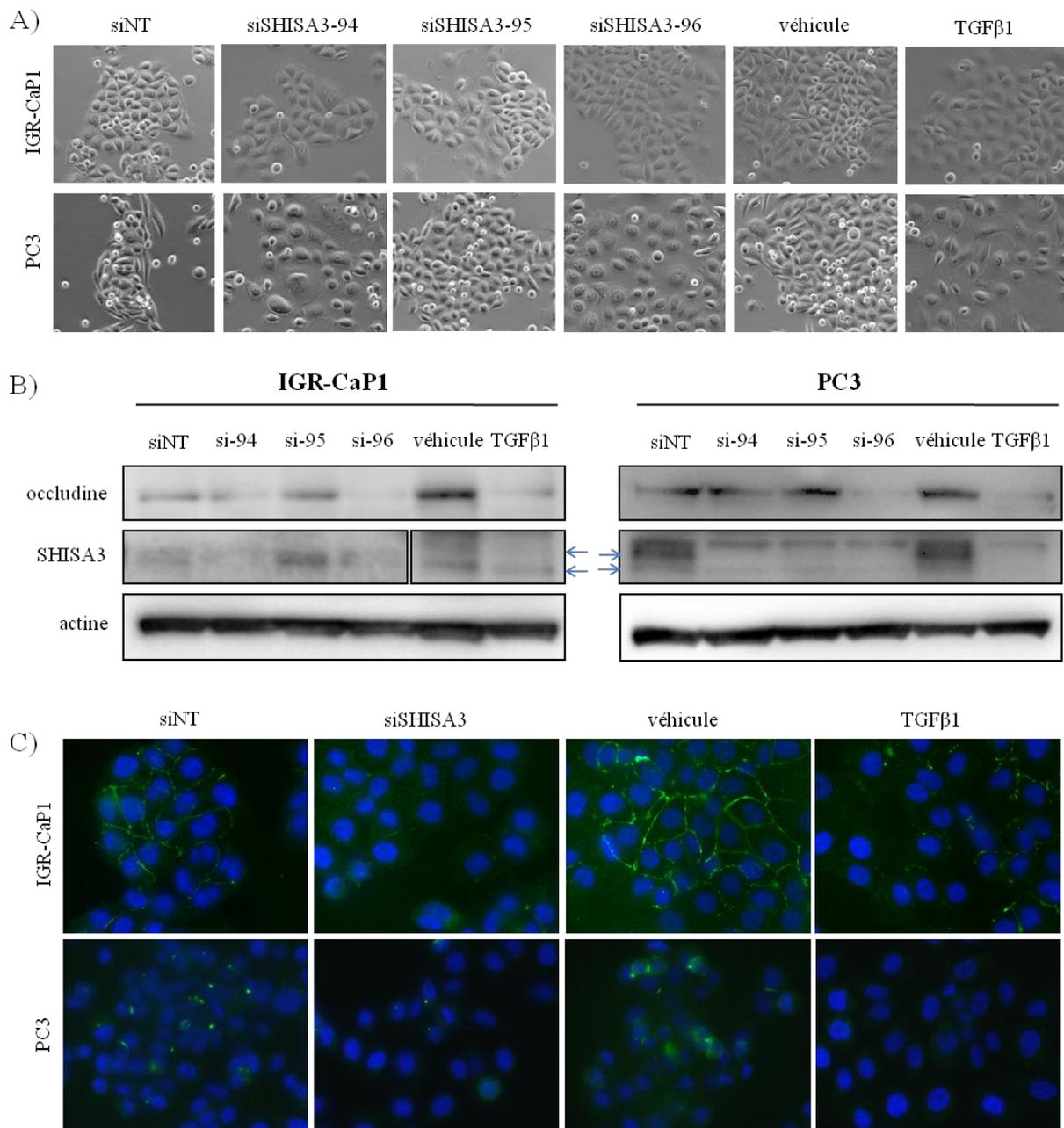


Figure 44 : Destruction des jonctions serrées consécutive à l'inhibition de SHISA3. Les cellules sont traitées avec 10ng/ml de TGF β 1 selon le même protocole que les siARN. Après 5 jours de traitement (siARN ou TGF β 1), les cellules sont photographiées (A) (EVOS, contraste de phase, objectif 40x), et les extraits cellulaires totaux sont analysés par western blot (B), les flèches bleues indiquent les bandes spécifiques de SHISA3. (C) Marquage de l'occludine (en vert) en immunofluorescence suite au traitement avec les siARN ou TGF β 1. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux.

3.2. Expression des protéines de jonctions cellulaires après inhibition de l'expression de SHISA3

Le changement de morphologie observé après inhibition de SHISA3 semble associé à une perte des jonctions intercellulaires. L'expression de différents marqueurs des jonctions a donc été étudiée dans les cellules traitées par siARN. Trois siARN ont été utilisés afin de consolider les résultats obtenus. Le TGF β 1 est utilisé comme contrôle d'induction de l'EMT. On observe que le changement de morphologie identifié avec le siSHISA3-96 est identique à celui obtenu après traitement au TGF β 1, et confirmé avec un autre siARN (siSHISA3-94) (figure 44A). Comme avec le traitement au TGF β 1, l'inhibition de SHISA3 induit une diminution de l'expression de l'occludine (figure 44B). Cet effet est particulièrement visible avec le siSHISA3-96, qui sera dorénavant utilisé pour la suite des travaux. De manière intéressante, le traitement au TGF β 1 induit une diminution de l'expression de SHISA3 dans les 2 lignées sensibles. La perte d'expression de l'occludine après traitement avec le siSHISA3 a été confirmée en immunofluorescence dans les cellules IGR-CaP1 et PC3 (figure 44C).

De manière intéressante, l'inhibition de SHISA3 entraîne une perte d'expression de la β -caténine au niveau de la membrane plasmique des cellules PC3 (figure 45A). Cependant, l'expression de la protéine dans les extraits cellulaires totaux ne montre aucune diminution (figure 45B). Ces données montrent que l'inhibition de SHISA3 induit une relocalisation de la β -caténine, entraînant la destruction des jonctions adhérentes. Ces résultats n'ont pas pu être confirmés dans les cellules IGR-CaP1, la faible expression de la β -caténine dans ce modèle rendant l'étude de sa localisation impossible en immunofluorescence.

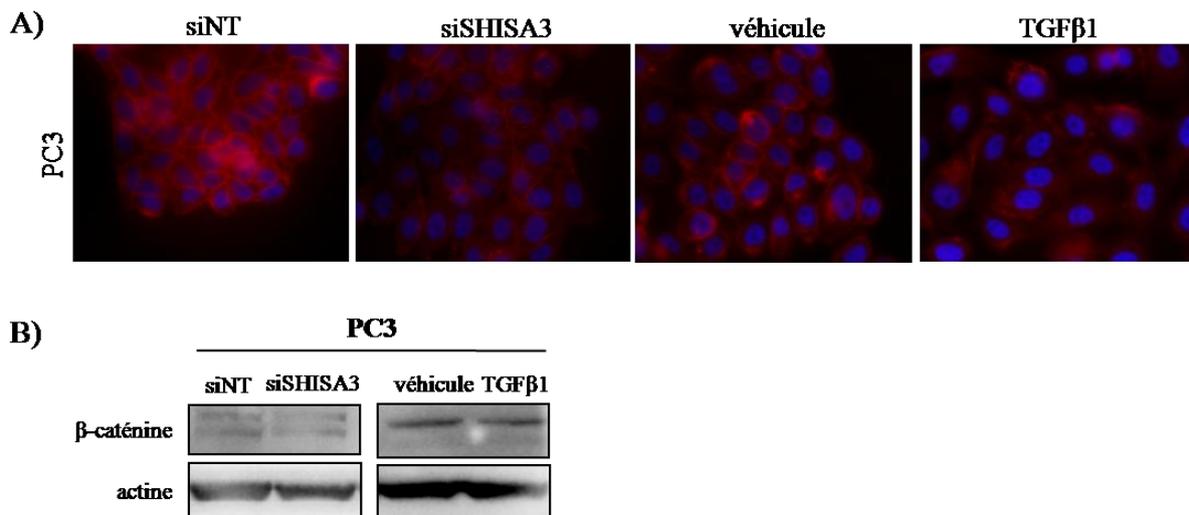


Figure 45 : Relocalisation de la β -caténine après extinction de SHISA3. (A) Marquage de la β -caténine (en rouge) en immunofluorescence suite au traitement par siSHISA3 et TGF β 1. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux. (B) Les extraits cellulaires totaux ont été réalisés après 5 jours de traitement.

3.3. Inhibition de SHISA3 et expression des marqueurs mésenchymateux

L'expression des gènes mésenchymateux a ensuite été étudiée après inhibition de SHISA3. L'extinction de SHISA3 provoque une augmentation de la transcription des EMT-TFs. La balance des cadhérines, caractérisée par la diminution de l'expression de *CDH1* et l'augmentation de l'expression de *CDH2*, est observée uniquement dans le modèle PC3 de façon précoce (figure 46). De même, une forte augmentation de l'expression de *ZEB1* est observée dans ce modèle après deux jours de traitement siSHISA3. Dans les cellules IGR-CaP1, l'augmentation de la transcription des EMT-TFs *ZEB1* et *SNAIL* est observée plus tardivement après cinq jours de transfection. De manière intéressante, ces résultats suggèrent que les deux lignées réagissent différemment au même stimulus d'induction de l'EMT.

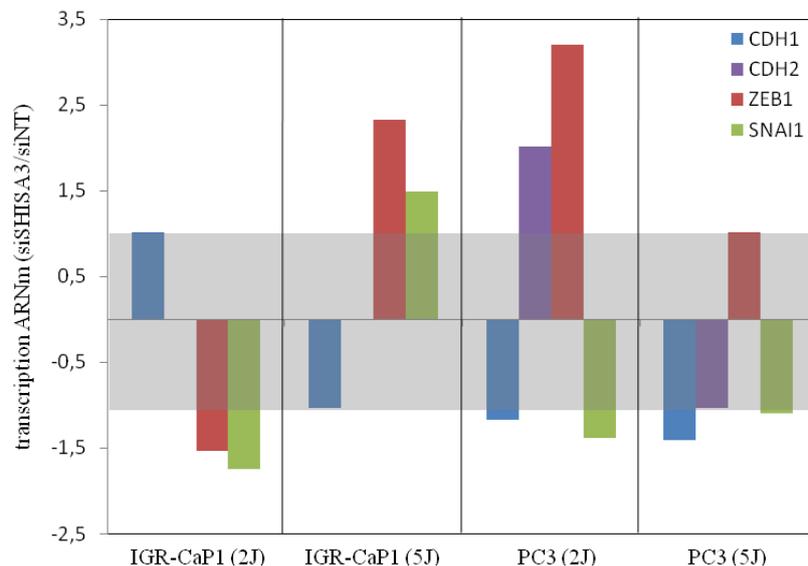


Figure 46 : Transcription des gènes de l'EMT après extinction de SHISA3. 2 jours et 5 jours après transfection des cellules IGR-CaP1 et PC3 avec les siSHISA3 ou siNT, l'expression des ARNm est mesurée par PCR quantitative. Les rapports sont calculés en normalisant l'expression de chaque gène par son expression dans les cellules contrôles (siSHISA3/siNT). La partie grisée indique les valeurs comprises entre -1 et 1, correspondant à l'absence de régulation.

Ces résultats ont ensuite été analysés au niveau protéique. La transfection avec le siARN SHISA3 ou le traitement au TGF β 1 induisent la balance des cadhérines dans les cellules PC3 en western blot et confirment les résultats de PCR quantitative (figure 47). Ces résultats suggèrent donc que l'extinction de SHISA3 dans les cellules parentales provoque l'EMT, mimant le phénotype des cellules résistantes.

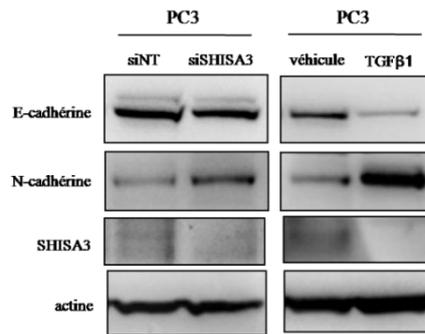


Figure 47 : Expression des marqueurs d'EMT après induction par siSHISA3 et TGFβ1. Les extraits sont réalisés après 5 jours de traitement. L'actine est utilisée comme contrôle de charge.

3.4. Expression des gènes mésenchymateux consécutive au traitement par docetaxel

Pour déterminer si l'EMT est provoquée en réponse au traitement par docetaxel, l'expression des gènes mésenchymateux *ZEB1* et *SNAI1* est mesurée dans les cellules sensibles et résistantes au docetaxel traitées ou non par la chimiothérapie. L'expression de *SHISA3* n'est pas modifiée par le traitement au docetaxel dans les cellules résistantes, alors que la drogue provoque cependant une diminution de *SHISA3* dans les cellules IGR-CaP1 parentales (figure 48). De même, le traitement par docetaxel n'affecte pas le niveau d'expression des EMT-TFs dans les cellules résistantes des deux lignées. Par contre, on observe une augmentation de la transcription de *ZEB1* et *SNAI1* dans les cellules parentales des deux lignées. Ces résultats suggèrent que l'induction du programme d'EMT est une réponse au traitement par docetaxel. En effet, il est possible que l'établissement des lignées résistantes permette la sélection des cellules capables de réaliser une transition complète et efficace, leur permettant de survivre à des doses croissantes de docetaxel. De manière intéressante, l'expression de *SHISA3* est diminuée dans les cellules IGR-CaP1, suggérant que l'inhibition du gène fait partie intégrante du programme d'EMT.

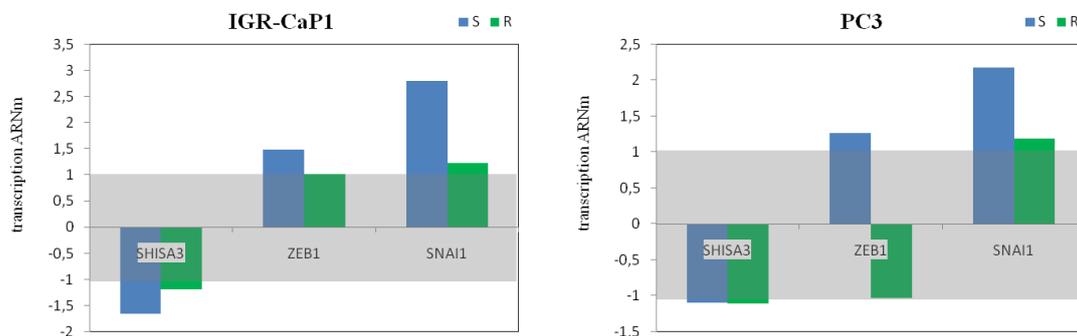


Figure 48 : Transcription des gènes mésenchymateux suite au traitement par docetaxel. Les cellules IGR-CaP1 (12nM), IGR-CaP1-R (100nM), PC3 (12nM) et PC3-R (12nM) sont traitées au docetaxel durant 48h aux doses mentionnées. Les rapports sont calculés en normalisant l'expression de chaque gène par son expression dans les cellules contrôles (docetaxel/véhicule). La partie grisée indique les valeurs comprises entre -1 et 1, correspondant à l'absence de régulation.

3.5. Implication de SHISA3 dans la migration cellulaire

La migration cellulaire a été mesurée après extinction de SHISA3 (5J) par le test de blessure à 12h et 24h. On observe que l'inhibition de la protéine entraîne une augmentation de la capacité migratoire des deux lignées (figure 49). L'effet est plus important dans la lignée IGR-CaP1, où l'augmentation de la migration est significative à partir de 12h ($p = 7,2 \cdot 10^{-5}$). La migration des cellules PC3 est également augmentée mais dans une moindre mesure ($p = 2,6 \cdot 10^{-3}$ à 24h). Ces résultats montrent que la perte d'expression de SHISA3 induit une EMT complète, caractérisée par la perte des jonctions épithéliales, l'expression des facteurs mésenchymateux et l'augmentation des capacités migratoires dans les cellules IGR-CaP1 et PC3.

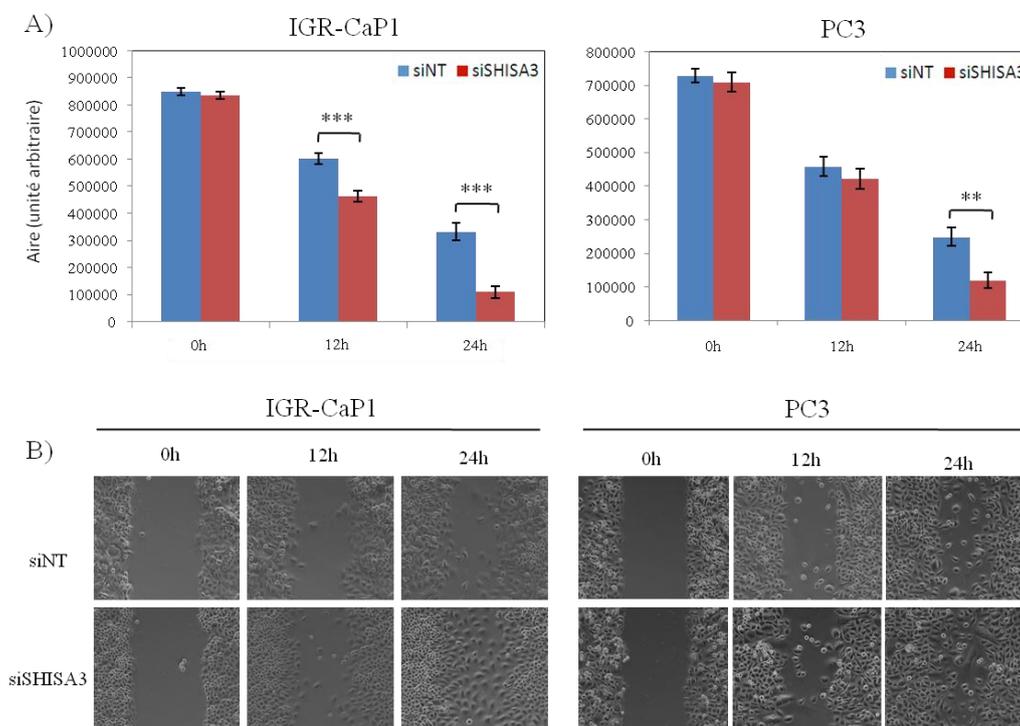


Figure 49 : Effet de l'extinction de SHISA3 sur la migration cellulaire. L'expression de SHISA3 est inhibée par ARN interférence dans les cellules IGR-CaP1 et PC3 pendant 5 jours. L'aire entre les bords de la blessure est mesurée à t0, 12h et 24h après blessure, puis quantifiée avec le logiciel ImageJ. (A) Les barres représentent la moyenne des valeurs ($n = 14$ pour chaque condition), les barres d'erreurs représentent les écarts types à la moyenne (SEM), la significativité est calculée par un test de Student. (B) Photos prises au microscope optique aux temps indiqués (contraste de phase, objectif 20x).

4. Identification des cibles de SHISA3

4.1. Identification des partenaires potentiels de SHISA3 par spectrométrie de masse

SHISA3 a été décrit comme un inhibiteur des récepteurs FZD et FGFR. Cependant, il existe dix récepteurs Frizzled et quatre récepteurs FGFR exprimés chez l'homme. L'étude du mécanisme d'action de SHISA3 dans l'EMT nécessite donc une identification de ses cibles protéiques. Afin d'identifier le(s) récepteur(s) cible(s) de SHISA3, une immunoprécipitation de SHISA3 en conditions non dénaturantes suivie d'une analyse des protéines co-immunoprécipitées en spectrométrie de masse (Orbitrap) ont été réalisées. Le design de l'expérience est schématisé en figure 50. Au total, l'analyse des résultats obtenus en spectrométrie de masse a identifié 3741 protéines. Pour s'affranchir des contaminations non-spécifiques, les protéines retrouvées dans les échantillons contrôles sont éliminées et seules les protéines présentes de façon spécifique dans les deux lignées ont été conservées. Finalement, cette analyse a permis de sélectionner 27 partenaires potentiels de SHISA3 (figure 51A). Cependant, aucun récepteur FZD ou FGFR n'est retrouvé parmi les protéines candidates. La liste des partenaires potentiels de SHISA3 a été analysée avec le logiciel Ingenuity. De façon intéressante, les protéines partenaires de SHISA3 sont décrites comme régulatrices de deux récepteurs membranaires impliqués dans l'EMT, à savoir l'EGFR et le TGF β R2 (figure 51B).

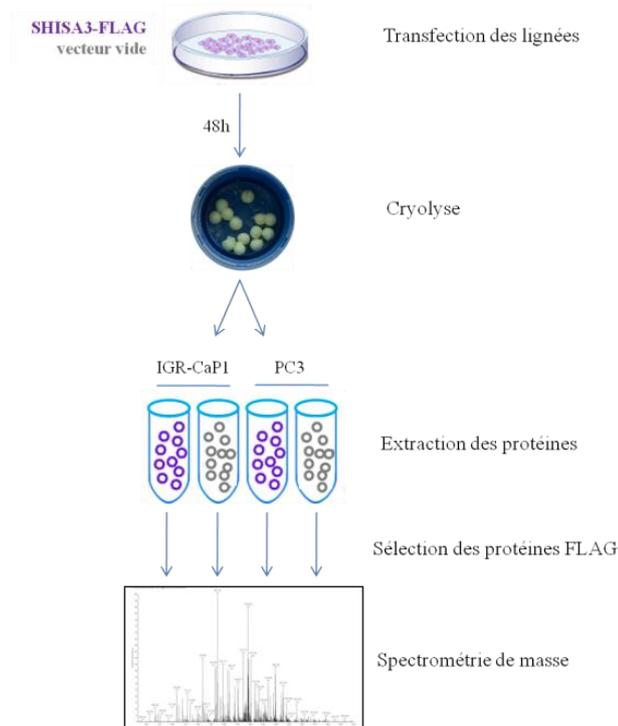
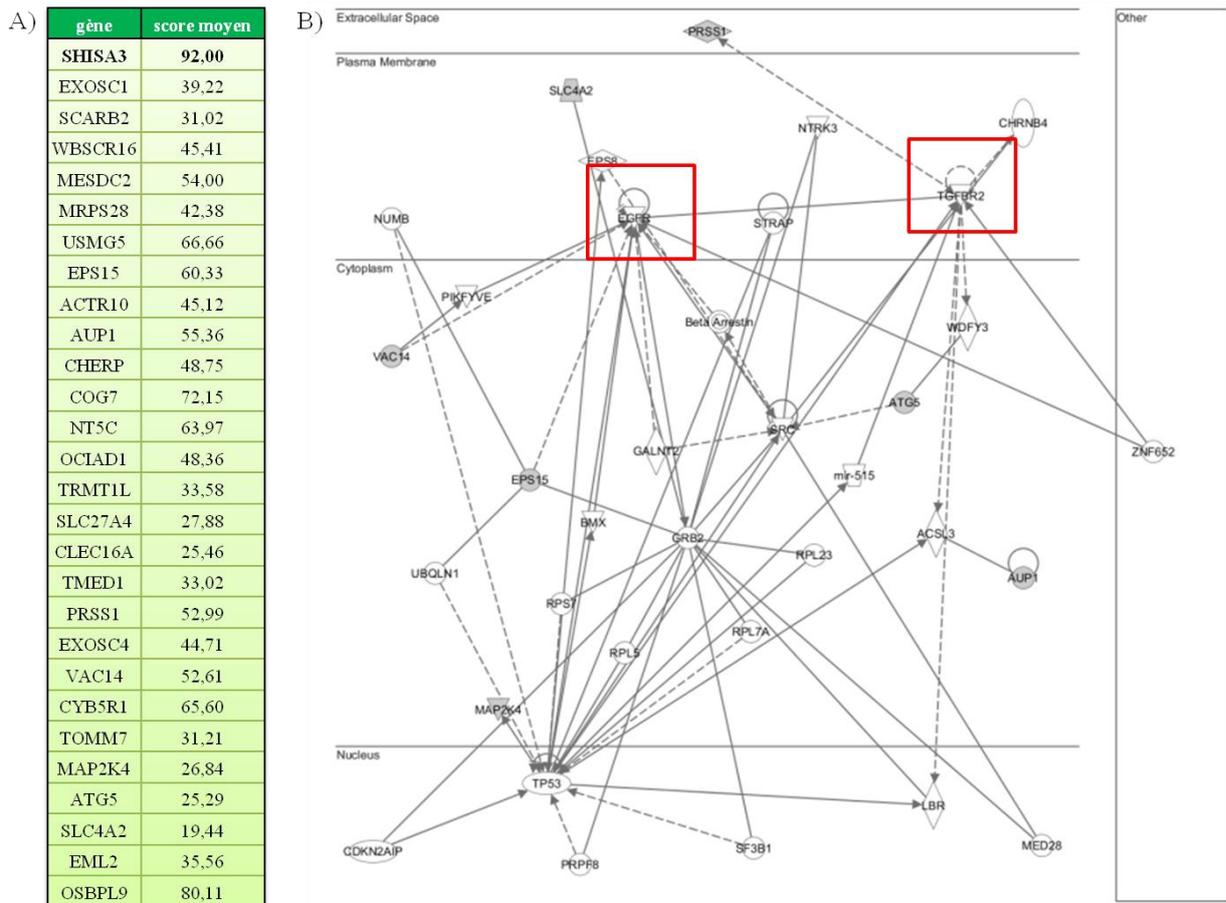


Figure 50 : Stratégie utilisée pour l'identification des cibles de SHISA3. Les expériences ont été réalisées en duplicats.



4.2. Validation des candidats issus des analyses protéomiques.

4.2.1. Co-immunoprécipitation de SHISA3 et de ses partenaires.

Afin de valider les partenaires potentiels de SHISA3, des co-immunoprécipitations ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles de la spectrométrie de masse. Les cellules IGR-CaP1, PC3 et HEK-293 ont été transfectées avec le vecteur d'expression SHISA3-flag et les extraits cellulaires ont été réalisés après cryolyse des cellules. Dans les trois lignées, l'immunoprécipitation de SHISA3 (par l'anticorps flag) entraîne la précipitation du TGFβRII, et inversement l'immunoprécipitation du TGFβRII endogène provoque la précipitation de SHISA3-flag (figure 52). Ceci est particulièrement visible dans les cellules HEK-293, qui surexprime la protéine recombinante de manière importante. Les résultats sont moins clairs concernant l'EGFR. En effet, l'immunoprécipitation de SHISA3-flag provoque une faible précipitation du récepteur dans les lignées IGR-CaP1 et PC3 qui n'est pas observée dans les cellules HEK-293. Inversement,

l'immunoprécipitation de l'EGFR ne semble pas provoquer la co-immunoprécipitation de SHISA3. L'interaction entre les protéines endogènes SHISA3 et TGFβRII a été validée dans les lignées IGR-CaP1 et PC3 (figure 53), suggérant que SHISA3 serait impliqué dans la régulation de ce récepteur.

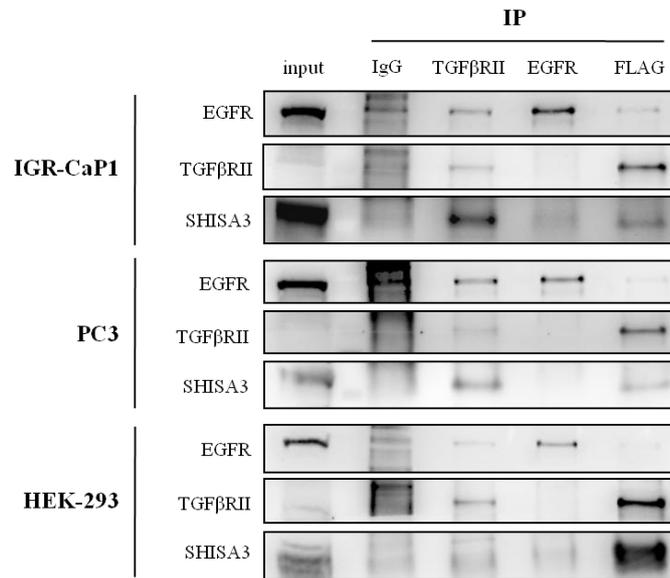


Figure 52 : Co-immunoprécipitation de SHISA3, TGFβRII et de l'EGFR. Les lignées utilisées sont transfectées pour exprimer SHISA3-flag. Après extraction selon le protocole décrit figure 50, les protéines sont immunoprécipitées avec les anticorps anti-flag, anti-TGFβRII, anti-EGFR ou avec une immunoglobuline G (IgG) de lapin utilisée comme contrôle. Les immunoblots sont révélés avec les anticorps anti-SHISA3, anti-TGFβRII et anti-EGFR. Les inputs représentent 10% de l'extrait total avant immunoprécipitation.

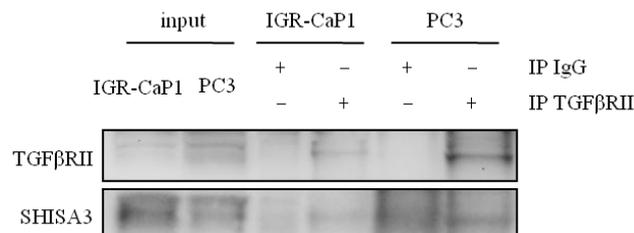


Figure 53 : Co-immunoprécipitation des protéines endogènes SHISA3 et TGFβRII. Après extraction selon le protocole décrit figure 50, les protéines sont immunoprécipitées avec l'anticorps anti-TGFβRII ou avec une IgG de lapin utilisée comme contrôle. Les immunoblots sont révélés avec les anticorps anti-SHISA3 et anti-TGFβRII. Les inputs représentent 10% de l'extrait total avant immunoprécipitation.

4.2.3. Co-localisation du TGF β RII et de SHISA3

Les protéines endogènes TGF β RII et SHISA3 étant indétectables en immunofluorescence, la co-transfection de vecteurs codant pour ces 2 protéines a été réalisée dans les cellules HEK-293. On peut observer que le TGF β RII est principalement localisé à la membrane plasmique où il co-localise partiellement avec SHISA3 (figure 54, cellule 3). De plus, il co-localise également avec SHISA3 au niveau des vésicules périnucléaires (cellule 1 et 2). De manière intéressante, on peut observer des vésicules proches de la membrane plasmique présentant les deux marquages superposés. Ces vésicules proches de la membrane plasmique sont particulièrement visibles dans la cellule 3. Ces résultats suggèrent que SHISA3 pourrait interagir avec le TGF β RII à la membrane plasmique et déclencher son endocytose.

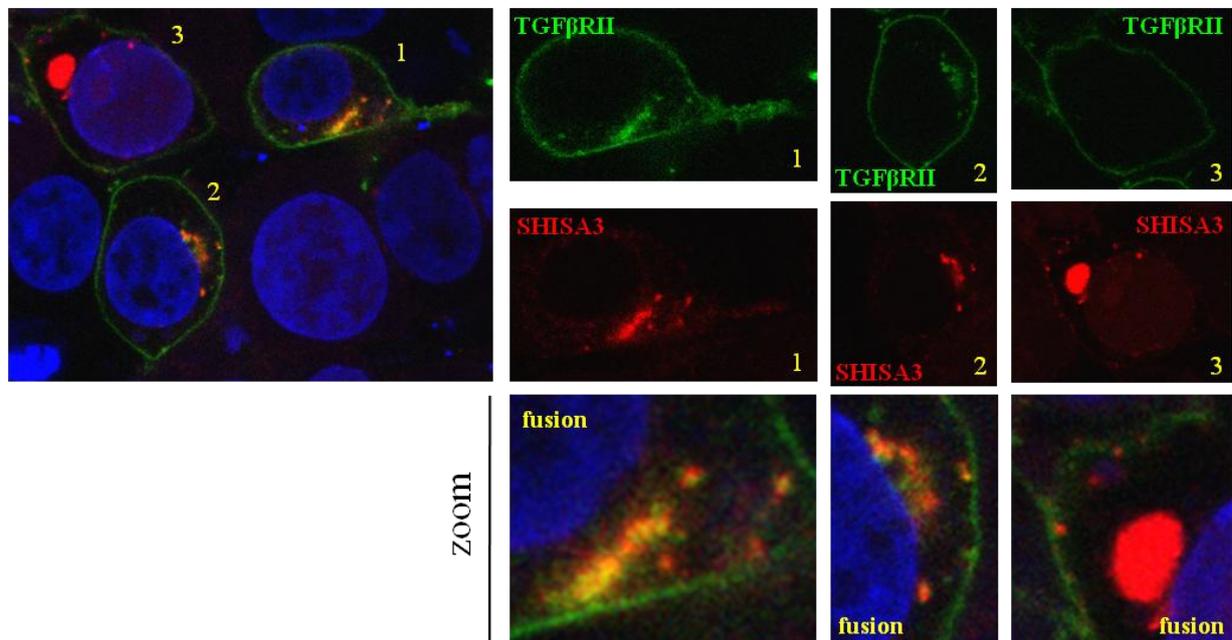


Figure 54 : Co-localisation de SHISA3 et TGF β RII. Les cellules HEK-293 sont co-transfectées avec les vecteurs d'expression de SHISA3-flag et de TGF β RII-HA. Les images sont prises au microscope confocal, objectif 63x.

4.3. Sécrétion autocrine de TGF β 1 dans les lignées résistantes

La quantité de TGF β 1 secrétée par les cellules dans le milieu est mesurée par dosage ELISA après 24, 48 et 72h de culture. Les cellules IGR-CaP1 et PC3 expriment fortement TGF β 1 par rapport aux cellules LNCaP (figure 55) et aux données de la littérature, situées en dessous de 50 pg/ml (39pg/ml dans les fibroblastes [421], 8pg/ml dans les lignées A549 [422]). De manière intéressante, les trois lignées résistantes étudiées expriment davantage de TGF β 1 que les lignées parentales. Ces données appuient les résultats obtenus auparavant, et soulignent l'importance de la voie du TGF β dans le mécanisme de résistance au docetaxel induit par l'EMT.

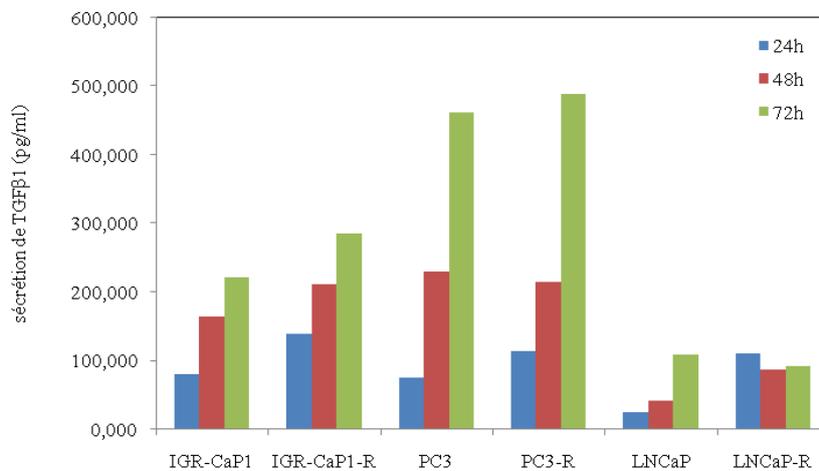


Figure 55 : Production de TGF β 1 dans les lignées sensibles et résistantes au docetaxel. La sécrétion de TGF β 1 est quantifiée par test ELISA après 24, 48 et 72h de culture.

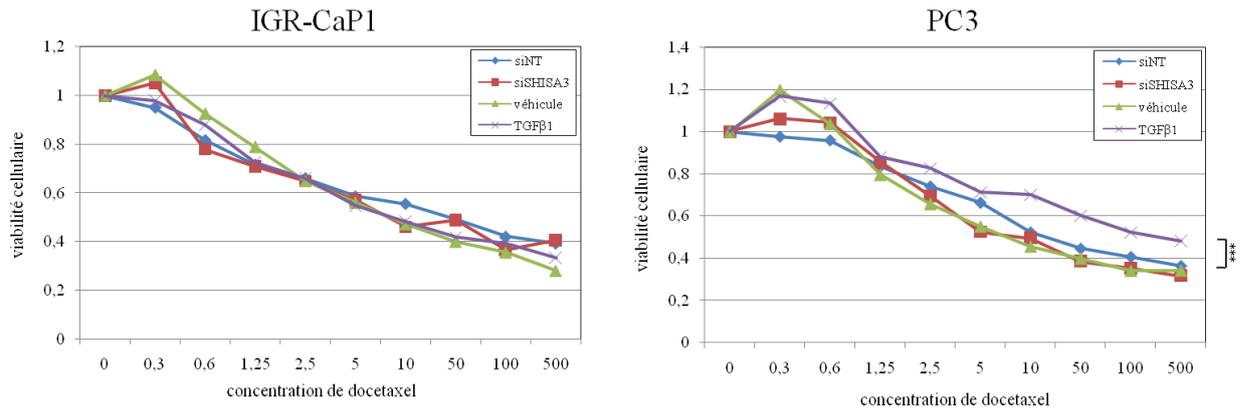


Figure 56 : Efficacité du docetaxel dans les cellules parentales après induction de l'EMT. L'EMT est induite après 5 jours de traitement siARN et TGFβ1. Les cellules sont traitées avec une gamme de concentration de docetaxel, la survie cellulaire est mesurée après 72h de traitement à la chimiothérapie.

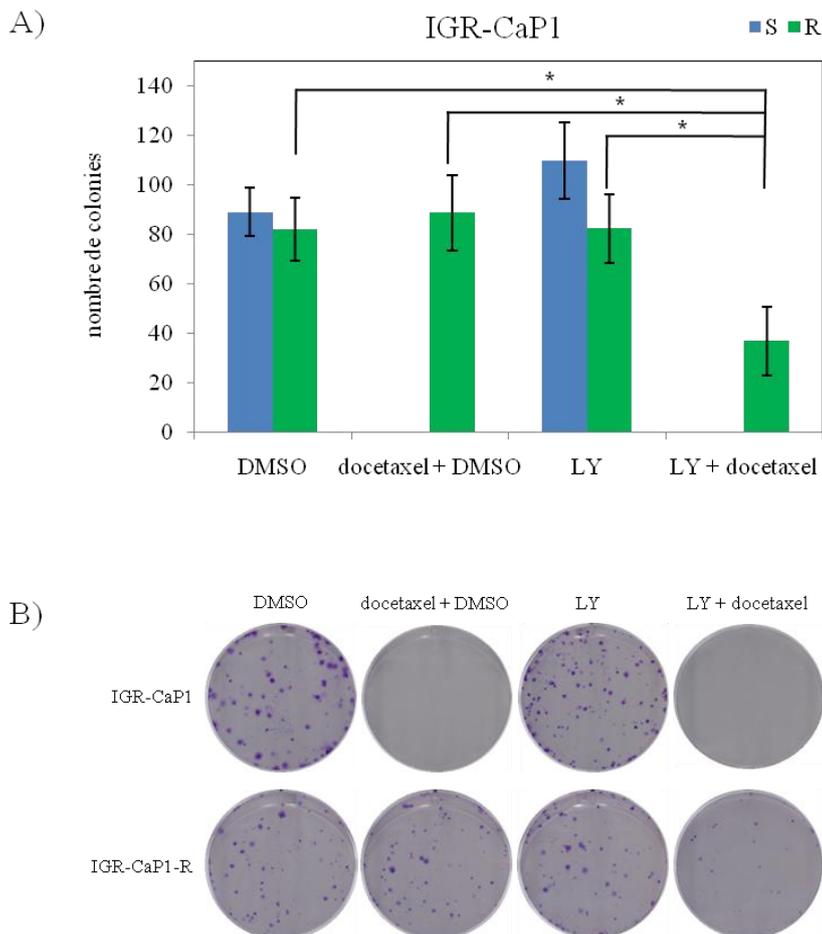


Figure 57 : Effet de l'inhibition de la signalisation du TGFβ sur la capacité des cellules IGR-CaP1 et IGR-CaP1-R à former des colonies en présence de docetaxel. Les cellules sont prétraitées 72h avec 25μM de LY2157299, puis traitées au docetaxel pendant 72h (100nM pour les cellules IGR-CaP1-R et 12nM pour les cellules parentales). Les colonies sont comptées après 2 semaines de culture. (A) Les expériences ont été réalisées en triplicats, les barres d'erreur représente les écarts types. (B) Coloration des colonies au crystal violet.

5. Rôle de SHISA3 dans la résistance au docetaxel induite par l'EMT

5.1. Effet de l'induction de l'EMT dans la résistance au docetaxel

L'EMT a été induite dans les lignées parentales sensibles par traitement avec le siSHISA3 ou par traitement avec le TGF β 1 pendant 5 jours. Dans la lignée PC3, le traitement par le TGF β 1 induit une résistance au docetaxel contrairement à ce qui est observé avec le siSHISA3 (figure 56). Cet effet est significatif à partir de 50nM de docetaxel, et particulièrement observable à 500nM (TGF β 1 VS véhicule $p = 7,1.10^{-5}$, TGF β 1 VS siNT $p = 9,9.10^{-4}$, TGF β 1 VS siSHISA3 $p = 2,3.10^{-5}$). Aucun effet de la transition n'est observé sur la résistance au docetaxel de la lignée IGR-CaP1. Ces résultats montrent que l'induction de la voie du TGF β est essentielle à la résistance au docetaxel dans le modèle PC3 mais que l'inhibition de SHISA3 n'est pas suffisante pour augmenter la résistance des lignées sensibles.

5.2. Ciblage de la voie du TGF β avec un inhibiteur spécifique du TGF β RI

Dans la mesure où la voie du TGF β semble intervenir dans la résistance, nous avons étudié l'effet du blocage de la signalisation de cette voie par l'inhibiteur LY2157299 (inhibiteur de TGF β RI) sur la capacité des cellules sensibles et résistantes à former des colonies en présence de docetaxel. Des tests de clonogénicité ont été réalisés sur les cellules IGR-CaP1 sensibles et résistantes au docetaxel. Alors que le traitement par LY2157299 n'est pas efficace seul, on observe que le co-traitement avec du docetaxel avec l'inhibiteur diminue significativement le nombre de colonies formées par les cellules IGR-CaP1-R (fig 57) (LY+docetaxel VS DMSO : $p = 0,014$; LY+docetaxel VS docetaxel+DMSO : $p = 0,012$; LY+docetaxel VS LY : $p = 0,016$). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la signalisation du TGF β sensibilise les cellules IGR-CaP1-R au traitement par docetaxel.

6. Discussion

Au cours de ces travaux, nous avons montré que la perte d'expression de SHISA3 est un marqueur des cellules résistantes au docetaxel présentant un phénotype mésenchymateux. La caractérisation de l'expression de *SHISA3* dans les tissus humains montre que ce gène est fortement exprimé dans l'appareil urogénital, mais également dans les tissus gastro-intestinaux et les poumons. Ce profil d'expression correspond à son expression lors du développement embryonnaire de la souris [414], puisque ce gène est exprimé dans le « foregut » qui est à l'origine du pharynx, du système respiratoire, de l'œsophage, de l'estomac, du duodenum, du foie et du pancréas. Plus tardivement lors du développement, le gène *SHISA3* est exprimé dans le rein et le mésencéphale. La sous-expression de SHISA3 dans les tumeurs est particulièrement intéressante. En effet, la progression tumorale est souvent associée à l'apparition de phénotype EMT-like. Il a par exemple été montré chez les patients que la perte d'expression de l'E-cadhérine et l'expression de la Vimentine sont associées à un CaP invasif [423]. Ces données permettent de proposer l'hypothèse que la perte SHISA3 pourrait être utilisée comme biomarqueur d'EMT dans le CaP mais également dans d'autres cancers. Le mécanisme d'extinction du gène SHISA3 n'a pas été élucidé. Les résultats obtenus au laboratoire suggèrent qu'il ne s'agit pas de méthylation au niveau du promoteur de SHISA3. De plus, nous n'avons pas observé de mutation dans la séquence codante de SHISA3 dans nos modèles résistants bien que quelques mutations du gène aient été rapportées dans d'autres tumeurs.

L'expression ectopique de SHISA3-Flag dans les cellules HEK-293 montre une localisation à la fois sous la forme de clusters à la membrane plasmique et sous la forme de vésicules intracytoplasmiques qui co-localisent avec le récepteur TGFBR2. Les clusters de SHISA3 à la membrane plasmique suggèrent que SHISA3 pourrait agir selon un mécanisme similaire à SHISA9 qui s'associe avec le récepteur du glutamate AMPA au niveau de la membrane plasmique dans les cellules post-synaptiques [420]. Sur ce point, nos résultats diffèrent des résultats initiaux de Nagano *et al.* qui montraient une co-localisation partielle de SHISA3-HA avec le réticulum endoplasmique dans les cellules HEK-293 [419]. Les récents travaux publiés par Chen *et al.* montrent également que la surexpression de SHISA3-Flag dans des cellules de NSCLC co-localise exclusivement avec le réticulum endoplasmique. Cependant l'utilisation du même vecteur dans les cellules HEK-293 montre là encore une co-localisation partielle avec cet organelle [424]. Il est possible que la localisation de la protéine dépende du modèle cellulaire utilisé. L'étude de la localisation intracellulaire de SHISA3 endogène dans nos modèles de CaP nous permettrait de trancher. Nous avons étudié de façon intensive la localisation intracellulaire des protéines SHISA3 endogènes, à la fois avec des anticorps développés au laboratoire et avec des anticorps commerciaux qui ont été disponibles par la suite. Cependant, aucun de ces anticorps n'a permis d'obtenir un marquage des protéines SHISA3 endogènes en immunofluorescence.

Nos travaux portant sur le rôle fonctionnel de SHISA3 ont confirmé notre hypothèse selon laquelle SHISA3 est impliqué dans l'EMT. L'inhibition de l'expression de SHISA3 dans les cellules sensibles entraîne un changement de morphologie, la perte des jonctions épithéliales, l'expression des marqueurs mésenchymateux et augmente le potentiel migratoire des cellules. Le changement de morphologie observé dans les cellules IGR-CaP1 se limite à une augmentation de la taille des cellules et de leur noyau. Ces propriétés sont caractéristiques de l'EMT induite par le TGF β [425]. Nous avons observé que l'extinction de SHISA3 avec un siARN induit la transcription des gènes mésenchymateux plus précocement dans la lignée PC3 en comparaison avec la lignée IGR-CaP1. Il est possible que la forte expression de SHISA3 dans les cellules IGR-CaP1 retarde l'EMT. De manière intéressante, on observe que les marqueurs exprimés lors de l'induction de l'EMT sont différents entre les lignées IGR-CaP1 et PC3, suggérant que chaque modèle répond au même stimulus par des voies de signalisation différentes. Des données obtenues au laboratoire appuient cette hypothèse. En effet, nous avons observé que l'induction de l'EMT par le TGF β induit la phosphorylation sur sérine 9 de GSK3 β dans les lignées PC3 mais n'influe pas sur l'activité de la kinase dans les cellules IGR-CaP1 (non montré).

Les données préliminaires concernant l'expression des gènes cibles de WNT et l'inactivation de la kinase GSK3 β nous ont amené initialement à proposer l'hypothèse selon laquelle l'EMT des cellules résistantes pouvait être due à une activation constitutive de la voie WNT. Cependant, l'absence de surexpression de la β -caténine consécutive à l'induction de l'EMT par le siARN SHISA3 et par le traitement au TGF β 1 montre que cette voie n'est pas la voie d'induction privilégiée dans les cellules étudiées, contrairement à ce que suggéraient nos données de micro-array. Enfin, l'étude de l'expression de la β -caténine dans les cellules IGR-CaP1 et PC3 parentales et résistantes montre une sous-expression dans les cellules résistantes, associée à la destruction des jonctions adhérentes (données non présentées).

La recherche des partenaires protéiques de SHISA3 a permis d'identifier le TGF β RII comme une de ses cibles. Ce résultat est cohérent au vu des similitudes observées sur l'expression des différents marqueurs d'EMT après traitement par le siSHISA3 et après traitement par le TGF β 1. De plus, SHISA3 apparaît comme un acteur de la réponse au TGF β , puisqu'elle est inhibée par le TGF β 1 dans les deux lignées cellulaires. La co-immunoprécipitation de SHISA3 et TGF β RII montre que SHISA3 interagit avec la forme mature du récepteur. En effet, le signal du TGF β RII co-immunoprécipité avec SHISA3 observée en western blot correspond à la masse du récepteur glycosylé mature (90kDa) [426]. De manière intéressante, la co-localisation de TGF β RII et de SHISA3 est retrouvée au niveau de vésicules proches de la membrane plasmique et dans le compartiment périnucléaire. Nous pouvons penser que SHISA3 inhibe la signalisation du TGF β RII en induisant son endocytose, le marquage périnucléaire étant proche de ce que l'on peut observer avec un marquage des vésicules de recyclage [427]. Enfin, nous avons observé que l'expression de SHISA3 augmente avec

la confluence des cellules, parallèlement à la concentration de TGF β 1 extracellulaire. Ces données suggèrent que SHISA3 est surexprimé pour interagir avec le TGF β RII en condition de confluence, ce qui permettrait l'inhibition de la signalisation du TGF β 1 et participerait au maintien du phénotype épithélial. L'ensemble des résultats présentés nous permettent de proposer un modèle de mécanisme d'action de SHISA3 (figure 58).

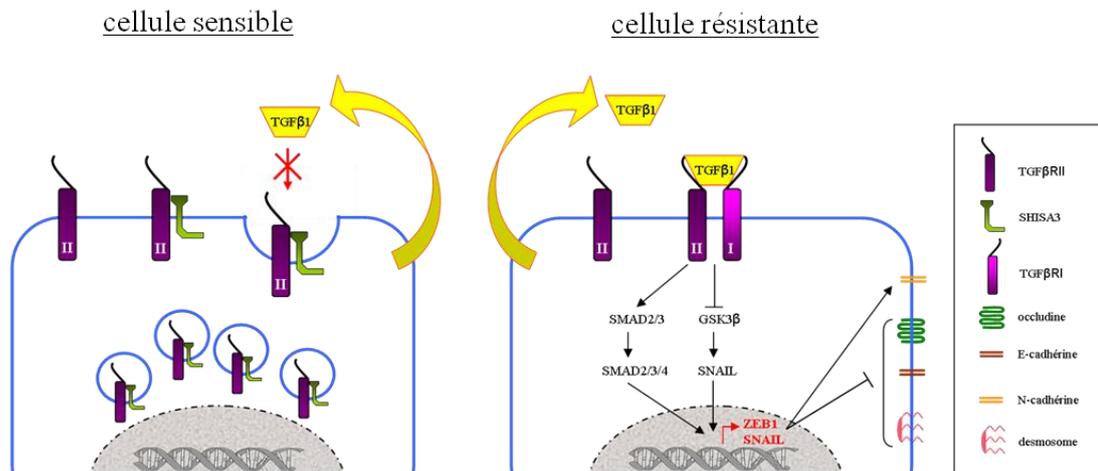


Figure 58 : Modèle proposé du mode d'action de SHISA3 dans l'EMT

Dans le modèle proposé, SHISA3 est surexprimé dans les cellules de cancer de la prostate chimiosensibles, et interagit avec le TGF β RII et provoque son endocytose. L'inhibition du TGF β RII conduit au maintien du phénotype épithélial. Dans les cellules chimiorésistantes où SHISA3 n'est pas exprimé, le TGF β RII est libre d'interagir le TGF β 1, de recruter le TGF β RI et d'activer les voies de signalisations en aval. L'absence de régulation de TGF β RII par SHISA3 permet de déclencher l'EMT, et il est possible que l'extinction de SHISA3 participe au maintien du phénotype mésenchymateux dans les cellules résistantes.

Les études fonctionnelles sur l'inhibition de SHISA3 dans les cellules sensibles n'ont pas permis de montrer son rôle direct dans la résistance au docetaxel. Cependant, SHISA3 intervient dans les phases précoces de l'EMT, qui sont elles-mêmes impliquées dans la résistance au docetaxel. En effet, l'EMT induite par le TGF β augmente la résistance au docetaxel des cellules PC3, en accord avec les travaux de Marin-Aguilera *et al.* [384]. L'utilisation de lignées stables n'exprimant pas SHISA3 aurait pu permettre le maintien de la réversion du phénotype épithélial et accroître la résistance au docetaxel des lignées parentales. Les récents travaux de Chen *et al.* montrent que la surexpression de SHISA3 induit une balance des cadhérines dans des lignées de NSCLC mésenchymateuses. Cependant, dans nos modèles de cancer de la prostate résistants au docetaxel, l'expression ectopique transitoire de SHISA3 n'entraîne pas de changement d'expression des marqueurs d'EMT (données non présentées). Il est possible qu'un mécanisme additionnel de maintien

du phénotype mésenchymateux soit mis en place dans les cellules résistantes aux drogues. Afin de contourner la résistance au docetaxel dans nos modèles IGR-CaP1-R et PC3-R, nous avons utilisé une stratégie visant à inhiber la voie de signalisation du TGF β , ce qui permet de simuler l'effet de l'expression de SHISA3. Le LY2157299 est un inhibiteur de TGF β RI ayant montré un fort potentiel dans le traitement de xénogreffes de cancer du sein résistantes au paclitaxel [428]. En association avec le docetaxel, le LY2157299 diminue le nombre de colonies dans la lignée IGR-CaP1. Ce résultat encourageant montre le potentiel du ciblage de la voie du TGF β dans le CaP résistant au docetaxel.

Résultats IV

Etablissement d'un modèle de cancer de la prostate résistant au docetaxel chez la souris

L'accessibilité à un modèle animal de CaP résistant aux taxanes est crucial pour l'étude des mécanismes de chimiorésistance et pour évaluer au niveau préclinique les thérapies capables de contourner la résistance. Cependant, l'établissement d'un tel modèle est particulièrement difficile. Seul un modèle, issu de xénogreffes de cellules résistantes au docetaxel *in vitro*, a été publié [183]. La lignée IGR-CaP1 établie au laboratoire produit des tumeurs chez la souris Nude après injection sous-cutanée ou orthotopique [429]. Cette lignée établie à partir d'un cancer localisé constitue un modèle intéressant puisque l'injection directe de ces cellules dans l'os ou en injection intracardiaque produit des lésions osseuses de type mixte ostéolytique/ostéocondensant, similaire à ce qui est observé dans les métastases osseuses chez les patients. De plus, cette lignée a également été utilisée pour établir des clones résistants à de fortes doses de docetaxel. Ces propriétés nous ont amené à choisir cette lignée cellulaire pour établir un modèle de CaP résistant au docetaxel chez l'animal.

1. Stratégie expérimentale

1.1. Description des stratégies utilisées pour le développement du modèle

Deux stratégies ont été utilisées pour développer le modèle (figure 59). La première consiste à augmenter la résistance de tumeurs issues de la lignée sensible IGR-CaP1. A chaque passage des tumeurs, les souris sont traitées avec des doses croissantes de docetaxel. La lignée utilisée est un dérivé bioluminescent de la lignée IGR-CaP1 obtenu après transduction avec un vecteur rétroviral exprimant la luciférase (Megix) [429]. La seconde stratégie consiste à injecter les différents clones résistants *in vitro* de la lignée IGR-CaP1 (IGR-CaP1-R12, 25, 50, 100) pour tenter d'obtenir des tumeurs. Pour tous les modèles, les tumeurs sont obtenues par injection sous-cutanée dans des souris immuno-déficientes Nude.

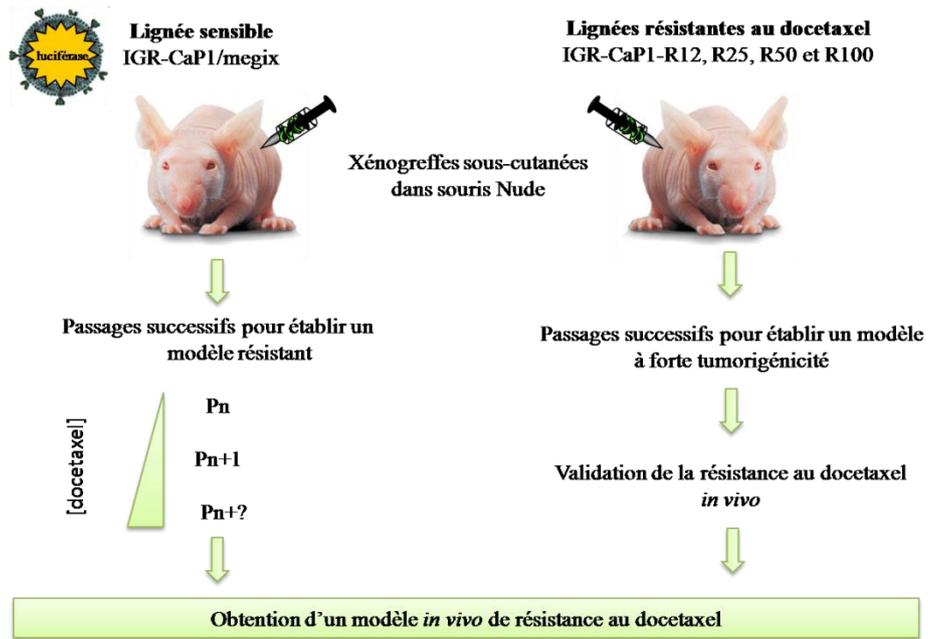


Figure 59 : Stratégies d'établissement d'un modèle murin de CaP résistant au docetaxel

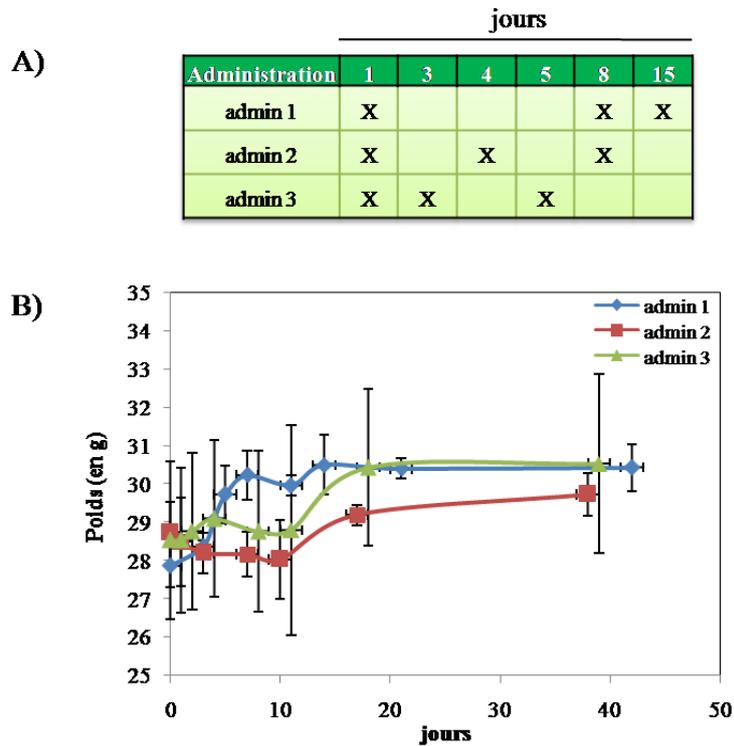


Figure 60 : Toxicité du traitement par docetaxel *in vivo*. (A) Différentes séquences d'administration ont été évaluées (admin 1 : 10mg/kg, 1 fois par semaine, 3 fois ; admin 2 : 10mg/kg, 3 fois en une semaine ; admin 3 : 10mg/kg, toutes les 48h, 3 fois). (B) Poids des souris traitées au docetaxel (n=3 par groupe). Les barres d'erreur représentent l'écart type.

1.2. Administration du docetaxel *in vivo*

Le modèle de CaP sera considéré résistant si les tumeurs progressent malgré les traitements par docetaxel. D'après la littérature, la dose maximale tolérée de docetaxel chez les souris Nude par voie intra-péritonéale (IP) se situe entre 15 et 33mg/kg [430]. Cependant, il existe peu d'études sur les xénogreffes issues de lignées de CaP qui rapportent l'utilisation de telles concentrations pour observer une activité anti-tumorale chez l'animal. Dans les travaux de Gan *et al.*, les souris portant des xénogreffes 22RV1 sont traitées à la dose de 15mg/kg de docetaxel administrée en IP, une fois par semaine pendant 3 semaines [431]. Festucia *et al.* traitent des xénogreffes de 22RV1 et de DU145 avec une dose de 10mg/kg de docetaxel selon le même protocole [432]. Enfin, il a été montré qu'une injection hebdomadaire de 7,5mg/kg de docetaxel pendant 4 semaines permet de retarder la croissance tumorale de xénogreffes de PC3 et de 22RV1 [382]. Nous avons choisi d'utiliser la dose de docetaxel de 30mg/kg administrée en 3 injections IP de 10mg/kg, qui semble être un bon compromis.

La toxicité de trois protocoles d'administration du docetaxel a été évaluée dans des souris non porteuses de tumeurs (n= 9, 3 souris par groupe) (figure 60A). Aucune perte de poids significative n'est observée 10 jours après le début des traitements (figure 60B) et aucune mortalité n'a été observé durant les 6 semaines ayant suivi le début des traitements. Le traitement de 3 injections de 10mg/kg de docetaxel pendant une semaine sera donc utilisé pour valider la résistance des modèles développés.

2. Pression pharmacologique sur des tumeurs sensibles au docetaxel

2.1. Suivi de la croissance tumorale après administration de doses croissantes de docetaxel

Le suivi de la croissance des tumeurs méxig (P0) a été réalisé par mesure de la bioluminescence (BLI) (n=8). L'ensemble des souris xénogreffées ont développé des tumeurs. La croissance de ce modèle est lente comme décrit précédemment au laboratoire [429]. Une BLI moyenne supérieure à 1.10^5 photon/seconde (p/s) correspond au seuil choisi pour le traitement des tumeurs. Après une période de stagnation autour de cette valeur seuil, une augmentation de la BLI est observée au 98^{ème} jour après xénogreffe (figure 61).

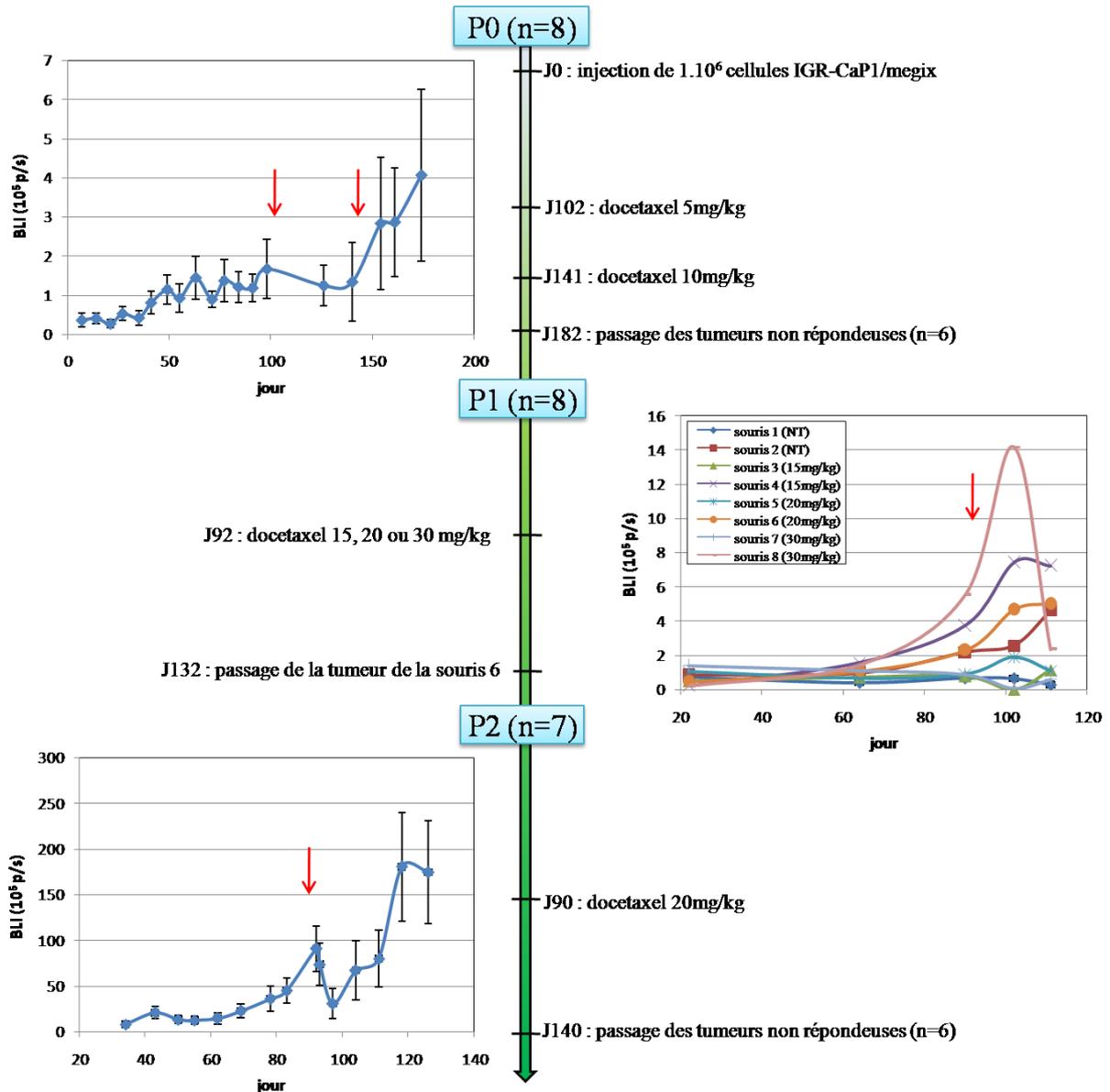


Figure 61 : Suivi de la croissance tumorale après administration de doses croissantes de docetaxel. Les tumeurs non répondeuses après un traitement au docetaxel sont réimplantées dans d'autres souris pour subir un traitement avec une dose plus importante de docetaxel. Les flèches rouges représentent les traitements au docetaxel.

Une dose de 5mg/kg de docetaxel est alors administrée aux souris par voie intra-péritonéale. Une faible réponse est observée au cours des 6 semaines suivant le traitement, cependant aucune régression tumorale n'est observée. Un second traitement avec une dose plus important de docetaxel (10mg/kg) est réalisé à J141. Une forte augmentation de la BLI des tumeurs au cours des 6 semaines suivant la seconde administration de docetaxel est observée laissant suspecter une résistance au traitement. A J192, les tumeurs non répondeuses ont été greffées dans 25 nouvelles souris.

Au premier passage (P1), seules 8 des 25 souris ont développé des tumeurs. 92 jours après le passage, les souris sont traitées par injections uniques avec 15, 20 et 30mg/kg de docetaxel. On remarque que les tumeurs ayant une BLI $< 1.10^5$ p/s au moment du traitement n'ont pas proliféré. Six semaines après le traitement, les tumeurs traitées à 15 et 20 mg/kg ne répondent pas à la drogue, alors que le traitement à 30 mg/kg entraîne une forte diminution de la BLI. La tumeur résistante à 20mg/kg de docetaxel (souris n°6) a été sélectionnée pour le deuxième passage dans 15 souris.

Au second passage, toutes les souris ont développé des tumeurs. 90 jours après les greffes, 6 souris ont été traitées avec 20 mg/kg de docetaxel. Dans les jours suivant le traitement, la BLI des tumeurs diminue sensiblement puis augmente à nouveau. Après 5 semaines de suivi, on observe que les tumeurs ne répondent pas au traitement (figure 61), suggérant que le modèle développé est résistant au docetaxel. Les tumeurs résistantes ont été passées dans 20 souris pour vérifier leur résistance au docetaxel.

2.2. Validation de la résistance au docetaxel du modèle

68 jours après le troisième passage (P3), 12 tumeurs présentaient une BLI $> 1.10^5$ p/s. Ces tumeurs ont été traitées par 3 injections de 10mg/kg de docetaxel pendant une semaine. Cependant, une mortalité générale a été observée dans la semaine suivant le traitement et seule 2 souris ont survécu. La nécropsie des souris a révélé qu'elles souffraient d'occlusion intestinale. De manière intéressante, les tumeurs des souris 2 et 3 ne répondent pas au traitement (figure 62). Les 2 tumeurs progressant sous docetaxel ont été passées dans 20 nouvelles souris Nude.

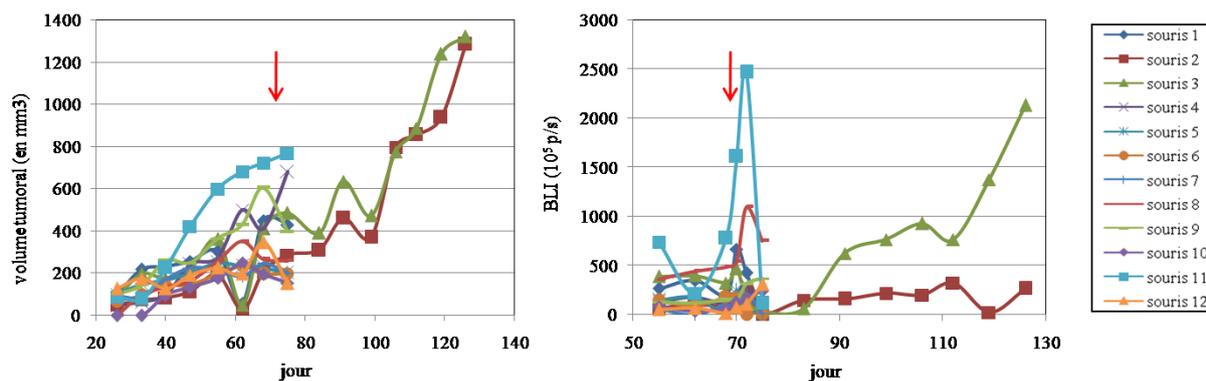


Figure 62 : Réponse au traitement par docetaxel dans les souris porteuses de tumeurs. Le volume tumoral (à gauche) et la BLI (à droite) des tumeurs au passage P3 a été suivi pendant 6 semaines. Les flèches rouges représentent le traitement au docetaxel (admin 3).

La forte toxicité du traitement 3 nous a conduit à établir un nouveau protocole d'administration du docetaxel. Des données non publiées par de Morrée *et al.* (Abstract [433]) montrent que les souris porteuses de tumeurs de CaP issues de patients supportent une dose de 33mg/kg de docetaxel en simple injection. C'est pourquoi nous avons utilisé un nouveau protocole de traitement (admin 4) consistant à traiter les souris avec une injection de 30mg/kg de docetaxel en IP toutes les 3 semaines. Ce protocole a été utilisé sur des souris porteuses de xénogreffes de cellules IGR-CaP1 sensibles au docetaxel (n=10). Ce traitement s'est avéré très efficace pour inhiber la croissance des tumeurs sensibles au docetaxel (figures 63A et 63B) et seulement 2 injections sont suffisantes pour entraîner un début de régression tumorale. Une seule injection d'une forte dose de docetaxel s'est avérée moins toxique que 3 injections successives avec une plus faible concentration. En effet, aucune mortalité ni perte de poids n'a été observée à la suite de ce nouveau protocole d'administration (figure 63C).

Au quatrième passage (P4), 16/20 tumeurs issues du passage des xénogreffes des souris P3 n°2 et 3 présentent une BLI > 1.10⁵ p/s (dont 2 sont trop volumineuses pour être incluses dans l'expérience). Les souris sont divisées en 2 groupes (n= 7) puis traitées avec 30mg/kg de docetaxel ou avec le véhicule. La croissance des tumeurs est suivie par la mesure du volume tumoral et de la BLI pendant 9 semaines, soit 3 traitements consécutifs de docetaxel. Cependant, contrairement à ce que suggéraient les résultats du passage P3, les tumeurs traitées avec le docetaxel répondent au traitement dès la première semaine, que ce soit en terme de volume tumoral ou de BLI (figure 64). L'inhibition de la croissance tumorale est maintenue durant les 9 semaines du suivi. On observe que la réponse est identique à celle observée après traitement de la lignée sensible (figure 63A), ce qui démontre que le modèle établi n'est finalement pas résistant au docetaxel.

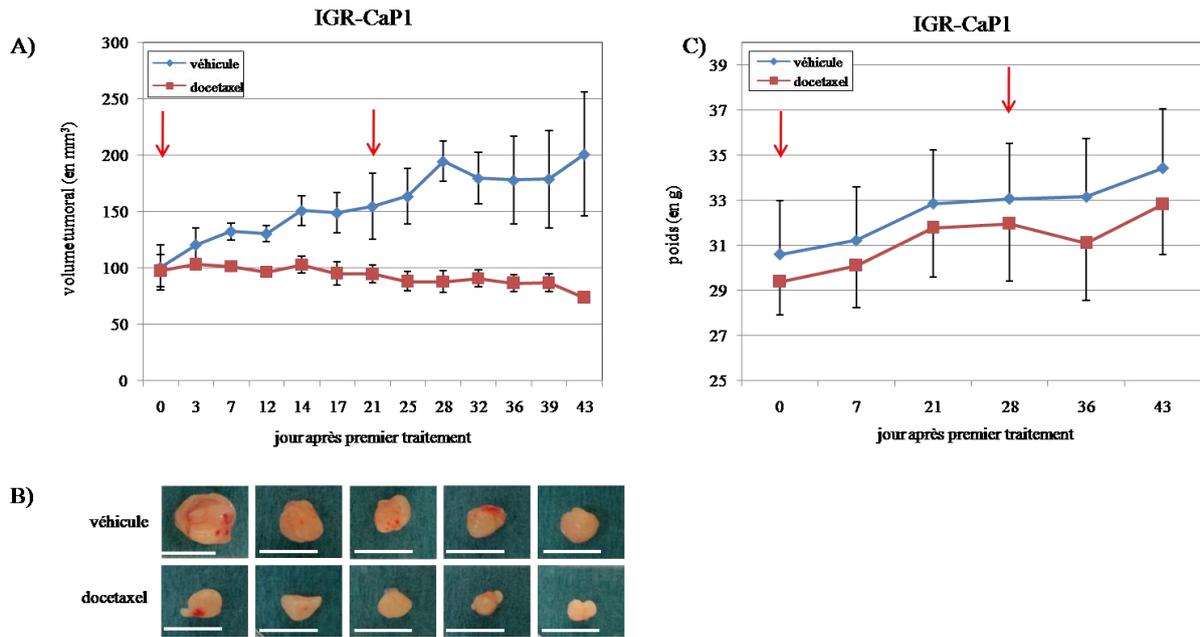


Figure 63 : Efficacité du protocole de traitement au docetaxel admin 4. Deux injections à 3 semaines d'intervalle de 30 mg/kg de docetaxel ou de véhicule ont été administrées aux souris porteuses de xéno greffes IGR-CaP1 parentales. Le volume tumoral (A) et la masse (C) des tumeurs ont été suivies pendant 6 semaines après la première injection. Les flèches rouges représentent le traitement au docetaxel. (B) Tumeurs après 6 semaines de traitement au docetaxel ou véhicule, les barres blanches indiquent 1cm.

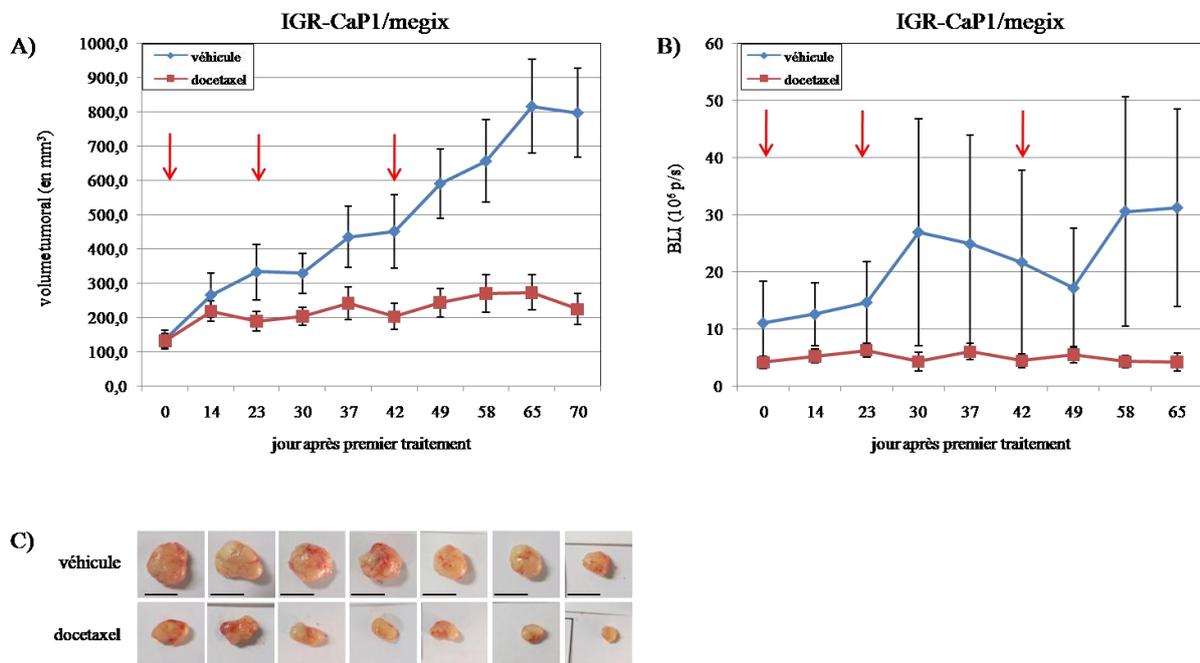


Figure 64 : Réponse au docetaxel du modèle issu des cellules IGR-CaP1/megix. Trois injections de 30 mg/kg de docetaxel ou de véhicule ont été administrées aux souris à trois semaines d'intervalle. Le volume tumoral (A) et la BLI (B) des tumeurs a été suivi pendant 9 semaines après la première injection. Les flèches rouges représentent le traitement au docetaxel. A la fin de l'expérience, les souris sont sacrifiées et les tumeurs ont été extraites, les barres noires indiquent 1cm (C).

3. Tumeurs issues de lignées résistantes au docetaxel *in vitro*

3.1. Tumorigénicité des lignées résistantes

Une expérience préliminaire réalisée au laboratoire avait montré que les cellules IGR-CaP1-R100 ne sont pas capables de former des tumeurs chez la souris, et ce même en présence de matrigel (données non présentées). Le potentiel de tumorigénicité des clones R12, R25 et R50 respectivement résistants à 12, 25 et 50nM de docetaxel a ensuite été évalué. La croissance tumorale des trois groupes (n=3 par groupe) est suivie par la mesure du volume tumoral. Au bout de 6 mois, seule une tumeur issue des cellules IGR-CaP1-R25 s'est développée (figure 65). Au vu de la croissance très lente de ce modèle, il a été décidé d'augmenter sa tumorigénicité en réalisant des passages successifs des tumeurs.

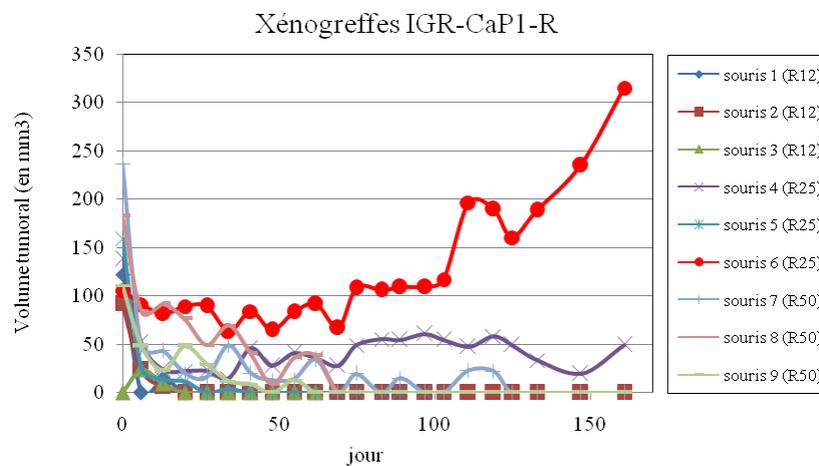


Figure 65 : Tumorigénicité des clones résistants issus de la lignée IGR-CaP1. 10 millions de cellules des clones résistants à 12, 25 et 50nM de docetaxel ont été injectés aux souris en sous-cutané. La tumorigénicité est évaluée par la mesure du volume tumoral.

3.2. Augmentation de la tumorigénicité du modèle par passages successifs

On observe que le passage des tumeurs augmente drastiquement la vitesse de la croissance tumorale (figure 66), permettant d'obtenir des tumeurs exploitables expérimentalement en 5 semaines au lieu de 6 mois. Le taux de prise des xénogreffes est lui aussi augmenté puisqu'il passe de 11% au P0 (1/9) à 95% au P5 (19/20). L'obtention d'un modèle animal à partir de matériel tumoral nécessite entre 2 et 3 passages *in vivo* [434], [435]. De manière intéressante, ceci est visible sur les courbes de croissance tumorale puisque les tumeurs du P4 et du P5 entourent la courbe du P3, montrant que le modèle a atteint sa vitesse maximale de croissance. La résistance au docetaxel de ce modèle établi à partir de la lignée IGR-CaP1-R25 résistantes *in vitro* nécessite d'être validée *in vivo*.

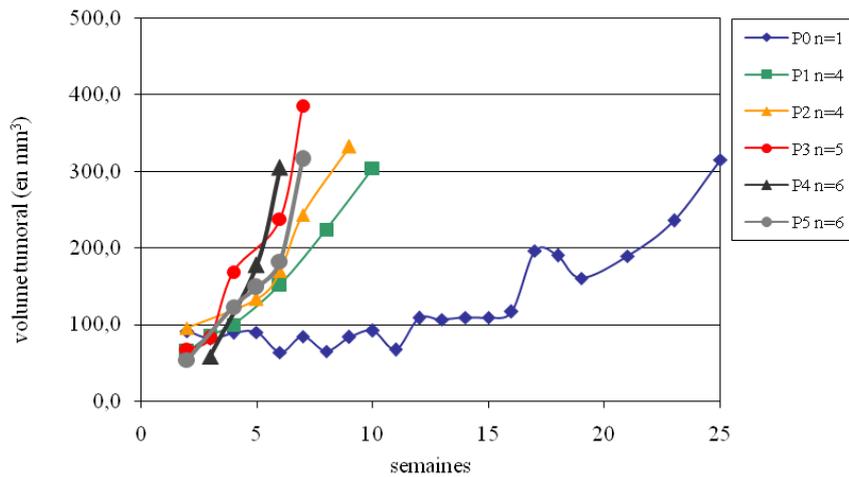


Figure 66 : Augmentation de la croissance tumorale suite à des passages successifs. Le volume tumoral a été suivi au cours des différents passages. Les courbes noire et grise représentent la croissance des tumeurs du modèle établi.

3.3. Validation de la résistance au docetaxel

Pour étudier la réponse au docetaxel de ce second modèle, 10 souris xéno greffées (P5) ont reçu le traitement admin 4 (n= 5) ou le véhicule (n= 5) lorsque le volume tumoral atteint 100mm³. On observe que les tumeurs ne répondent pas aux traitements successifs de docetaxel, et ce jusqu'à 4 semaines après la troisième injection (figure 67). La différence de croissance tumorale entre les souris traitées par le docetaxel et les souris contrôles n'est pas significative (p = 0,598). Ces données montrent que le docetaxel n'est pas efficace pour empêcher la croissance tumorale et valident la résistance du modèle *in vivo* obtenu à partir des lignées IGR-CaP1-R25.

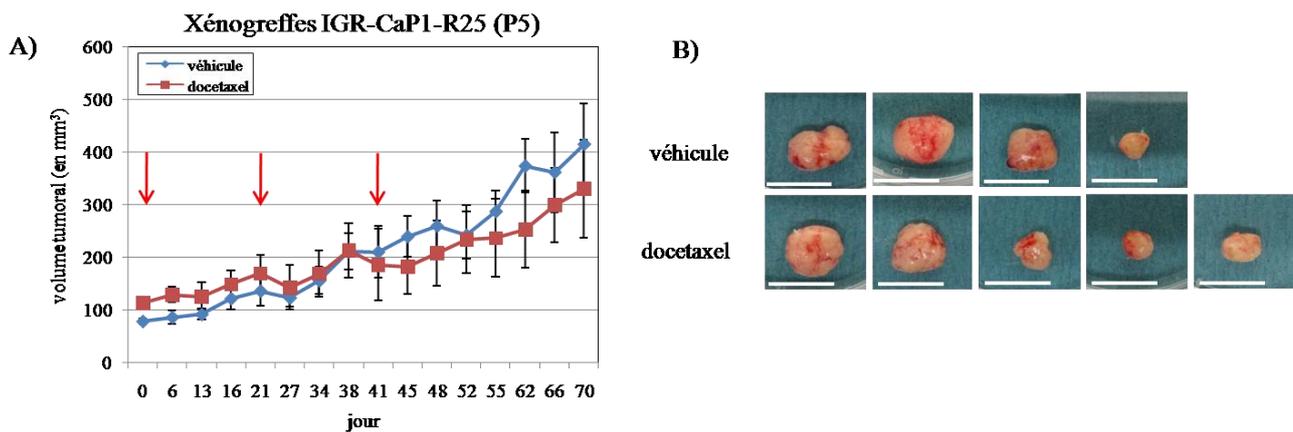


Figure 67 : Réponse au docetaxel du modèle issu des cellules IGR-CaP1-R25. Les tumeurs sont traitées selon le protocole admin 4 (flèches). Seules 4/5 tumeurs traitées avec le véhicule ont été analysée. Le volume tumoral est suivi pendant 9 semaines (A). En fin d'expérience, les tumeurs sont extraites (B).

4.2. Expression de l'E-cadhérine dans les tumeurs

L'expression de l'E-cadhérine a été mesurée dans les tumeurs prélevées à différents passages. On observe que les tumeurs issues de la lignée résistante *in vitro* expriment faiblement la protéine par rapport à son expression dans une tumeur issue de cellules IGR-CaP1 sensibles (figure 69). Le niveau d'expression de l'E-cadhérine est maintenu au cours des passages. Au contraire, les tumeurs issues de la lignée IGR-CaP1/megix expriment l'E-cadhérine à tous les passages. La différence d'expression d'E-cadhérine entre les 2 modèles *in vivo* suggère que la réponse au docetaxel des tumeurs megix serait due au fait qu'elles ne présentent pas de phénotype mésenchymateux.

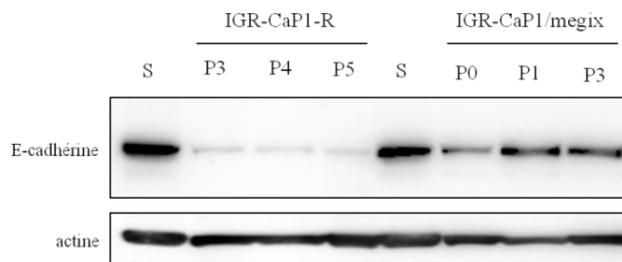


Figure 69 :Expression de l'E-cadhérine dans les tumeurs au cours des passages. L'expression de l'E-cadhérine est observée par western blot. S : tumeur issue de la lignée parentale IGR-CaP1, utilisée comme référence. L'actine est utilisée comme témoin de charge.

4.3. Expression des marqueurs d'EMT dans les tumeurs résistantes au docetaxel

L'étude de l'expression des marqueurs d'EMT a été réalisée par western blot dans une tumeur IGR-CaP1 sensible et dans une tumeur IGR-CaP1 résistante au docetaxel. On observe une forte expression de la Vimentine dans les deux tumeurs (figure 70), ce qui corrèle avec les résultats obtenus *in vitro*. De plus, on observe une balance des cadhérines dans les tumeurs résistantes. L'apparition des marqueurs mésenchymateux est associée à la diminution d'expression de SHISA3. De façon surprenante, les tumeurs résistantes et sensibles expriment la même quantité de plakoglobine, suggérant que les desmosomes sont conservés dans les tumeurs *in vivo*. Ces données montrent que le phénotype mésenchymateux des lignées résistantes est conservé au cours des passages chez la souris et que l'EMT est fortement associée à la résistance de notre modèle.

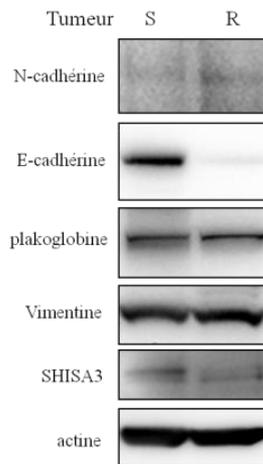


Figure 70 : Expression des marqueurs d'EMT dans les tumeurs résistantes au docetaxel. L'expression des marqueurs est observée par western blot. L'actine est utilisée comme témoin de charge.

Les tumeurs résistantes au docetaxel ont été remises en culture. La lignée cellulaire obtenue, appelé IGR-CaP1-R vivo, permet de conserver efficacement et durablement le modèle. De plus, l'amplification des cellules *in vitro* permet d'établir des protocoles sur un grand nombre de souris en un minimum de temps. Enfin, les variations expérimentales dues à l'hétérogénéité intra-tumorale pourraient être diminuées du fait que l'ensemble des souris peut être injectée avec la même population cellulaire. Les caractéristiques de ce modèle sont décrites ci-dessous.

5. Le modèle cellulaire IGR-CaP1-R vivo

5.1. Caractérisation de la lignée IGR-CaP1-R vivo

Les cellules IGR-CaP1-R vivo ont une morphologie différente de la lignée sensible IGR-CaP1. On peut observer de nombreuses projections cellulaires dans la lignée résistante, alors que les cellules sensibles n'expriment pas ou peu de ces structures même en condition de faible confluence (figure 71A). Les cellules IGR-CaP1-R vivo ont aussi une taille plus importante que la lignée parentale, ce qui a été confirmé par cytométrie en flux (FSC). La granularité (SSC) des cellules ne semble pas significativement différente, indiquant que les cellules présentent la même complexité cellulaire (densité en organelle, irrégularités internes...). La cytométrie en flux permet de confirmer que la population cellulaire est homogène (figure 71B). De plus, les cellules IGR-CaP1-R vivo ont conservé le phénotype mésenchymateux des tumeurs dont elles sont issues après mise en culture

(figure71C). L'ensemble de ces données montrent que la lignée obtenue après remise en culture des xénogreffes IGR-CaP1 résistantes au docetaxel a conservé les caractéristiques des tumeurs.

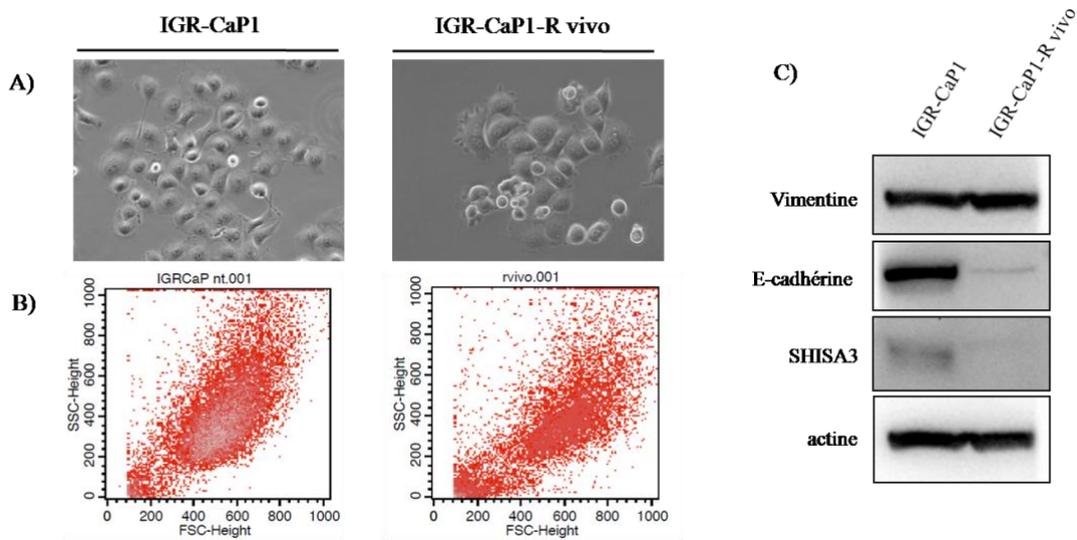


Figure 71 : Caractérisation des cellules IGR-CaP1-R vivo. Photos prises en contraste de phase au grossissement 40X (A). La taille et la granularité des cellules ont été évaluées par cytométrie en flux (B). Western blot des marqueurs d'EMT (C)

5.2. Résistance au docetaxel *in vitro*

Les cellules remises en culture ont été traitées avec une gamme de concentration de docetaxel durant 72h. On observe une forte augmentation de l'IC50 des cellules IGR-CaP1-R vivo par rapport à la lignée sensible (4,1nM contre 303,3nM) (figure 72). Ces résultats montrent que la lignée IGR-CaP1-R vivo issue de tumeurs remises en culture conserve l'ensemble des caractéristiques des tumeurs observées *in vivo*.

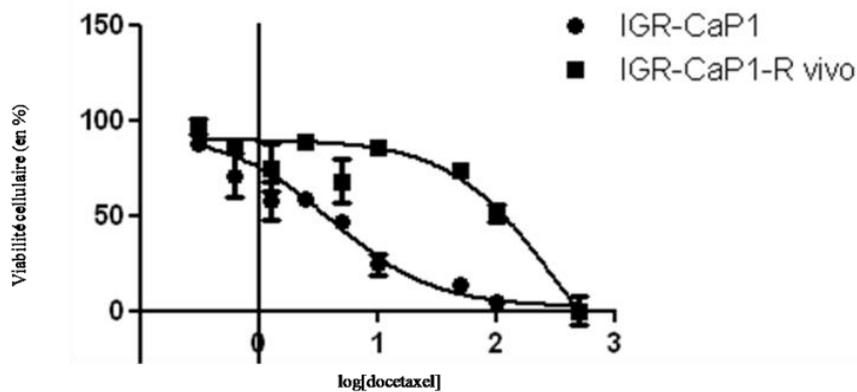


Figure 72 : Résistance au docetaxel de la lignée IGR-CaP1-R vivo comparé à la lignée sensible. La viabilité cellulaire est mesurée en utilisant le WST-1. Les courbes et le calcul des IC50 ont été réalisés à l'aide du logiciel graphpad prism.

5.3. Tumorigénicité des cellules IGR-CaP1-R vivo.

Des tumeurs d'environ 100mm³ ont été obtenues 2 semaines après les xénogreffes (figure 73A). De manière intéressante, les tumeurs sont de taille relativement homogène (figure 73B). La validation de la tumorigénicité de la lignée IGR-CaP1-R vivo est essentielle puisqu'elle confirme la réussite de la mise en culture du modèle tumoral.

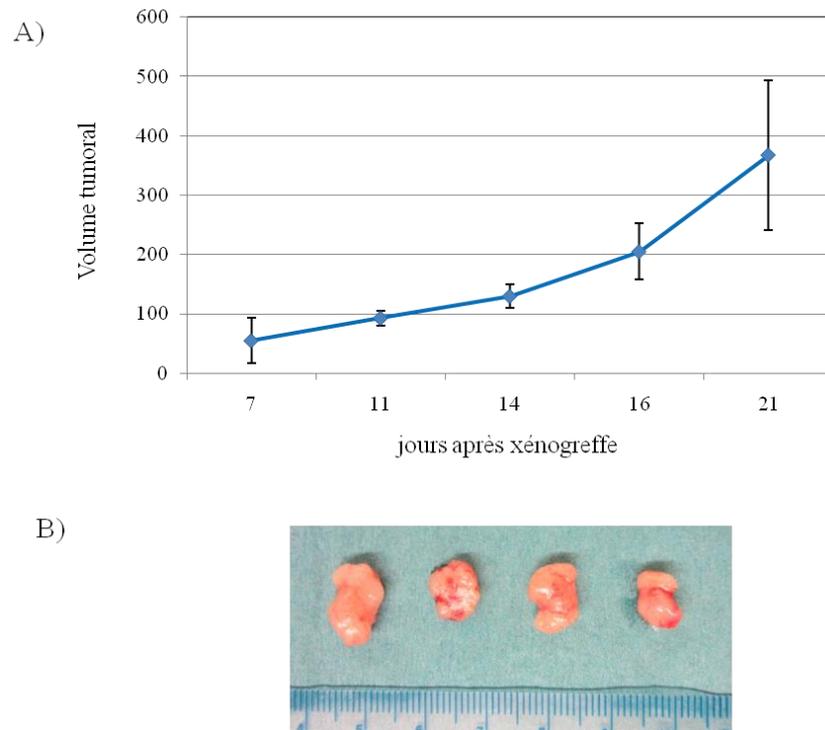


Figure 73 : Croissance des xénogreffes IGR-CaP1-R vivo. La croissance tumorale a été suivie jusqu'à 4 semaines après l'injection des cellules (A). Les barres d'erreur représentent les écart-types entre les valeurs. Les tumeurs ont été extraites à la fin du protocole (B).

6. Discussion

L'utilisation de modèles précliniques est essentielle pour le développement de drogues anticancéreuses. Peu de modèles de CaP résistants au docetaxel existent, et aucun n'est utilisé comme référence. Au début de l'établissement de notre propre modèle, deux stratégies ont été utilisées en parallèle. Ce choix a été guidé par le fait que le taux d'échec lors du développement d'un modèle *in vivo* demeure élevé. De plus, le temps est un paramètre important pour l'établissement d'un tel modèle.

La première stratégie a consisté à traiter les souris porteuses de tumeurs issues de lignées sensibles avec des doses croissantes de docetaxel. Ce procédé est généralement utilisé pour obtenir des lignées cellulaires résistantes *in vitro*. La lignée IGR-CaP1/megix, dont la tumorigénèse a été caractérisée au laboratoire, a été choisie pour sa capacité à recréer les stades avancés du CaP, notamment les métastases osseuses de type mixte. La lignée 22RV1 aurait également pu être utilisée puisqu'elle possède les mêmes caractéristiques [436], cependant le modèle résistant n'avait pas encore été établi à ce moment. L'autre avantage d'utiliser le modèle IGR-CaP1 vient du fait que les mécanismes de résistance au docetaxel de ce modèle ont été étudiés *in vitro*, nous permettant d'étudier *in vivo* les nouvelles cibles thérapeutiques identifiées au laboratoire. Cependant, malgré des résultats encourageants lors de l'administration croissante de docetaxel, cette stratégie n'a pas permis d'obtenir un modèle de CaP résistant au docetaxel. Cet échec illustre la difficulté d'obtenir un modèle résistant *in vivo*. Plusieurs pistes peuvent expliquer cet échec. Le seuil utilisé pour débiter le traitement au docetaxel était basé sur la bioluminescence des tumeurs. Il s'est finalement avéré que le volume tumoral correspondant au seuil de bioluminescent choisi était trop important pour observer une réponse à la drogue. En effet, il a été montré que les tumeurs trop volumineuses possèdent des zones d'hypoxie qui peuvent conférer une résistance au docetaxel. L'utilisation d'un volume tumoral maximum de 150mm³ comme seuil pour le traitement au docetaxel aurait pu permettre une sélection efficace et l'établissement du modèle. De plus, il est possible que l'administration unique d'une faible dose de docetaxel n'ait détruit que les cellules situées à la périphérie de la tumeur sans induire de dommages aux cellules situées plus en profondeur. Enfin, en l'absence de pression pharmacologique efficace, les cellules tumorales n'ont pas acquis le phénotype mésenchymateux nécessaire pour survivre au traitement par docetaxel.

La deuxième stratégie a consisté à développer des xénogreffes issues de cellules résistantes *in vitro*. L'observation la plus étonnante est la très faible tumorigénicité de l'ensemble des clones résistants. Nous avons fait la même observation au laboratoire avec le modèle PC3-R12. Les cellules mésenchymateuses sont caractérisées par une augmentation des capacités migratoires et invasives, cependant il n'existe pas de consensus clair sur le rôle de l'EMT dans la prolifération cellulaire. Cela

pourrait être dû au fait que l'inducteur d'EMT le plus utilisé *in vitro* est le TGF β , qui est lui-même un inhibiteur de la prolifération cellulaire. De manière intéressante, les travaux d'Evdokimova *et al.* ont montré que l'EMT induite par la surexpression de la protéine YB-1 entraîne une augmentation de la migration cellulaire associée à une inhibition de la prolifération [437]. Ces résultats correspondent à la théorie selon laquelle les cellules mésenchymateuses ayant migré au site métastatique réalisent une transition inverse (MET). Celle-ci leur permettrait non seulement d'augmenter l'adhérence aux cellules stromales, mais aussi d'augmenter leur prolifération ce qui est essentiel au développement de la métastase. *In vivo*, la surexpression du miR-200c diminue la tumorigénicité des xénogreffes de lignées de cancer de l'ovaire en induisant une réversion vers un phénotype épithélial [438]. Cependant, d'autres travaux ont montré que l'induction de la MET par l'intermédiaire de la surexpression de Klf4 (Kruppel-like factor 4) ne modifie ni le poids ni la taille des xénogreffes de cellules mésenchymateuses de cancer du foie [439]. Enfin, il a été montré que le microenvironnement joue un rôle primordial dans la tumorigénicité des xénogreffes. En effet, il a été montré que la prolifération de xénogreffes issues de cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de tissus cancéreux de colon est dépendante de la sécrétion d'IL-6 par le microenvironnement [440]. Les cellules résistantes IGR-CaP1 présentant à la fois des caractéristiques de cellules souches et mésenchymateuses, il est possible que le microenvironnement, et donc le site d'injection de ces cellules, soit important pour leur prolifération.

Une autre caractéristique intéressante du modèle IGR-CaP1-R *vivo* est sa capacité à conserver son phénotype mésenchymateux au cours des passages. Cette propriété est différente du phénomène décrit par Chaffer *et al.* dans lequel des passages successifs de tumeurs mésenchymateuses entraînent une réversion partielle vers un phénotype épithélial [303]. Cette capacité à garder le phénotype mésenchymateux malgré les passages successifs pourrait provenir d'un mécanisme développé par les cellules résistantes. De manière intéressante, la mise en culture des tumeurs résistantes n'influe également pas sur l'expression des marqueurs mésenchymateux. L'obtention d'une lignée capable d'être cultivée *in vitro* est essentielle pour l'établissement d'un modèle de référence. En plus de permettre une conservation dans de meilleures conditions, l'utilisation d'une lignée permet d'augmenter la reproductibilité des résultats. Cette propriété a été vérifiée lors du test de tumorigénicité de la lignée IGR-CaP1-R *vivo*, au cours duquel l'ensemble des souris a développé des tumeurs de tailles similaires.

Enfin, l'un des résultats les plus intéressants dans la cadre de ma thèse a été l'observation d'une corrélation entre l'expression de *SHISA3* dans les tumeurs et leur réponse au docetaxel *in vivo*. Ces données suggèrent que *SHISA3* pourrait être un marqueur de réponse au traitement par docetaxel chez les patients. Dans la mesure où il a été montré au laboratoire que les cellules résistantes au docetaxel présentent une résistance au cabazitaxel (données non montrées), il est possible que *SHISA3* puisse être un biomarqueur général de résistance aux taxanes. Cependant, le manque d'anticorps

disponibles en IHC n'a pas permis de confirmer cette hypothèse. Une autre approche serait de mesurer l'expression des marqueurs d'EMT comme la perte d'E-cadhérine ou l'expression de ZEB1. Cependant, le marquage de ces protéines dans les biopsies de cancer de la prostate donne des résultats contradictoires selon les études [423]. De plus, ces marqueurs ne sont pas indépendants du score de Gleason, n'offrant aucune alternative pour la prédiction de la réponse au docetaxel dans le cancer de la prostate.

Discussion générale

Le traitement des patients CRPC résistants au docetaxel a été notablement amélioré au cours de ces quatre dernières années. Le développement de nouvelles thérapies a été rendu possible grâce à une meilleure connaissance des mécanismes de résistance mis en place au cours de la progression du CRPC. Trois traitements (le cabazitaxel, l'acétate d'abiratéron et l'enzalutamide), actuellement utilisés en clinique, ont montré un bénéfice de survie chez les patients progressant sous docetaxel. La tendance actuelle est l'utilisation de ces hormonothérapies de nouvelle génération en première ligne de traitement des CRPC en remplacement de la chimiothérapie par docetaxel, moins bien tolérée par les patients. Toutefois, une proportion importante des patients qui progressent après une première ligne d'hormonothérapie par l'abiratéron ne répondent pas au docetaxel, suggérant que les cellules tumorales développent des mécanismes de résistance croisée [441]. De même, une moindre efficacité de l'enzalutamide est observée chez les patients CRPC ayant préalablement reçu du docetaxel [442]. *In vitro*, il a récemment été montré que les cellules de CaP résistantes à l'abiratéron ne répondent ni au docetaxel ni au cabazitaxel, de même pour les cellules résistantes à l'enzalutamide [443]. De plus, les auteurs ont montré que les traitements au docetaxel et au cabazitaxel perturbent le transport nucléaire du AR, suggérant que la signalisation des androgènes est importante pour la résistance croisée observée dans ces modèles cellulaires. Ces données démontrent l'importance d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques indépendantes de la signalisation des androgènes.

Dans cette optique, de nombreuses études sans a priori à partir de micro-arrays ont démontré que la résistance aux taxanes est multifactorielle. Nous avons vu en introduction que la chimiorésistance implique des mécanismes complexes (figure 74). Au laboratoire, nous avons notamment montré que nos modèles résistants au docetaxel expriment la P-gp, mais son inhibition ne sensibilise que partiellement ces cellules à la chimiothérapie. L'intégration des données d'expression de gènes et de miRs potentiellement impliqués dans la résistance nous a permis d'identifier l'EMT comme un mécanisme de résistance au docetaxel dans les lignées IGR-CaP1-R et PC3-R. En comparaison avec les lignées parentales, les lignées résistantes sont caractérisées par l'expression des marqueurs mésenchymateux ZEB1, Vimentine et N-cadhérine ainsi que par la perte des protéines de jonctions cellulaires. Cibler l'EMT est une stratégie très intéressante d'un point de vue clinique, puisque ce processus semble également impliqué dans la résistance aux hormonothérapies [444], [445], l'EMT pouvant alors participer au mécanisme de résistance croisée.

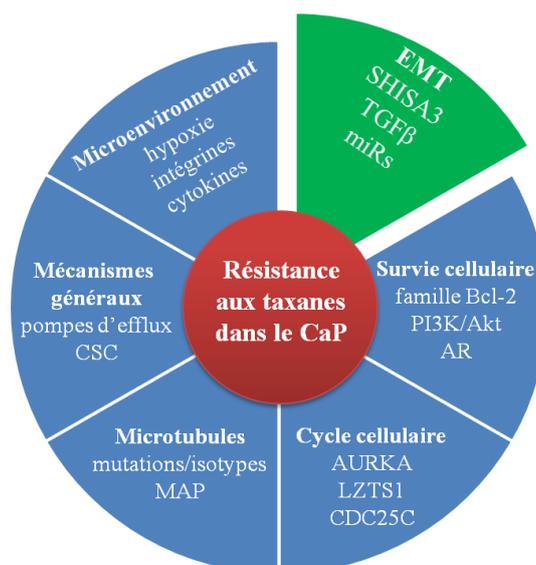


Figure 74 : Synthèse des mécanismes de résistance au docetaxel dans le CaP

Au cours de ce travail de thèse, un nouveau gène impliqué dans l'induction de l'EMT a été découvert. SHISA3 est un gène impliqué dans le développement embryonnaire qui est sous-exprimé dans les cellules de CaP résistantes au docetaxel. L'inhibition de SHISA3 avec un siARN dans les lignées parentales sensibles entraîne la dégradation des jonctions cellulaires, l'expression des marqueurs mésenchymateux et augmente les capacités migratoires des cellules. Initialement décrit comme un inhibiteur des récepteurs FZD et FGFR, nos travaux ont démontré que SHISA3 interagit avec le récepteur TGF β RII dans nos modèles cellulaires. Cependant, le mécanisme par lequel SHISA3 inhibe ce récepteur reste encore à élucider. Nous avons montré que SHISA3 est associé à la forme mature du récepteur TGF β RII, suggérant que l'interaction entre les deux protéines s'effectue dans un premier temps au niveau de la membrane plasmique. L'étude de la localisation de TGF β RII et de SHISA3 en microscopie confocale montre que les deux protéines co-localisent également dans des vésicules périnucléaires. L'analyse bioinformatique des séquences de la famille *SHISA* montre que SHISA3 possède un motif PY lui permettant d'interagir avec des E3 ubiquitine ligase de la famille NEDD4. Cette famille comprend les ubiquitine ligases SMURF1 et SMURF2, des protéines essentielles dans les phases précoces de l'EMT et la régulation de la voie du TGF β . En particulier, SMURF2 est impliqué dans le mécanisme d'inhibition du complexe TGF β R/II par SMAD7 [446]. Le complexe TGF β R/SMAD7/SMURF2 est ensuite internalisé dans des vésicules de cavéoline afin d'être dégradé [447], [448]. Il est possible que les vésicules que nous observons en immunofluorescence correspondent à l'internalisation du complexe TGF β R/II/SHISA3 au sein des vésicules riches en cavéoline. Le fait que la protéine endogène soit particulièrement difficile à solubiliser pourrait être dû à sa localisation dans ces vésicules composées de radeaux lipidiques. Enfin, des données récentes obtenues au laboratoire montrent que le récepteur TGF β RII n'est pas ubiquitiné dans la lignée IGR-

CaP1-R, contrairement à ce qui est observé dans la lignée sensible. Ces données nous permettent de proposer l'hypothèse selon laquelle SHISA3 pourrait être impliqué dans la destruction du complexe TGF β RI/II en interagissant avec le récepteur TGF β RII et l'ubiquitine ligase SMURF2 (figure 75).

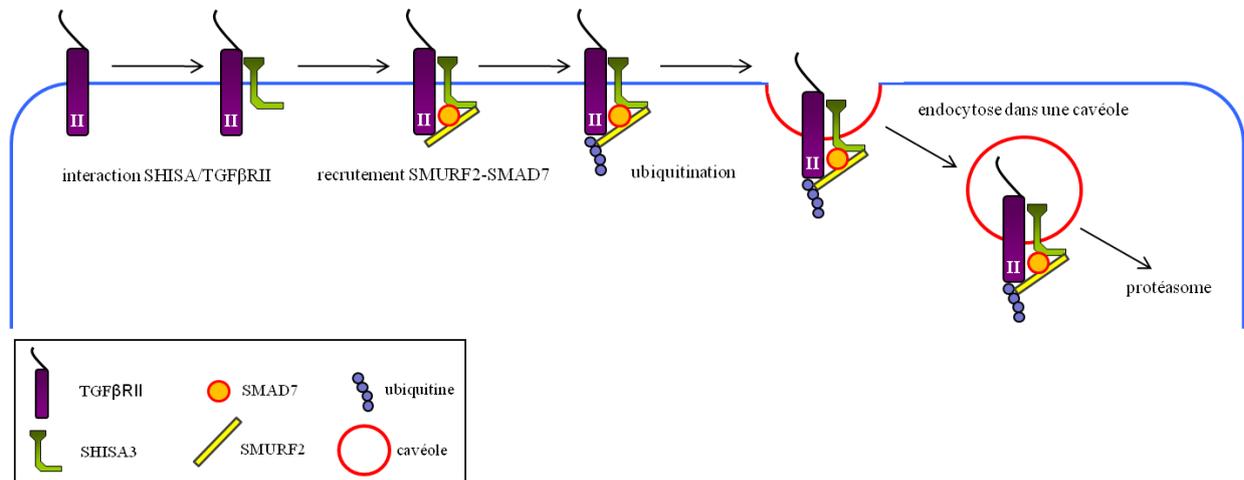


Figure 75 : Hypothèse sur le mécanisme d'action moléculaire de SHISA3

L'absence de SHISA3 dans les cellules résistantes au docetaxel présentant un phénotype mésenchymateux nous empêche de considérer SHISA3 comme une cible thérapeutique directe. Cependant, il est possible de simuler son effet en inhibant la voie du TGF β . Les inhibiteurs spécifiques de TGF β RII existants n'ayant jamais été utilisés en clinique, nous avons choisi d'étudier l'effet d'un inhibiteur de l'activité kinase de TGF β RI. Le LY2157299 a montré une efficacité prometteuse dans le traitement de xénogreffes de cancer du sein résistantes au paclitaxel et il est actuellement évalué dans plusieurs essais cliniques de phase II. Nous avons observé que le prétraitement au LY2157299 sensibilise les cellules IGR-CaP1-R au docetaxel, montrant l'importance de la voie de signalisation du TGF β dans la résistance au docetaxel de nos lignées. Si nous arrivons à valider l'efficacité de cet inhibiteur dans notre modèle animal résistant au docetaxel, nos résultats pourraient rapidement être transférés en clinique chez les patients réfractaires au docetaxel.

L'expression des miRs qui participent à la régulation de l'EMT a également été étudiée dans les cellules résistantes au docetaxel présentant un phénotype mésenchymateux. La surexpression de miR-31 et la sous-expression du cluster miR-141/200c ont été observées dans les deux lignées résistantes IGR-CaP1-R et PC3-R. Le ciblage de l'expression des miRs dans les tumeurs solides est un axe thérapeutique prometteur dans le traitement des résistances aux chimiothérapies liées à l'EMT [449], [226]. Les stratégies visant les miRs ont conduit au développement de nouvelles molécules comme les nanoparticules d'adressage de miRs et les LNA (locked nucleic acid). Les LNA sont des

oligonucléotides complémentaires des miRs modifiés pour augmenter leur stabilité, ce qui permet leur administration *in vivo* [450]. Les LNA sont intéressants pour induire l'expression d'une protéine en ciblant son miR régulateur. Le site de prédiction targetscan (www.targetscan.org) a permis d'identifier le miR-590-3p comme un inhibiteur potentiel de SHISA3. Ce miR est surexprimé dans les tissus de cancer du foie et participe à la progression tumorale [451]. Cependant son expression dans nos modèles cellulaires reste inconnue, ce miR étant absent des cartes TLDA utilisées. Néanmoins, ces données constituent un axe de recherche intéressant.

En parallèle de l'étude SHISA3, un modèle de CaP résistant au docetaxel a été établi *in vivo* à partir de cellules IGR-CaP1 résistantes *in vitro*. Ce modèle est caractérisé par l'expression de marqueurs mésenchymateux associés à la perte d'expression de SHISA3 et permettra l'évaluation préclinique de nouvelles cibles thérapeutiques identifiées au laboratoire, tels que le TGF β R2 et CHK1 [133]. Ce modèle tumoral a été remis en culture avec succès, les cellules conservant leur phénotype mésenchymateux, la perte d'expression de SHISA3 et leur résistance au docetaxel. L'obtention d'un modèle disponible à la fois *in vitro* et *in vivo* permet également d'envisager des stratégies basées sur la transfection stable, autorisant l'étude de l'expression ou de l'inhibition de gènes cibles *in vivo* et l'obtention d'un modèle de résistance bioluminescent. L'injection intra-osseuse de cellules bioluminescentes résistantes au docetaxel permettra de reproduire au mieux les stades avancés du CaP métastatique résistant au docetaxel tout en suivant la croissance tumorale.

Enfin, l'expression de SHISA3 pourrait être utilisée comme biomarqueur prédictif de réponse au docetaxel. En effet, nous avons pu montrer que l'expression du gène est corrélée à la réponse à la chimiothérapie *in vivo*. De plus, les résultats publiés cet été par Chen *et al.* ont montré que l'expression de SHISA3 chez les patients atteints de NSCLC est associée à une meilleure survie globale et une meilleure survie sans progression. Il n'existe à ce jour aucune étude clinique publiée visant à traiter les patients chimiorésistants avec des stratégies ciblant l'EMT (seule une phase I en recrutement : NCT01999972). Les études réalisées jusqu'à présent dans les tumeurs de prostate pour corréler l'expression des marqueurs d'EMT (E-cadherine, Vimentine, Zeb1...) avec la progression tumorale n'ont pas réussi à identifier un biomarqueur qui soit indépendant du score de Gleason. Ces marqueurs n'apportent donc aucune information supplémentaire par rapport aux critères classiquement utilisés par les pathologistes et ne donnent aucune information sur la réponse au traitement. Nos résultats suggèrent que la perte d'expression de SHISA3 est un événement précoce de l'EMT. Il est donc possible que le niveau d'expression de SHISA3 permette de discriminer, de façon précoce, les patients répondeurs ou non-répondeurs et ainsi éviter les traitements inutiles. Il est donc important de valider l'expression de SHISA3 comme biomarqueur de réponse au docetaxel sur des cohortes de patients atteints de CaP inclus dans les essais qui évaluent l'efficacité des taxanes (docetaxel et cabazitaxel).

Références bibliographiques

- [1] J. E. McNeal, E. A. Redwine, F. S. Freiha, and T. A. Stamey, "Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread.," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 12, no. 12, pp. 897–906, Dec. 1988.
- [2] J. E. McNeal, O. Haillot, and C. Yemoto, "Cell proliferation in dysplasia of the prostate: analysis by PCNA immunostaining.," *Prostate*, vol. 27, no. 5, pp. 258–68, Nov. 1995.
- [3] Y. Wang, K. Wang, D. C. Jette, and D. S. Wishart, "Production of an anti-prostate-specific antigen single-chain antibody fragment from *Pichia pastoris*.," *Protein Expr. Purif.*, vol. 23, no. 3, pp. 419–25, Dec. 2001.
- [4] G. S. Prins, L. Birch, and G. L. Greene, "Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate.," *Endocrinology*, vol. 129, no. 6, pp. 3187–99, Dec. 1991.
- [5] R. Buttyan, A. Shabsigh, H. Perlman, and M. Colombel, "Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 10, no. 2, pp. 47–54, Mar. 1999.
- [6] N. Vashchenko and P.-A. Abrahamsson, "Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities.," *Eur. Urol.*, vol. 47, no. 2, pp. 147–55, Feb. 2005.
- [7] G. D. Y. L. and P. g L. Mandeep Singh, *Advances in Prostate Cancer*. InTech, 2013.
- [8] M. E. Kaighn, K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, and L. W. Jones, "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).," *Invest. Urol.*, vol. 17, no. 1, pp. 16–23, Jul. 1979.
- [9] K. R. Stone, D. D. Mickey, H. Wunderli, G. H. Mickey, and D. F. Paulson, "Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145).," *Int. J. Cancer*, vol. 21, no. 3, pp. 274–81, Mar. 1978.
- [10] J. S. Horoszewicz, S. S. Leong, T. M. Chu, Z. L. Wajsman, M. Friedman, L. Papsidero, U. Kim, L. S. Chai, S. Kakati, S. K. Arya, and A. A. Sandberg, "The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma.," *Prog. Clin. Biol. Res.*, vol. 37, pp. 115–32, Jan. 1980.
- [11] R. E. Sobel and M. D. Sadar, "Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1.," *J. Urol.*, vol. 173, no. 2, pp. 342–59, Feb. 2005.
- [12] R. M. Sramkoski, T. G. Pretlow, J. M. Giaconia, T. P. Pretlow, S. Schwartz, M. S. Sy, S. R. Marengo, J. S. Rhim, D. Zhang, and J. W. Jacobberger, "A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1.," *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, vol. 35, no. 7, pp. 403–9.
- [13] A. Chachereau, N. Al Nakouzi, C. Gaudin, S. Le Moulec, D. Compagno, N. Auger, J. Bénard, P. Opolon, F. Rozet, P. Validire, G. Fromont, and K. Fizazi, "Stemness markers characterize IGR-CaP1, a new cell line derived from primary epithelial prostate cancer.," *Exp. Cell Res.*, vol. 317, no. 3, pp. 262–75, Feb. 2011.
- [14] S. W. Hayward, R. Dahiya, G. R. Cunha, J. Bartek, N. Deshpande, and P. Narayan, "Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1.," *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, vol. 31, no. 1, pp. 14–24, Jan. 1995.
- [15] D. Bello, M. M. Webber, H. K. Kleinman, D. D. Wartinger, and J. S. Rhim, "Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18.," *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 6, pp. 1215–23, Jun. 1997.
- [16] E. Corey, J. E. Quinn, K. R. Buhler, P. S. Nelson, J. A. Macoska, L. D. True, and R. L. Vessella, "LuCaP 35: a new model of prostate cancer progression to androgen independence.," *Prostate*, vol. 55, no. 4, pp. 239–46, Jun. 2003.
- [17] M. Nagabhushan, C. M. Miller, T. P. Pretlow, J. M. Giaconia, N. L. Edgehouse, S. Schwartz, H. J. Kung, R. W. de Vere White, P. H. Gumerlock, M. I. Resnick, S. B. Amini, and T. G. Pretlow, "CWR22: the first human prostate cancer xenograft with strongly androgen-dependent and relapsed strains both in vivo and in soft agar.," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 13, pp. 3042–6, Jul. 1996.
- [18] D. G. Bostwick, H. B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S. Ho, J. Landolph, H. Morrison, B. Sonawane, T. Shifflett, D. J. Waters, and B. Timms, "Human prostate cancer risk factors.," *Cancer*, vol. 101, no. 10 Suppl, pp. 2371–490, Nov. 2004.
- [19] S. B. Shappell, G. V. Thomas, R. L. Roberts, R. Herbert, M. M. Ittmann, M. A. Rubin, P. A. Humphrey, J. P. Sundberg, N. Rozengurt, R. Barrios, J. M. Ward, and R. D. Cardiff, "Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee.," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 6, pp. 2270–305, Mar. 2004.
- [20] C. Abate-Shen, "Molecular genetics of prostate cancer.," *Genes Dev.*, vol. 14, no. 19, pp. 2410–2434, Oct. 2000.
- [21] A. M. De Marzo, E. A. Platz, S. Sutcliffe, J. Xu, H. Grönberg, C. G. Drake, Y. Nakai, W. B. Isaacs, and W. G. Nelson, "Inflammation in prostate carcinogenesis.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 4, pp. 256–69, Apr. 2007.
- [22] M. M. Shen and C. Abate-Shen, "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges.," *Genes Dev.*, vol. 24, no. 18, pp. 1967–2000, Sep. 2010.

- [23] E. Mazaris and A. Tsiotras, "Molecular pathways in prostate cancer," *Nephrourol. Mon.*, vol. 5, no. 3, pp. 792–800, Jul. 2013.
- [24] J. R. Smith, D. Freije, J. D. Carpten, H. Grönberg, J. Xu, S. D. Isaacs, M. J. Brownstein, G. S. Bova, H. Guo, P. Bujnovszky, D. R. Nusskern, J. E. Damber, A. Bergh, M. Emanuelsson, O. P. Kallioniemi, J. Walker-Daniels, J. E. Bailey-Wilson, T. H. Beaty, D. A. Meyers, P. C. Walsh, F. S. Collins, J. M. Trent, and W. B. Isaacs, "Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search," *Science*, vol. 274, no. 5291, pp. 1371–4, Nov. 1996.
- [25] G. Casey, P. J. Neville, S. J. Plummer, Y. Xiang, L. M. Krumroy, E. A. Klein, W. J. Catalona, N. Nupponen, J. D. Carpten, J. M. Trent, R. H. Silverman, and J. S. Witte, "RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases," *Nat. Genet.*, vol. 32, no. 4, pp. 581–3, Dec. 2002.
- [26] C. Cybulski, T. Huzarski, B. Górski, B. Masojć, M. Mierzejewski, T. Debniak, B. Gliniewicz, J. Matyjasik, E. Złowocka, G. Kurzawski, A. Sikorski, M. Posmyk, M. Szwiec, R. Czajka, S. A. Narod, and J. Lubiński, "A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 8, pp. 2677–9, Apr. 2004.
- [27] E. Levy-Lahad and E. Friedman, "Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers," *Br. J. Cancer*, vol. 96, no. 1, pp. 11–5, Jan. 2007.
- [28] G. S. Palapattu, S. Sutcliffe, P. J. Bastian, E. A. Platz, A. M. De Marzo, W. B. Isaacs, and W. G. Nelson, "Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights," *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 7, pp. 1170–81, Jul. 2005.
- [29] P. J. Bastian, S. Yegnasubramanian, G. S. Palapattu, C. G. Rogers, X. Lin, A. M. De Marzo, and W. G. Nelson, "Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation," *Eur. Urol.*, vol. 46, no. 6, pp. 698–708, Dec. 2004.
- [30] H. Chen, A. K. Nandi, X. Li, and C. J. Bieberich, "NKX-3.1 interacts with prostate-derived Ets factor and regulates the activity of the PSA promoter," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 2, pp. 338–40, Jan. 2002.
- [31] W. W. He, P. J. Scivolino, J. Wing, M. Augustus, P. Hudson, P. S. Meissner, R. T. Curtis, B. K. Shell, D. G. Bostwick, D. J. Tindall, E. P. Gelmann, C. Abate-Shen, and K. C. Carter, "A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer," *Genomics*, vol. 43, no. 1, pp. 69–77, Jul. 1997.
- [32] S. A. Tomlins, 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, "Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer," *Science*, vol. 310, no. 5748, pp. 644–8, Oct. 2005.
- [33] G. Attard, J. F. Swennenhuis, D. Olmos, A. H. M. Reid, E. Vickers, R. A'Hern, R. Levink, F. Coumans, J. Moreira, R. Riisnaes, N. B. Oommen, G. Hawche, C. Jameson, E. Thompson, R. Sipkema, C. P. Carden, C. Parker, D. Dearnaley, S. B. Kaye, C. S. Cooper, A. Molina, M. E. Cox, L. W. M. M. Terstappen, and J. S. de Bono, "Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 7, pp. 2912–8, Apr. 2009.
- [34] G. Petrovics, A. Liu, S. Shaheduzzaman, B. Furusato, B. Furusato, C. Sun, Y. Chen, M. Nau, L. Ravindranath, Y. Chen, A. Dobi, V. Srikantan, I. A. Sesterhenn, D. G. McLeod, M. Vahey, J. W. Moul, and S. Srivastava, "Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome," *Oncogene*, vol. 24, no. 23, pp. 3847–52, May 2005.
- [35] S. A. Tomlins, B. Laxman, S. M. Dhanasekaran, B. E. Helgeson, X. Cao, D. S. Morris, A. Menon, X. Jing, Q. Cao, B. Han, J. Yu, L. Wang, J. E. Montie, M. A. Rubin, K. J. Pienta, D. Roulston, R. B. Shah, S. Varambally, R. Mehra, and A. M. Chinnaiyan, "Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer," *Nature*, vol. 448, no. 7153, pp. 595–9, Aug. 2007.
- [36] R. B. Jenkins, J. Qian, M. M. Lieber, and D. G. Bostwick, "Detection of c-myc Oncogene Amplification and Chromosomal Anomalies in Metastatic Prostatic Carcinoma by Fluorescence in Situ Hybridization," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 3, pp. 524–531, Feb. 1997.
- [37] F. R. Ribeiro, R. Henrique, A. T. Martins, C. Jerónimo, and M. R. Teixeira, "Relative copy number gain of MYC in diagnostic needle biopsies is an independent prognostic factor for prostate cancer patients," *Eur. Urol.*, vol. 52, no. 1, pp. 116–25, Jul. 2007.
- [38] M. Andreoiu and L. Cheng, "Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications," *Hum. Pathol.*, vol. 41, no. 6, pp. 781–93, Jun. 2010.
- [39] K. Ellwood-Yen, T. G. Graeber, J. Wongvipat, M. L. Iruela-Arispe, J. Zhang, R. Matusik, G. V. Thomas, and C. L. Sawyers, "Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors," *Cancer Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 223–238, Sep. 2003.
- [40] J. Wang, J. Kim, M. Roh, O. E. Franco, S. W. Hayward, M. L. Wills, and S. A. Abdulkadir, "Pim1 kinase synergizes with c-MYC to induce advanced prostate carcinoma," *Oncogene*, vol. 29, no. 17, pp. 2477–87, Apr. 2010.
- [41] B. Gurel, T. Iwata, C. M. Koh, R. B. Jenkins, F. Lan, C. Van Dang, J. L. Hicks, J. Morgan, T. C. Cornish, S. Sutcliffe, W. B. Isaacs, J. Luo, and A. M. De Marzo, "Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis," *Mod. Pathol.*, vol. 21, no. 9, pp. 1156–67, Sep. 2008.

- [42] D. C. I. Goberdhan and C. Wilson, "PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 12 Spec No, pp. R239–48, Oct. 2003.
- [43] I. C. Gray, S. M. Phillips, S. J. Lee, J. P. Neoptolemos, J. Weissenbach, and N. K. Spurr, "Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer.," *Cancer Res.*, vol. 55, no. 21, pp. 4800–3, Nov. 1995.
- [44] J. T. Dong, C. L. Li, T. W. Sipe, and H. F. Frierson, "Mutations of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancers from Chinese patients.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 304–8, Mar. 2001.
- [45] Y. E. Whang, X. Wu, H. Suzuki, R. E. Reiter, C. Tran, R. L. Vessella, J. W. Said, W. B. Isaacs, and C. L. Sawyers, "Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 9, pp. 5246–50, Apr. 1998.
- [46] M. E. McMenamin, P. Soung, S. Perera, I. Kaplan, M. Loda, and W. R. Sellers, "Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage.," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 17, pp. 4291–6, Sep. 1999.
- [47] K. A. Cooney, J. C. Wetzel, S. D. Merajver, J. A. Macoska, T. P. Singleton, and K. J. Wojno, "Distinct Regions of Allelic Loss on 13q in Prostate Cancer," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 5, pp. 1142–1145, Mar. 1996.
- [48] Y. Wang, S. W. Hayward, A. A. Donjacour, P. Young, T. Jacks, J. Sage, R. Dahiya, R. D. Cardiff, M. L. Day, and G. R. Cunha, "Sex hormone-induced carcinogenesis in Rb-deficient prostate tissue.," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 21, pp. 6008–17, Nov. 2000.
- [49] B. S. Taylor, N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T. Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers, and W. L. Gerald, "Integrative genomic profiling of human prostate cancer.," *Cancer Cell*, vol. 18, no. 1, pp. 11–22, Jul. 2010.
- [50] A. J. Levine, J. Momand, and C. A. Finlay, "The p53 tumour suppressor gene.," *Nature*, vol. 351, no. 6326, pp. 453–6, Jun. 1991.
- [51] D. M. Smith, G. Gao, X. Zhang, G. Wang, and Q. P. Dou, "Regulation of tumor cell apoptotic sensitivity during the cell cycle (Review).," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 6, no. 5, pp. 503–7, Nov. 2000.
- [52] T. J. McDonnell, N. M. Navone, P. Troncoso, L. L. Pisters, C. Conti, A. C. von Eschenbach, S. Brisbay, and C. J. Logothetis, "Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer.," *J. Urol.*, vol. 157, no. 2, pp. 569–74, Mar. 1997.
- [53] F. J. Meyers, P. H. Gumerlock, S. G. Chi, H. Borchers, A. D. Deitch, and R. W. deVere White, "Very frequent p53 mutations in metastatic prostate carcinoma and in matched primary tumors.," *Cancer*, vol. 83, no. 12, pp. 2534–9, Dec. 1998.
- [54] D. F. Smith and D. O. Toft, "Minireview: the intersection of steroid receptors with molecular chaperones: observations and questions.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 22, no. 10, pp. 2229–40, Oct. 2008.
- [55] E. P. Gelmann, "Molecular biology of the androgen receptor.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 13, pp. 3001–15, Jul. 2002.
- [56] S. R. Denmeade, X. S. Lin, and J. T. Isaacs, "Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer.," *Prostate*, vol. 28, no. 4, pp. 251–65, Apr. 1996.
- [57] B. J. Feldman and D. Feldman, "The development of androgen-independent prostate cancer.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 1, no. 1, pp. 34–45, Oct. 2001.
- [58] P. Koivisto, J. Kononen, C. Palmberg, T. Tammela, E. Hyytinen, J. Isola, J. Trapman, K. Cleutjens, A. Noordzij, T. Visakorpi, and O. P. Kallioniemi, "Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer.," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 2, pp. 314–9, Jan. 1997.
- [59] M. E. Taplin, G. J. Bubley, T. D. Shuster, M. E. Frantz, A. E. Spooner, G. K. Ogata, H. N. Keer, and S. P. Balk, "Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 21, pp. 1393–8, May 1995.
- [60] C. Cai, S. Chen, P. Ng, G. J. Bubley, P. S. Nelson, E. A. Mostaghel, B. Marck, A. M. Matsumoto, N. I. Simon, H. Wang, S. Chen, and S. P. Balk, "Intratumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors.," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 20, pp. 6503–13, Oct. 2011.
- [61] M. Pollard, P. H. Luckert, and M. B. Sporn, "Prevention of primary prostate cancer in Lobund-Wistar rats by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide.," *Cancer Res.*, vol. 51, no. 13, pp. 3610–1, Jul. 1991.
- [62] J. Imperato-McGinley and Y.-S. Zhu, "Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 198, no. 1–2, pp. 51–9, Dec. 2002.

- [63] A. M. Traish and A. Morgentaler, "Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: a potential molecular switch for tumour growth.," *Br. J. Cancer*, vol. 101, no. 12, pp. 1949–56, Dec. 2009.
- [64] B. Bao, A. Ahmad, D. Kong, S. Ali, A. S. Azmi, Y. Li, S. Banerjee, S. Padhye, and F. H. Sarkar, "Hypoxia induced aggressiveness of prostate cancer cells is linked with deregulated expression of VEGF, IL-6 and miRNAs that are attenuated by CDF.," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e43726, Jan. 2012.
- [65] O. Melnyk, M. Zimmerman, K. J. Kim, and M. Shuman, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model.," *J. Urol.*, vol. 161, no. 3, pp. 960–3, Mar. 1999.
- [66] M. W. Jackson, J. S. Roberts, S. E. Heckford, C. Ricciardelli, J. Stahl, D. J. Horsfall, and W. D. Tilley, "A Potential Autocrine Role for Vascular Endothelial Growth Factor in Prostate Cancer," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 3, pp. 854–859, Feb. 2002.
- [67] R. E. Coleman, "Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 20 Pt 2, p. 6243s–6249s, Oct. 2006.
- [68] T. A. Guise, J. J. Yin, and K. S. Mohammad, "Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases.," *Cancer*, vol. 97, no. 3 Suppl, pp. 779–84, Mar. 2003.
- [69] W. J. Boyle, W. S. Simonet, and D. L. Lacey, "Osteoclast differentiation and activation.," *Nature*, vol. 423, no. 6937, pp. 337–42, May 2003.
- [70] H. Penno, O. Nilsson, H. Brändström, O. Winqvist, and O. Ljunggren, "Expression of RANK-ligand in prostate cancer cell lines.," *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 69, no. 1, pp. 151–5, Jan. 2009.
- [71] J. M. Brown, E. Corey, Z. D. Lee, L. D. True, T. J. Yun, M. Tondravi, and R. L. Vessella, "Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer.," *Urology*, vol. 57, no. 4, pp. 611–6, May 2001.
- [72] C. Huggins and C. V. Hodges, "Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941.," *J. Urol.*, vol. 168, no. 1, pp. 9–12, Jul. 2002.
- [73] C. Hwang, "Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: a perspective review.," *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 4, no. 6, pp. 329–40, Nov. 2012.
- [74] M. Manea, M. M. Marelli, R. M. Moretti, R. Maggi, M. Marzagalli, and P. Limonta, "Targeting hormonal signaling pathways in castration resistant prostate cancer.," *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.*, vol. 9, no. 3, pp. 267–85, Jan. 2014.
- [75] C. J. Ryan, M. R. Smith, J. S. de Bono, A. Molina, C. J. Logothetis, P. de Souza, K. Fizazi, P. Mainwaring, J. M. Piulats, S. Ng, J. Carles, P. F. A. Mulders, E. Basch, E. J. Small, F. Saad, D. Schrijvers, H. Van Poppel, S. D. Mukherjee, H. Suttman, W. R. Gerritsen, T. W. Flaig, D. J. George, E. Y. Yu, E. Efstathiou, A. Pantuck, E. Winqvist, C. S. Higano, M.-E. Taplin, Y. Park, T. Kheoh, T. Griffin, H. I. Scher, and D. E. Rathkopf, "Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 2, pp. 138–48, Jan. 2013.
- [76] Ø. S. Bruland, S. Nilsson, D. R. Fisher, and R. H. Larsen, "High-linear energy transfer irradiation targeted to skeletal metastases by the alpha-emitter 223Ra: adjuvant or alternative to conventional modalities?," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 20 Pt 2, p. 6250s–6257s, Oct. 2006.
- [77] C. Parker, S. Nilsson, D. Heinrich, S. I. Helle, J. M. O'Sullivan, S. D. Fosså, A. Chodacki, P. Wiechno, J. Logue, M. Seke, A. Widmark, D. C. Johannessen, P. Hoskin, D. Bottomley, N. D. James, A. Solberg, I. Syndikus, J. Kliment, S. Wedel, S. Boehmer, M. Dall'Oglio, L. Franzén, R. Coleman, N. J. Vogelzang, C. G. O'Bryan-Tear, K. Staudacher, J. Garcia-Vargas, M. Shan, Ø. S. Bruland, and O. Sartor, "Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 3, pp. 213–23, Jul. 2013.
- [78] M. R. Smith, F. Saad, R. Coleman, N. Shore, K. Fizazi, B. Tombal, K. Miller, P. Sieber, L. Karsh, R. Damião, T. L. Tammela, B. Egerdie, H. Van Poppel, J. Chin, J. Morote, F. Gómez-Veiga, T. Borkowski, Z. Ye, A. Kupic, R. Dansey, and C. Goessl, "Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial.," *Lancet*, vol. 379, no. 9810, pp. 39–46, Jan. 2012.
- [79] E. J. Small, D. M. Reese, B. Um, S. Whisenant, S. C. Dixon, and W. D. Figg, "Therapy of advanced prostate cancer with granulocyte macrophage colony-stimulating factor.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 5, no. 7, pp. 1738–44, Jul. 1999.
- [80] P. W. Kantoff, C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer, R. B. Sims, Y. Xu, M. W. Frohlich, and P. F. Schellhammer, "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 5, pp. 411–22, Jul. 2010.
- [81] P. W. Kantoff, T. J. Schuetz, B. A. Blumenstein, L. M. Glode, D. L. Bilhartz, M. Wyand, K. Manson, D. L. Panicali, R. Laus, J. Schlom, W. L. Dahut, P. M. Arlen, J. L. Gulley, and W. R. Godfrey, "Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 7, pp. 1099–105, Mar. 2010.

- [82] D. Raghavan, B. Koczwara, and M. Javle, "Evolving strategies of cytotoxic chemotherapy for advanced prostate cancer," *Eur. J. Cancer*, vol. 33, no. 4, pp. 566–574, Apr. 1997.
- [83] A. Yagoda and D. Petrylak, "Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer," *Cancer*, vol. 71, no. 3 Suppl, pp. 1098–109, Feb. 1993.
- [84] P. W. Kantoff, S. Halabi, M. Conaway, J. Picus, J. Kirshner, V. Hars, D. Trump, E. P. Winer, and N. J. Vogelzang, "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.*, vol. 17, no. 8, pp. 2506–13, Aug. 1999.
- [85] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail, "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 93, no. 9, pp. 2325–7, May 1971.
- [86] M. Jacrot, J. Riondel, F. Picot, D. Leroux, C. Mouriquand, H. Beriel, and P. Potier, "[Action of taxol on human tumors transplanted in athymic mice]," *C. R. Seances Acad. Sci. III.*, vol. 297, no. 13, pp. 597–600, Jan. 1983.
- [87] F. Guéritte, "General and recent aspects of the chemistry and structure-activity relationships of taxoids," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 7, no. 13, pp. 1229–49, Sep. 2001.
- [88] C. Trivedi, B. Redman, L. E. Flaherty, O. Kucuk, W. Du, L. K. Heilbrun, and M. Hussain, "Weekly 1-hour infusion of paclitaxel. Clinical feasibility and efficacy in patients with hormone-refractory prostate carcinoma," *Cancer*, vol. 89, no. 2, pp. 431–6, Jul. 2000.
- [89] B. J. Roth, B. Y. Yeap, G. Wilding, B. Kasimis, D. McLeod, and P. J. Loehrer, "Taxol in advanced, hormone-refractory carcinoma of the prostate. A phase II trial of the Eastern Cooperative Oncology Group," *Cancer*, vol. 72, no. 8, pp. 2457–60, Oct. 1993.
- [90] I. Ringel and S. B. Horwitz, "Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 83, no. 4, pp. 288–91, Mar. 1991.
- [91] L. R. Kelland and G. Abel, "Comparative in vitro cytotoxicity of taxol and Taxotere against cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian carcinoma cell lines," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 30, no. 6, pp. 444–50, Jan. 1992.
- [92] M. Vogel, S. G. Hilsenbeck, H. Depenbrock, S. Danhauser-Riedl, T. Block, H. Nekarda, C. Fellbaum, M. S. Aapro, M. C. Bissery, and J. Rastetter, "Preclinical activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503) against freshly explanted clonogenic human tumour cells: comparison with taxol and conventional antineoplastic agents," *Eur. J. Cancer*, vol. 29A, no. 14, pp. 2009–14, Jan. 1993.
- [93] I. F. Tannock, R. de Wit, W. R. Berry, J. Horti, A. Pluzanska, K. N. Chi, S. Oudard, C. Théodore, N. D. James, I. Turesson, M. A. Rosenthal, and M. A. Eisenberger, "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, no. 15, pp. 1502–12, Oct. 2004.
- [94] D. P. Petrylak, C. M. Tangen, M. H. A. Hussain, P. N. Lara, 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, "Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, no. 15, pp. 1513–20, Oct. 2004.
- [95] P. Vrignaud, D. Sémiond, P. Lejeune, H. Bouchard, L. Calvet, C. Combeau, J.-F. Riou, A. Commerçon, F. Lavelle, and M.-C. Bissery, "Preclinical antitumor activity of cabazitaxel, a semisynthetic taxane active in taxane-resistant tumors," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 11, pp. 2973–83, Jun. 2013.
- [96] O. Azarenko, G. Smiyun, J. Mah, L. Wilson, and M. A. Jordan, "Antiproliferative Mechanism of Action of the Novel Taxane Cabazitaxel as Compared with the Parent Compound Docetaxel in MCF7 Breast Cancer Cells," *Mol. Cancer Ther.*, Jun. 2014.
- [97] S. Oudard, "TROPIC: Phase III trial of cabazitaxel for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer," *Future Oncol.*, vol. 7, no. 4, pp. 497–506, Apr. 2011.
- [98] P. B. Schiff and S. B. Horwitz, "Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 77, no. 3, pp. 1561–5, Mar. 1980.
- [99] E. K. Rowinsky, L. A. Cazenave, and R. C. Donehower, "Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 82, no. 15, pp. 1247–59, Aug. 1990.
- [100] J. P. Snyder, J. H. Nettles, B. Cornett, K. H. Downing, and E. Nogales, "The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 9, pp. 5312–6, Apr. 2001.
- [101] A. Desai and T. J. Mitchison, "Microtubule polymerization dynamics," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 13, pp. 83–117, Jan. 1997.
- [102] L. A. Amos and J. Löwe, "How Taxol stabilises microtubule structure," *Chem. Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. R65–9, Mar. 1999.
- [103] U. Vaishampayan, R. E. Parchment, B. R. Jasti, and M. Hussain, "Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics," *Urology*, vol. 54, no. 6A Suppl, pp. 22–9, Dec. 1999.

- [104] J. Zhou and P. Giannakakou, "Targeting microtubules for cancer chemotherapy," *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents*, vol. 5, no. 1, pp. 65–71, Jan. 2005.
- [105] I. M. Cheeseman and A. Desai, "Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 1, pp. 33–46, Jan. 2008.
- [106] G. M. Alushin, G. C. Lander, E. H. Kellogg, R. Zhang, D. Baker, and E. Nogales, "High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in α -tubulin upon GTP hydrolysis," *Cell*, vol. 157, no. 5, pp. 1117–29, May 2014.
- [107] G. I. Perez, C. M. Knudson, L. Leykin, S. J. Korsmeyer, and J. L. Tilly, "Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction," *Nat. Med.*, vol. 3, no. 11, pp. 1228–32, Nov. 1997.
- [108] K. N. Bhalla, "Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis," *Oncogene*, vol. 22, no. 56, pp. 9075–86, Dec. 2003.
- [109] S. Haldar, A. Basu, and C. M. Croce, "Bcl2 is the guardian of microtubule integrity," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 2, pp. 229–33, Jan. 1997.
- [110] O. Trédan, C. M. Galmarini, K. Patel, and I. F. Tannock, "Drug resistance and the solid tumor microenvironment," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 99, no. 19, pp. 1441–54, Oct. 2007.
- [111] A. H. Kyle, L. A. Huxham, D. M. Yeoman, and A. I. Minchinton, "Limited tissue penetration of taxanes: a mechanism for resistance in solid tumors," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 9, pp. 2804–10, May 2007.
- [112] C.-H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras, and A. Ostman, "High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 10, pp. 806–13, Oct. 2004.
- [113] P. A. Netti, D. A. Berk, M. A. Swartz, A. J. Grodzinsky, and R. K. Jain, "Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 9, pp. 2497–503, May 2000.
- [114] J. M. Brown and W. R. Wilson, "Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 6, pp. 437–47, Jun. 2004.
- [115] G. L. Semenza, "Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics," *Oncogene*, vol. 29, no. 5, pp. 625–34, Feb. 2010.
- [116] P. J. Maxwell, R. Gallagher, A. Seaton, C. Wilson, P. Scullin, J. Pettigrew, I. J. Stratford, K. J. Williams, P. G. Johnston, and D. J. J. Waugh, "HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells," *Oncogene*, vol. 26, no. 52, pp. 7333–45, Nov. 2007.
- [117] Q. Liu, J. D. Sun, J. Wang, D. Ahluwalia, A. F. Baker, L. D. Cranmer, D. Ferraro, Y. Wang, J.-X. Duan, W. S. Ammons, J. G. Curd, M. D. Matteucci, and C. P. Hart, "TH-302, a hypoxia-activated prodrug with broad in vivo preclinical combination therapy efficacy: optimization of dosing regimens and schedules," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 69, no. 6, pp. 1487–98, Jun. 2012.
- [118] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, "Molecular Cell Biology." W. H. Freeman, 2000.
- [119] K. H. Shain and W. S. Dalton, "Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 1, no. 1, pp. 69–78, Nov. 2001.
- [120] V. M. Weaver, S. Lelièvre, J. N. Lakins, M. A. Chrenek, J. C. R. Jones, F. Giancotti, Z. Werb, and M. J. Bissell, "beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium," *Cancer Cell*, vol. 2, no. 3, pp. 205–16, Sep. 2002.
- [121] R. Mori, H. Ishiguro, Y. Kuwabara, M. Kimura, A. Mitsui, K. Tomoda, Y. Mori, R. Ogawa, T. Katada, K. Harata, and Y. Fujii, "Targeting beta1 integrin restores sensitivity to docetaxel of esophageal squamous cell carcinoma," *Oncol. Rep.*, vol. 20, no. 6, pp. 1345–51, Dec. 2008.
- [122] F. Thomas, J. M. P. Holly, R. Persad, A. Bahl, and C. M. Perks, "Fibronectin confers survival against chemotherapeutic agents but not against radiotherapy in DU145 prostate cancer cells: involvement of the insulin like growth factor-1 receptor," *Prostate*, vol. 70, no. 8, pp. 856–65, Jun. 2010.
- [123] T. D. Chung, J. J. Yu, M. T. Spiotto, M. Bartkowski, and J. W. Simons, "Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer," *Prostate*, vol. 38, no. 3, pp. 199–207, Feb. 1999.
- [124] L. Wallner, J. Dai, J. Escara-Wilke, J. Zhang, Z. Yao, Y. Lu, M. Trikha, J. A. Nemeth, M. H. Zaki, and E. T. Keller, "Inhibition of interleukin-6 with CNTO328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchiectomized mice," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 6, pp. 3087–95, Mar. 2006.

- [125] H. Kinoshita, Y. Hirata, H. Nakagawa, K. Sakamoto, Y. Hayakawa, R. Takahashi, W. Nakata, K. Sakitani, T. Serizawa, Y. Hikiba, M. Akanuma, W. Shibata, S. Maeda, and K. Koike, "Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis.," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e60914, Jan. 2013.
- [126] Y.-S. Pu, T.-C. Hour, S.-E. Chuang, A.-L. Cheng, M.-K. Lai, and M.-L. Kuo, "Interleukin-6 is responsible for drug resistance and anti-apoptotic effects in prostatic cancer cells.," *Prostate*, vol. 60, no. 2, pp. 120–9, Jul. 2004.
- [127] J. Codony-Servat, M. Marín-Aguilera, L. Visa, X. García-Albéniz, E. Pineda, P. L. Fernández, X. Filella, P. Gascón, and B. Mellado, "Nuclear factor-kappa B and interleukin-6 related docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer.," *Prostate*, vol. 73, no. 5, pp. 512–21, Apr. 2013.
- [128] L. Zhao, B. Y. Lee, D. A. Brown, M. P. Molloy, G. M. Marx, N. Pavlakis, M. J. Boyer, M. R. Stockler, W. Kaplan, S. N. Breit, R. L. Sutherland, S. M. Henshall, and L. G. Horvath, "Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling.," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 19, pp. 7696–703, Oct. 2009.
- [129] A. R. Bauskin, D. A. Brown, S. Junankar, K. K. Rasiyah, S. Eggleton, M. Hunter, T. Liu, D. Smith, T. Kuffner, G. J. Pankhurst, H. Johnen, P. J. Russell, W. Barret, P. D. Stricker, J. J. Grygiel, J. G. Kench, S. M. Henshall, R. L. Sutherland, and S. N. Breit, "The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 6, pp. 2330–6, Mar. 2005.
- [130] J. Zhang, Y. Lu, and K. J. Pienta, "Multiple roles of chemokine (C-C motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 102, no. 8, pp. 522–8, Apr. 2010.
- [131] D. Z. Qian, B. L. S. Rademacher, J. Pittsnerbarger, C.-Y. Huang, A. Myrthue, C. S. Higano, M. Garzotto, P. S. Nelson, and T. M. Beer, "CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity.," *Prostate*, vol. 70, no. 4, pp. 433–42, Mar. 2010.
- [132] E. K. Rowinsky, L. Smith, Y. M. Wang, P. Chaturvedi, M. Villalona, E. Campbell, C. Aylesworth, S. G. Eckhardt, L. Hammond, M. Kraynak, R. Drengler, J. Stephenson, M. W. Harding, and D. D. Von Hoff, "Phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel in combination with biricodar, a novel agent that reverses multidrug resistance conferred by overexpression of both MDR1 and MRP.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 9, pp. 2964–76, Sep. 1998.
- [133] N. Al Nakouzi, S. Cotteret, F. Commo, C. Gaudin, S. Rajpar, P. Dessen, P. Vielh, K. Fizazi, and A. Chachereau, "Targeting CDC25C, PLK1 and CHEK1 to overcome Docetaxel resistance induced by loss of LZTS1 in prostate cancer.," *Oncotarget*, vol. 5, no. 3, pp. 667–78, Mar. 2014.
- [134] A. T. Fojo, K. Ueda, D. J. Slamon, D. G. Poplack, M. M. Gottesman, and I. Pastan, "Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 1, pp. 265–9, Jan. 1987.
- [135] G. Bhangal, S. Halford, J. Wang, R. Roylance, R. Shah, and J. Waxman, "Expression of the multidrug resistance gene in human prostate cancer.," *Urol. Oncol.*, vol. 5, no. 3, pp. 118–121, Apr. 2000.
- [136] J. Zalcborg, X. F. Hu, A. Slater, J. Parisot, S. El-Osta, P. Kantharidis, S. T. Chou, and J. D. Parkin, "MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines.," *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 3, no. 2, pp. 66–75, Aug. 2000.
- [137] Y. Xie, K. Xu, D. E. Linn, X. Yang, Z. Guo, H. Shimelis, T. Nakanishi, D. D. Ross, H. Chen, L. Fazli, M. E. Gleave, and Y. Qiu, "The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 6, pp. 3349–56, Feb. 2008.
- [138] W. R. BRUCE and H. VAN DER GAAG, "A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO.," *Nature*, vol. 199, pp. 79–80, Jul. 1963.
- [139] C. H. Park, D. E. Bergsagel, and E. A. McCulloch, "Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 46, no. 2, pp. 411–22, Mar. 1971.
- [140] N. J. Maitland and A. T. Collins, "Prostate cancer stem cells: a new target for therapy.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 17, pp. 2862–70, Jun. 2008.
- [141] D. E. Linn, X. Yang, F. Sun, Y. Xie, H. Chen, R. Jiang, H. Chen, S. Chumsri, A. M. Burger, and Y. Qiu, "A Role for OCT4 in Tumor Initiation of Drug-Resistant Prostate Cancer Cells.," *Genes Cancer*, vol. 1, no. 9, pp. 908–16, Sep. 2010.
- [142] L. Wang, X. Huang, X. Zheng, X. Wang, S. Li, L. Zhang, Z. Yang, and Z. Xia, "Enrichment of prostate cancer stem-like cells from human prostate cancer cell lines by culture in serum-free medium and chemoradiotherapy.," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 9, no. 5, pp. 472–9, Jan. 2013.
- [143] J. Ni, P. Cozzi, J. Hao, W. Duan, P. Graham, J. Kearsley, and Y. Li, "Cancer stem cells in prostate cancer chemoresistance.," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 14, no. 3, pp. 225–40, Mar. 2014.

- [144] D.-R. Yang, X.-F. Ding, J. Luo, Y.-X. Shan, R. Wang, S.-J. Lin, G. Li, C.-K. Huang, J. Zhu, Y. Chen, S. O. Lee, and C. Chang, "Increased chemosensitivity via targeting testicular nuclear receptor 4 (TR4)-Oct4-interleukin 1 receptor antagonist (IL1Ra) axis in prostate cancer CD133+ stem/progenitor cells to battle prostate cancer.," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 23, pp. 16476–83, Jun. 2013.
- [145] H. K. Berrieman, M. J. Lind, and L. Cawkwell, "Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy?," *Lancet Oncol.*, vol. 5, no. 3, pp. 158–64, Mar. 2004.
- [146] P. Giannakakou, D. L. Sackett, Y. K. Kang, Z. Zhan, J. T. Buters, T. Fojo, and M. S. Poruchynsky, "Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 27, pp. 17118–25, Jul. 1997.
- [147] T. Hara, K. Ushio, M. Nishiwaki, J. Kouno, H. Araki, Y. Hikichi, M. Hattori, Y. Imai, and M. Yamaoka, "A mutation in beta-tubulin and a sustained dependence on androgen receptor signalling in a newly established docetaxel-resistant prostate cancer cell line.," *Cell Biol. Int.*, vol. 34, no. 2, pp. 177–84, Feb. 2010.
- [148] M. L. Gonzalez-Garay, L. Chang, K. Blade, D. R. Menick, and F. Cabral, "A beta-tubulin leucine cluster involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 34, pp. 23875–82, Aug. 1999.
- [149] Y. Wang, S. Yin, K. Blade, G. Cooper, D. R. Menick, and F. Cabral, "Mutations at leucine 215 of beta-tubulin affect paclitaxel sensitivity by two distinct mechanisms.," *Biochemistry*, vol. 45, no. 1, pp. 185–94, Jan. 2006.
- [150] K. Natarajan and S. Senapati, "Understanding the basis of drug resistance of the mutants of $\alpha\beta$ -tubulin dimer via molecular dynamics simulations.," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e42351, Jan. 2012.
- [151] M. Monzó, R. Rosell, J. J. Sánchez, J. S. Lee, A. O'Brate, J. L. González-Larriba, V. Alberola, J. C. Lorenzo, L. Núñez, J. Y. Ro, and C. Martín, "Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 17, no. 6, pp. 1786–93, Jun. 1999.
- [152] S. Noguchi, "Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers.," *Cancer Sci.*, vol. 97, no. 9, pp. 813–20, Sep. 2006.
- [153] D. Panda, H. P. Miller, A. Banerjee, R. F. Ludueña, and L. Wilson, "Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 24, pp. 11358–62, Nov. 1994.
- [154] W. B. Derry, L. Wilson, I. A. Khan, R. F. Ludueña, and M. A. Jordan, "Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes.," *Biochemistry*, vol. 36, no. 12, pp. 3554–62, Mar. 1997.
- [155] C. Magi-Galluzzi, M. Zhou, A. M. Reuther, R. Dreicer, and E. A. Klein, "Neoadjuvant docetaxel treatment for locally advanced prostate cancer: a clinicopathologic study.," *Cancer*, vol. 110, no. 6, pp. 1248–54, Sep. 2007.
- [156] L. Egevad, A. Valdman, N. P. Wiklund, P. Sève, and C. Dumontet, "Beta-tubulin III expression in prostate cancer.," *Scand. J. Urol. Nephrol.*, vol. 44, no. 6, pp. 371–7, Dec. 2010.
- [157] R. Karki, M. Mariani, M. Andreoli, S. He, G. Scambia, S. Shahabi, and C. Ferlini, "βIII-Tubulin: biomarker of taxane resistance or drug target?," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 17, no. 4, pp. 461–72, May 2013.
- [158] H. Kim, L. I. Binder, and J. L. Rosenbaum, "The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro.," *J. Cell Biol.*, vol. 80, no. 2, pp. 266–76, Mar. 1979.
- [159] T. Maney, M. Wagenbach, and L. Wordeman, "Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 37, pp. 34753–8, Sep. 2001.
- [160] J. L. Ross, C. D. Santangelo, V. Makrides, and D. K. Fygenon, "Tau induces cooperative Taxol binding to microtubules.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 35, pp. 12910–5, Aug. 2004.
- [161] F. Andre, C. Hatzis, K. Anderson, C. Sotiriou, C. Mazouni, J. Mejia, B. Wang, G. N. Hortobagyi, W. F. Symmans, and L. Pusztai, "Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 7, pp. 2061–7, Apr. 2007.
- [162] M. S. Poruchynsky, P. Giannakakou, Y. Ward, J. C. Bulinski, W. G. Telford, R. W. Robey, and T. Fojo, "Accompanying protein alterations in malignant cells with a microtubule-polymerizing drug-resistance phenotype and a primary resistance mechanism.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 62, no. 11, pp. 1469–80, Dec. 2001.
- [163] C. C. Zhang, J. M. Yang, E. White, M. Murphy, A. Levine, and W. N. Hait, "The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells.," *Oncogene*, vol. 16, no. 12, pp. 1617–24, Mar. 1998.
- [164] E. Alli, J. Bash-Babula, J.-M. Yang, and W. N. Hait, "Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer.," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 23, pp. 6864–9, Dec. 2002.

- [165] S. J. Mistry, A. Bank, and G. F. Atweh, "Targeting stathmin in prostate cancer.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 4, no. 12, pp. 1821–9, Dec. 2005.
- [166] T. A. Kufer, E. A. Nigg, and H. H. W. Silljé, "Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle.," *Chromosoma*, vol. 112, no. 4, pp. 159–63, Dec. 2003.
- [167] W. He, M.-G. Zhang, X.-J. Wang, S. Zhong, Y. Shao, Y. Zhu, and Z.-J. Shen, "AURKA suppression induces DU145 apoptosis and sensitizes DU145 to docetaxel treatment.," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 359–67, Jan. 2013.
- [168] M. Kumano, H. Miyake, T. Terakawa, J. Furukawa, and M. Fujisawa, "Suppressed tumour growth and enhanced chemosensitivity by RNA interference targeting Aurora-A in the PC3 human prostate cancer model.," *BJU Int.*, vol. 106, no. 1, pp. 121–7, Jul. 2010.
- [169] C. Zhang, Z. Yan, C. L. Painter, Q. Zhang, E. Chen, M. E. Arango, K. Kuszpit, K. Zasadny, M. Hallin, J. Hallin, A. Wong, D. Buckman, G. Sun, M. Qiu, K. Anderes, and J. G. Christensen, "PF-00477736 mediates checkpoint kinase 1 signaling pathway and potentiates docetaxel-induced efficacy in xenografts.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 14, pp. 4630–40, Jul. 2009.
- [170] I. Lebedeva, R. Rando, J. Ojwang, P. Cossum, and C. A. Stein, "Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity.," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 21, pp. 6052–60, Nov. 2000.
- [171] C. Castilla, B. Congregado, D. Chinchón, F. J. Torrubia, M. A. Japón, and C. Sáez, "Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak.," *Endocrinology*, vol. 147, no. 10, pp. 4960–7, Oct. 2006.
- [172] M. Krajewska, S. Krajewski, J. I. Epstein, A. Shabaik, J. Sauvageot, K. Song, S. Kitada, and J. C. Reed, "Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers.," *Am. J. Pathol.*, vol. 148, no. 5, pp. 1567–76, May 1996.
- [173] J. P. Meijerink, E. J. Mensink, K. Wang, T. W. Sedlak, A. W. Slöetjes, T. de Witte, G. Waksman, and S. J. Korsmeyer, "Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX.," *Blood*, vol. 91, no. 8, pp. 2991–7, Apr. 1998.
- [174] R. Li, T. Moudgil, H. J. Ross, and H.-M. Hu, "Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim.," *Cell Death Differ.*, vol. 12, no. 3, pp. 292–303, Mar. 2005.
- [175] A. Savry, M. Carre, R. Berges, A. Rovini, I. Pobel, C. Chacon, D. Braguer, and V. Bourgarel-Rey, "Bcl-2-enhanced efficacy of microtubule-targeting chemotherapy through Bim overexpression: implications for cancer treatment.," *Neoplasia*, vol. 15, no. 1, pp. 49–60, Jan. 2013.
- [176] T. Yoshino, H. Shiina, S. Urakami, N. Kikuno, T. Yoneda, K. Shigeno, and M. Igawa, "Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 20 Pt 1, pp. 6116–24, Oct. 2006.
- [177] C. S. Duckett, V. E. Nava, R. W. Gedrich, R. J. Clem, J. L. Van Dongen, M. C. Gilfillan, H. Shiels, J. M. Hardwick, and C. B. Thompson, "A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors.," *EMBO J.*, vol. 15, no. 11, pp. 2685–94, Jun. 1996.
- [178] Q. L. Deveraux, N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsedale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen, and J. C. Reed, "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.," *EMBO J.*, vol. 17, no. 8, pp. 2215–23, Apr. 1998.
- [179] T. Nomura, H. Mimata, Y. Takeuchi, H. Yamamoto, E. Miyamoto, and Y. Nomura, "The X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits taxol-induced apoptosis in LNCaP cells.," *Urol. Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 37–44, Mar. 2003.
- [180] K. M. W. Rahman, S. Banerjee, S. Ali, A. Ahmad, Z. Wang, D. Kong, and W. A. Sakr, "3,3'-Diindolylmethane enhances taxotere-induced apoptosis in hormone-refractory prostate cancer cells through survivin down-regulation.," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 10, pp. 4468–75, May 2009.
- [181] T. Nakahara, A. Kita, K. Yamanaka, M. Mori, N. Amino, M. Takeuchi, F. Tominaga, S. Hatakeyama, I. Kinoyama, A. Matsuhisa, M. Kudoh, and M. Sasamata, "YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts.," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 17, pp. 8014–21, Sep. 2007.
- [182] I. P. Trougakos, M. Lourda, M. H. Antonelou, D. Kletsas, V. G. Gorgoulis, I. S. Papassideri, Y. Zou, L. H. Margaritis, D. A. Boothman, and E. S. Gonos, "Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 48–59, Jan. 2009.
- [183] R. D. Sowery, B. A. Hadaschik, A. I. So, A. Zoubeidi, L. Fazli, A. Hurtado-Coll, and M. E. Gleave, "Clusterin knockdown using the antisense oligonucleotide OGX-011 re-sensitizes docetaxel-refractory prostate cancer PC-3 cells to chemotherapy.," *BJU Int.*, vol. 102, no. 3, pp. 389–97, Aug. 2008.
- [184] P. Rocchi, A. So, S. Kojima, M. Signaevsky, E. Beraldi, L. Fazli, A. Hurtado-Coll, K. Yamanaka, and M. Gleave, "Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer.," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 18, pp. 6595–602, Sep. 2004.

- [185] M. Gleave, H. Miyake, and K. Chi, "Beyond simple castration: targeting the molecular basis of treatment resistance in advanced prostate cancer.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 56 Suppl 1, pp. 47–57, Nov. 2005.
- [186] V. L. Gabai, K. R. Budagova, and M. Y. Sherman, "Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents.," *Oncogene*, vol. 24, no. 20, pp. 3328–38, May 2005.
- [187] A. Ren, G. Yan, B. You, and J. Sun, "Down-regulation of mammalian sterile 20-like kinase 1 by heat shock protein 70 mediates cisplatin resistance in prostate cancer cells.," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 7, pp. 2266–74, Apr. 2008.
- [188] U. Banerji, "Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 9–14, Jan. 2009.
- [189] D. B. Agus, H. I. Scher, B. Higgins, W. D. Fox, G. Heller, M. Fazzari, C. Cordon-Cardo, and D. W. Golde, "Response of prostate cancer to anti-Her-2/neu antibody in androgen-dependent and -independent human xenograft models.," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 19, pp. 4761–4, Oct. 1999.
- [190] F. M. Sirotnak, M. F. Zakowski, V. A. Miller, H. I. Scher, and M. G. Kris, "Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 12, pp. 4885–92, Dec. 2000.
- [191] G. O. Hellawell, D. J. P. Ferguson, S. F. Brewster, and V. M. Macaulay, "Chemosensitization of human prostate cancer using antisense agents targeting the type I insulin-like growth factor receptor.," *BJU Int.*, vol. 91, no. 3, pp. 271–7, Mar. 2003.
- [192] H. Uehara, S. J. Kim, T. Karashima, D. L. Shepherd, D. Fan, R. Tsan, J. J. Killion, C. Logothetis, P. Mathew, and I. J. Fidler, "Effects of blocking platelet-derived growth factor-receptor signaling in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 95, no. 6, pp. 458–70, Mar. 2003.
- [193] B. Gowardhan, D. A. Douglas, M. E. Mathers, A. B. McKie, S. R. C. McCracken, C. N. Robson, and H. Y. Leung, "Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer.," *Br. J. Cancer*, vol. 92, no. 2, pp. 320–7, Jan. 2005.
- [194] A. Stephanou and D. S. Latchman, "STAT-1: a novel regulator of apoptosis.," *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 84, no. 6, pp. 239–44, Dec. 2003.
- [195] S. G. Patterson, S. Wei, X. Chen, D. A. Sallman, D. L. Gilvary, B. Zhong, J. Pow-Sang, T. Yeatman, and J. Y. Djeu, "Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells.," *Oncogene*, vol. 25, no. 45, pp. 6113–22, Oct. 2006.
- [196] E. A. P. P. and C. L. Alexandra Leary, *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update*. InTech, 2013.
- [197] M. Guarino, "Src signaling in cancer invasion.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 223, no. 1, pp. 14–26, Apr. 2010.
- [198] J. A. Romashkova and S. S. Makarov, "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling.," *Nature*, vol. 401, no. 6748, pp. 86–90, Sep. 1999.
- [199] E. A. Sherbakova, T. P. Stromskaia, E. I. Rybalkina, O. V. Kalita, and A. A. Stavrovskaja, "[Role of PTEN protein in multidrug resistance of prostate cancer cells].," *Mol. Biol. (Mosk)*, vol. 42, no. 3, pp. 487–93.
- [200] Y. Yasumizu, A. Miyajima, T. Kosaka, Y. Miyazaki, E. Kikuchi, and M. Oya, "Dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BE235 sensitizes docetaxel in castration resistant prostate cancer.," *J. Urol.*, vol. 191, no. 1, pp. 227–34, Jan. 2014.
- [201] D. Pchejetski, M. Golzio, E. Bonhoure, C. Calvet, N. Doumerc, V. Garcia, C. Mazerolles, P. Rischmann, J. Teissié, B. Malavaud, and O. Cuvillier, "Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 24, pp. 11667–75, Dec. 2005.
- [202] D. Pchejetski, N. Doumerc, M. Golzio, M. Naymark, J. Teissié, T. Kohama, J. Waxman, B. Malavaud, and O. Cuvillier, "Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, no. 7, pp. 1836–45, Jul. 2008.
- [203] M. D. White, L. Chan, J. W. Antoon, and B. S. Beckman, "Targeting ovarian cancer and chemoresistance through selective inhibition of sphingosine kinase-2 with ABC294640.," *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 3573–9, Sep. 2013.
- [204] A. Sultan, B. Ling, H. Zhang, B. Ma, D. Michel, J. Alcorn, and J. Yang, "Synergistic Effect between Sphingosine-1-Phosphate and Chemotherapy Drugs against Human Brain-metastasized Breast Cancer MDA-MB-361 cells.," *J. Cancer*, vol. 4, no. 4, pp. 315–9, Jan. 2013.
- [205] Y. Xie, K. Xu, B. Dai, Z. Guo, T. Jiang, H. Chen, and Y. Qiu, "The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs.," *Oncogene*, vol. 25, no. 1, pp. 70–8, Jan. 2006.

- [206] M. Zemskova, E. Sahakian, S. Bashkirova, and M. Lilly, "The PIM1 kinase is a critical component of a survival pathway activated by docetaxel and promotes survival of docetaxel-treated prostate cancer cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 30, pp. 20635–44, Jul. 2008.
- [207] J. S. de Bono, C. J. Logothetis, A. Molina, K. Fizazi, S. North, L. Chu, K. N. Chi, R. J. Jones, O. B. Goodman, 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. Fléchon, M. Saleh, M. Scholz, E. Efstathiou, A. Zivi, D. Bianchini, Y. Loriot, N. Chieffo, T. Kheoh, C. M. Haqq, and H. I. Scher, "Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 21, pp. 1995–2005, May 2011.
- [208] C. Tran, S. Ouk, N. J. Clegg, Y. Chen, P. A. Watson, V. Arora, J. Wongvipat, P. M. Smith-Jones, D. Yoo, A. Kwon, T. Wasielewska, D. Welsbie, C. D. Chen, C. S. Higano, T. M. Beer, D. T. Hung, H. I. Scher, M. E. Jung, and C. L. Sawyers, "Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer.," *Science*, vol. 324, no. 5928, pp. 787–90, May 2009.
- [209] H. I. Scher, K. Fizazi, F. Saad, M.-E. Taplin, C. N. Sternberg, K. Miller, R. de Wit, P. Mulders, K. N. Chi, N. D. Shore, A. J. Armstrong, T. W. Flaig, A. Fléchon, P. Mainwaring, M. Fleming, J. D. Hainsworth, M. Hirmand, B. Selby, L. Seely, and J. S. de Bono, "Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, no. 13, pp. 1187–97, Sep. 2012.
- [210] M. Yamaoka, T. Hara, and M. Kusaka, "Overcoming persistent dependency on androgen signaling after progression to castration-resistant prostate cancer.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, no. 17, pp. 4319–24, Oct. 2010.
- [211] L. van Zuylen, A. Sparreboom, A. van der Gaast, K. Nooter, F. A. L. M. Eskens, E. Brouwer, C. J. Bol, R. de Vries, P. A. Palmer, and J. Verweij, "Disposition of docetaxel in the presence of P-glycoprotein inhibition by intravenous administration of R101933.," *Eur. J. Cancer*, vol. 38, no. 8, pp. 1090–9, May 2002.
- [212] R. P. Rago, A. Einstein, R. Lush, T. M. Beer, Y.-J. Ko, W. D. Henner, G. Bublely, E. A. Merica, V. Garg, E. Ette, M. W. Harding, and W. S. Dalton, "Safety and efficacy of the MDR inhibitor Incel (biricodar, VX-710) in combination with mitoxantrone and prednisone in hormone-refractory prostate cancer.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 51, no. 4, pp. 297–305, Apr. 2003.
- [213] P. M. Fracasso, L. J. Goldstein, D. P. de Alwis, J. S. Rader, M. A. Arquette, S. A. Goodner, L. P. Wright, C. L. Fears, R. J. Gazak, V. A. M. Andre, M. F. Burgess, C. A. Slapak, and J. H. M. Schellens, "Phase I study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar, in resistant malignancies.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 21, pp. 7220–8, Nov. 2004.
- [214] J. S. de Bono, S. Oudard, M. Ozguroglu, S. Hansen, J.-P. Machiels, I. Kocak, G. Gravis, I. Bodrogi, M. J. Mackenzie, L. Shen, M. Roessner, S. Gupta, and A. O. Sartor, "Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial.," *Lancet*, vol. 376, no. 9747, pp. 1147–54, Oct. 2010.
- [215] R. A. Newman, J. Yang, M. Raymond, V. Finlay, F. Cabral, D. Vourloumis, L. C. Stephens, P. Troncoso, X. Wu, C. J. Logothetis, K. C. Nicolaou, and N. M. Navone, "Antitumor efficacy of 26-fluoroepothilone B against human prostate cancer xenografts.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 48, no. 4, pp. 319–26, Oct. 2001.
- [216] K.-H. Altmann, "Recent developments in the chemical biology of epothilones.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 11, no. 13, pp. 1595–613, Jan. 2005.
- [217] J. E. Rosenberg, V. K. Weinberg, W. K. Kelly, D. Michaelson, M. H. Hussain, G. Wilding, M. Gross, D. Hutcheon, and E. J. Small, "Activity of second-line chemotherapy in docetaxel-refractory hormone-refractory prostate cancer patients: randomized phase 2 study of ixabepilone or mitoxantrone and prednisone.," *Cancer*, vol. 110, no. 3, pp. 556–63, Aug. 2007.
- [218] A. Hussain, R. S. DiPaola, A. D. Baron, C. S. Higano, N. S. Tchekmedyian, and A. R. Johri, "Phase II trial of weekly patupilone in patients with castration-resistant prostate cancer.," *Ann. Oncol.*, vol. 20, no. 3, pp. 492–7, Mar. 2009.
- [219] G. Liu, Y.-H. Chen, R. DiPaola, M. Carducci, and G. Wilding, "Phase II trial of weekly ixabepilone in men with metastatic castrate-resistant prostate cancer (E3803): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group.," *Clin. Genitourin. Cancer*, vol. 10, no. 2, pp. 99–105, Jun. 2012.
- [220] J. E. Rosenberg, C. J. Ryan, V. K. Weinberg, D. C. Smith, M. Hussain, T. M. Beer, C. W. Ryan, P. Mathew, L. C. Pagliaro, A. L. Harzstark, J. Sharib, and E. J. Small, "Phase I study of ixabepilone, mitoxantrone, and prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer previously treated with docetaxel-based therapy: a study of the department of defense prostate cancer clinical trials consortium.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 17, pp. 2772–8, Jun. 2009.
- [221] R. T. Tong, Y. Boucher, S. V. Kozin, F. Winkler, D. J. Hicklin, and R. K. Jain, "Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors.," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 11, pp. 3731–6, Jun. 2004.
- [222] R. K. Jain, "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy.," *Science*, vol. 307, no. 5706, pp. 58–62, Jan. 2005.
- [223] G. Di Lorenzo, W. D. Figg, S. D. Fossa, V. Mirone, R. Autorino, N. Longo, C. Imbimbo, S. Perdonà, A. Giordano, M. Giuliano, R. Labianca, and S. De Placido, "Combination of bevacizumab and docetaxel in docetaxel-pretreated hormone-refractory prostate cancer: a phase 2 study.," *Eur. Urol.*, vol. 54, no. 5, pp. 1089–94, Nov. 2008.

- [224] W. K. Kelly, S. Halabi, M. Carducci, D. George, J. F. Mahoney, W. M. Stadler, M. Morris, P. Kantoff, J. P. Monk, E. Kaplan, N. J. Vogelzang, and E. J. Small, "Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial comparing docetaxel and prednisone with or without bevacizumab in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: CALGB 90401.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 13, pp. 1534–40, May 2012.
- [225] I. F. Tannock, K. Fizazi, S. Ivanov, C. T. Karlsson, A. Fléchon, I. Skoneczna, F. Orlandi, G. Gravis, V. Matveev, S. Baybek, T. Gil, L. Viana, O. Arén, O. Karyakin, T. Elliott, A. Birtle, E. Magherini, L. Hatteville, D. Petrylak, B. Tombal, and M. Rosenthal, "Aflibercept versus placebo in combination with docetaxel and prednisone for treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer (VENICE): a phase 3, double-blind randomised trial.," *Lancet Oncol.*, vol. 14, no. 8, pp. 760–8, Jul. 2013.
- [226] M. D. Michaelson, S. Oudard, Y.-C. Ou, L. Sengeløv, F. Saad, N. Houede, P. Ostler, A. Stenzl, G. Daugaard, R. Jones, F. Laestadius, A. Ullén, A. Bahl, D. Castellano, J. Gschwend, T. Maurina, E. Chow Maneval, S.-L. Wang, M. J. Lechuga, J. Paolini, and I. Chen, "Randomized, placebo-controlled, phase III trial of sunitinib plus prednisone versus prednisone alone in progressive, metastatic, castration-resistant prostate cancer.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 2, pp. 76–82, Jan. 2014.
- [227] D. C. Smith, M. R. Smith, C. Sweeney, A. A. Elfiky, C. Logothetis, P. G. Corn, N. J. Vogelzang, E. J. Small, A. L. Harzstark, M. S. Gordon, U. N. Vaishampayan, N. B. Haas, A. I. Spira, P. N. Lara, C.-C. Lin, S. Srinivas, A. Sella, P. Schöffski, C. Scheffold, A. L. Weitzman, and M. Hussain, "Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 4, pp. 412–9, Feb. 2013.
- [228] T. B. Dorff, B. Goldman, J. K. Pinski, P. C. Mack, P. N. Lara, P. J. Van Veldhuizen, D. I. Quinn, N. J. Vogelzang, I. M. Thompson, and M. H. A. Hussain, "Clinical and correlative results of SWOG S0354: a phase II trial of CNTO328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, no. 11, pp. 3028–34, Jun. 2010.
- [229] K. Fizazi, J. S. De Bono, A. Flechon, A. Heidenreich, E. Voog, N. B. Davis, M. Qi, R. Bandekar, J. T. Vermeulen, M. Cornfeld, and G. R. Hudes, "Randomised phase II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-IL-6 monoclonal antibody, in combination with mitoxantrone/prednisone versus mitoxantrone/prednisone alone in metastatic castration-resistant prostate cancer.," *Eur. J. Cancer*, vol. 48, no. 1, pp. 85–93, Jan. 2012.
- [230] S. K. Sandhu, K. Papadopoulos, P. C. Fong, A. Patnaik, C. Messiou, D. Olmos, G. Wang, B. J. Tromp, T. A. Puchalski, F. Balkwill, B. Berns, S. Seetharam, J. S. de Bono, and A. W. Tolcher, "A first-in-human, first-in-class, phase I study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 in patients with solid tumors.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 71, no. 4, pp. 1041–50, Apr. 2013.
- [231] K. J. Pienta, J.-P. Machiels, D. Schrijvers, B. Alekseev, M. Shkolnik, S. J. Crabb, S. Li, S. Seetharam, T. A. Puchalski, C. Takimoto, Y. Elsayed, F. Dawkins, and J. S. de Bono, "Phase 2 study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 (CCL2), in metastatic castration-resistant prostate cancer.," *Invest. New Drugs*, vol. 31, no. 3, pp. 760–8, Jul. 2013.
- [232] K. N. Chi, E. Eisenhauer, L. Fazli, E. C. Jones, S. L. Goldenberg, J. Powers, D. Tu, and M. E. Gleave, "A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 97, no. 17, pp. 1287–96, Sep. 2005.
- [233] K. N. Chi, S. J. Hotte, E. Y. Yu, D. Tu, B. J. Eigel, I. Tannock, F. Saad, S. North, J. Powers, M. E. Gleave, and E. A. Eisenhauer, "Randomized phase II study of docetaxel and prednisone with or without OGX-011 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 27, pp. 4247–54, Sep. 2010.
- [234] C. N. Sternberg, H. Dumez, H. Van Poppel, I. Skoneczna, A. Sella, G. Daugaard, T. Gil, J. Graham, P. Carpentier, F. Calabro, L. Collette, and D. Lacombe, "Docetaxel plus oblimersen sodium (Bcl-2 antisense oligonucleotide): an EORTC multicenter, randomized phase II study in patients with castration-resistant prostate cancer.," *Ann. Oncol.*, vol. 20, no. 7, pp. 1264–9, Jul. 2009.
- [235] G. Sonpavde, V. Matveev, J. M. Burke, J. R. Caton, M. T. Fleming, T. E. Hutson, M. D. Galsky, W. R. Berry, P. Karlov, J. T. Holmlund, B. A. Wood, M. Brookes, and L. Leopold, "Randomized phase II trial of docetaxel plus prednisone in combination with placebo or AT-101, an oral small molecule Bcl-2 family antagonist, as first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer.," *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1803–8, Jul. 2012.
- [236] A. W. Tolcher, A. Mita, L. D. Lewis, C. R. Garrett, E. Till, A. I. Daud, A. Patnaik, K. Papadopoulos, C. Takimoto, P. Bartels, A. Keating, and S. Antonia, "Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 32, pp. 5198–203, Nov. 2008.
- [237] A. W. Tolcher, D. I. Quinn, A. Ferrari, F. Ahmann, G. Giaccone, T. Drake, A. Keating, and J. S. de Bono, "A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of survivin, in castration-resistant taxane-pretreated prostate cancer.," *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. 4, pp. 968–73, Apr. 2012.
- [238] P. Wiechno, B. G. Somer, B. Mellado, P. L. Chłosta, J. M. Cervera Grau, D. Castellano, C. Reuter, M. Stöckle, J. Kamradt, J. Pikiel, I. Durán, S. Wedel, S. Callies, V. André, K. Hurt, J. Brown, M. Lahn, and B. Heinrich, "A randomised phase 2 study combining LY2181308 sodium (survivin antisense oligonucleotide) with first-line docetaxel/prednisone in patients with castration-resistant prostate cancer.," *Eur. Urol.*, vol. 65, no. 3, pp. 516–20, Mar. 2014.

- [239] D. D'Amours, F. R. Sallmann, V. M. Dixit, and G. G. Poirier, "Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis.," *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 20, pp. 3771–8, Oct. 2001.
- [240] J. C. Barreto-Andrade, E. V Efimova, H. J. Mauceri, M. A. Beckett, H. G. Sutton, T. E. Darga, E. E. Vokes, M. C. Posner, S. J. Kron, and R. R. Weichselbaum, "Response of human prostate cancer cells and tumors to combining PARP inhibition with ionizing radiation.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 10, no. 7, pp. 1185–93, Jul. 2011.
- [241] D. B. Agus, C. J. Sweeney, M. J. Morris, D. S. Mendelson, D. G. McNeel, F. R. Ahmann, J. Wang, M. K. Derynck, K. Ng, B. Lyons, D. E. Allison, M. W. Kattan, and H. I. Scher, "Efficacy and safety of single-agent pertuzumab (rhuMAb 2C4), a human epidermal growth factor receptor dimerization inhibitor, in castration-resistant prostate cancer after progression from taxane-based therapy.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 6, pp. 675–81, Feb. 2007.
- [242] D. Castellano, J. L. González-Larriba, L. M. Antón-Aparicio, J. Cassinello, E. Grande, E. Esteban, and J. Sepúlveda, "Experience in the use of sunitinib given as a single agent in metastatic chemoresistant and castration-resistant prostate cancer patients.," *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 12, no. 16, pp. 2433–9, Nov. 2011.
- [243] P. Mathew, N. Tannir, S.-M. Tu, S. Wen, C. C. Guo, V. Marcott, B. N. Bekele, and L. Pagliaro, "Accelerated disease progression in prostate cancer and bone metastases with platelet-derived growth factor receptor inhibition: observations with tandutinib.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 68, no. 4, pp. 889–96, Oct. 2011.
- [244] C. Pezaro, M. A. Rosenthal, H. Gurney, I. D. Davis, C. Underhill, M. J. Boyer, D. Kotasek, B. Solomon, and G. C. Toner, "An open-label, single-arm phase two trial of gefitinib in patients with advanced or metastatic castration-resistant prostate cancer.," *Am. J. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 4, pp. 338–41, Aug. 2009.
- [245] M. Salzberg, C. Rochlitz, R. Morant, G. Thalmann, A. Pedrazzini, E. Roggero, A. Schönenberger, A. Knuth, and M. Borner, "An open-label, noncomparative phase II trial to evaluate the efficacy and safety of docetaxel in combination with gefitinib in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer.," *Onkologie*, vol. 30, no. 7, pp. 355–60, Jul. 2007.
- [246] A. Ziada, A. Barqawi, L. M. Glode, M. Varella-Garcia, F. Crichton, S. Majeski, M. Rosenblum, M. Kane, L. Chen, and E. D. Crawford, "The use of trastuzumab in the treatment of hormone refractory prostate cancer; phase II trial.," *Prostate*, vol. 60, no. 4, pp. 332–7, Sep. 2004.
- [247] R. J. Amato, G. Wilding, G. Bubleby, J. Loewy, F. Haluska, and M. E. Gross, "Safety and preliminary efficacy analysis of the mTOR inhibitor ridaforolimus in patients with taxane-treated, castration-resistant prostate cancer.," *Clin. Genitourin. Cancer*, vol. 10, no. 4, pp. 232–8, Dec. 2012.
- [248] K. Kruczek, M. Ratterman, K. Tolzien, S. Sulo, T. M. Lestingi, and C. Nabhan, "A phase II study evaluating the toxicity and efficacy of single-agent temsirolimus in chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer.," *Br. J. Cancer*, vol. 109, no. 7, pp. 1711–6, Oct. 2013.
- [249] A. J. Templeton, V. Dutoit, R. Cathomas, C. Rothermundt, D. Bärtschi, C. Dröge, O. Gautschi, M. Borner, E. Fechter, F. Stenner, R. Winterhalder, B. Müller, R. Schiess, P. J. Wild, J. H. Rüschhoff, G. Thalmann, P.-Y. Dietrich, R. Aebbersold, D. Klingbiel, and S. Gillissen, "Phase 2 trial of single-agent everolimus in chemotherapy-naïve patients with castration-resistant prostate cancer (SAKK 08/08).," *Eur. Urol.*, vol. 64, no. 1, pp. 150–8, Jul. 2013.
- [250] R. Y.-J. Huang, P. Guilford, and J. P. Thiery, "Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition.," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 19, pp. 4417–22, Oct. 2012.
- [251] B. Ozdamar, R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H.-R. Wang, Y. Zhang, and J. L. Wrana, "Regulation of the polarity protein Par6 by TGFβ receptors controls epithelial cell plasticity.," *Science*, vol. 307, no. 5715, pp. 1603–9, Mar. 2005.
- [252] F. H. Brembeck, M. Rosário, and W. Birchmeier, "Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 16, no. 1, pp. 51–9, Feb. 2006.
- [253] T. Kamei, T. Matozaki, T. Sakisaka, A. Kodama, S. Yokoyama, Y. F. Peng, K. Nakano, K. Takaishi, and Y. Takai, "Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells—regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins.," *Oncogene*, vol. 18, no. 48, pp. 6776–84, Nov. 1999.
- [254] K. Fujii, F. Furukawa, and N. Matsuyoshi, "Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptor results in colony dissociation and disturbed E-cadherin function in HSC-1 human cutaneous squamous carcinoma cells.," *Exp. Cell Res.*, vol. 223, no. 1, pp. 50–62, Mar. 1996.
- [255] C. Niehrs, "The complex world of WNT receptor signalling.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 12, pp. 767–79, Dec. 2012.
- [256] M. Yilmaz and G. Christofori, "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion.," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 28, no. 1–2, pp. 15–33, Jun. 2009.
- [257] L. S. Amar, A. H. Shabana, M. Oboeuf, N. Martin, and N. Forest, "Involvement of desmoplakin phosphorylation in the regulation of desmosomes by protein kinase C, in HeLa cells.," *Cell Adhes. Commun.*, vol. 7, no. 2, pp. 125–38, Jan. 1999.

- [258] B. De Craene and G. Berx, "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 2, pp. 97–110, Feb. 2013.
- [259] M. Yilmaz and G. Christofori, "Mechanisms of motility in metastasizing cells.," *Mol. Cancer Res.*, vol. 8, no. 5, pp. 629–42, May 2010.
- [260] N. A. Bhowmick, M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C. A. Lundquist, M. E. Engel, C. L. Arteaga, and H. L. Moses, "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 12, no. 1, pp. 27–36, Jan. 2001.
- [261] G. A. Wildenberg, M. R. Dohn, R. H. Carnahan, M. A. Davis, N. A. Lobdell, J. Settleman, and A. B. Reynolds, "p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho.," *Cell*, vol. 127, no. 5, pp. 1027–39, Dec. 2006.
- [262] A. Joshi and D. Cao, "TGF-beta signaling, tumor microenvironment and tumor progression: the butterfly effect.," *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, vol. 15, pp. 180–94, Jan. 2010.
- [263] A. Sundqvist, P. Ten Dijke, and H. van Dam, "Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: Smad signal integration in epithelial cell plasticity.," *Breast Cancer Res.*, vol. 14, no. 1, p. 204, Jan. 2012.
- [264] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 178–96, Mar. 2014.
- [265] Y. Wu, X. Zhang, M. Salmon, X. Lin, and Z. E. Zehner, "TGFbeta1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, no. 3, pp. 427–39, Mar. 2007.
- [266] H. Peinado, D. Olmeda, and A. Cano, "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 6, pp. 415–28, Jun. 2007.
- [267] M. J. Wheelock, Y. Shintani, M. Maeda, Y. Fukumoto, and K. R. Johnson, "Cadherin switching.," *J. Cell Sci.*, vol. 121, no. Pt 6, pp. 727–35, Mar. 2008.
- [268] E. Theveneau and R. Mayor, "Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 677–84, Oct. 2012.
- [269] F. Comunale, M. Causeret, C. Favard, J. Cau, N. Taulet, S. Charrasse, and C. Gauthier-Rouvière, "Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts.," *Biol. Cell*, vol. 99, no. 9, pp. 503–17, Sep. 2007.
- [270] D. M. Toivola, G.-Z. Tao, A. Habtezion, J. Liao, and M. B. Omary, "Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments.," *Trends Cell Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 608–17, Nov. 2005.
- [271] J. Ivaska, K. Vuoriluoto, T. Huovinen, I. Izawa, M. Inagaki, and P. J. Parker, "PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility.," *EMBO J.*, vol. 24, no. 22, pp. 3834–45, Nov. 2005.
- [272] M. G. Mendez, S.-I. Kojima, and R. D. Goldman, "Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition.," *FASEB J.*, vol. 24, no. 6, pp. 1838–51, Jun. 2010.
- [273] L. S. Havel, E. R. Kline, A. M. Salgueiro, and A. I. Marcus, "Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2-Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity.," *Oncogene*, May 2014.
- [274] W. J. Nelson, "Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 1, p. a000513, Jul. 2009.
- [275] N. Mise, R. Sawai, H. Yu, J. Schwarz, N. Kaminski, and O. Eickelberg, "Zyxin is a transforming growth factor-beta (TGF-beta)/Smad3 target gene that regulates lung cancer cell motility via integrin alpha5beta1.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 37, pp. 31393–405, Sep. 2012.
- [276] Y.-C. Yeh, W.-C. Wei, Y.-K. Wang, S.-C. Lin, J.-M. Sung, and M.-J. Tang, "Transforming growth factor-beta1 induces Smad3-dependent beta1 integrin gene expression in epithelial-to-mesenchymal transition during chronic tubulointerstitial fibrosis.," *Am. J. Pathol.*, vol. 177, no. 4, pp. 1743–54, Oct. 2010.
- [277] S. Maschler, G. Wirl, H. Spring, D. V Bredow, I. Sordat, H. Beug, and E. Reichmann, "Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization.," *Oncogene*, vol. 24, no. 12, pp. 2032–41, Mar. 2005.
- [278] A. Koenig, C. Mueller, C. Hasel, G. Adler, and A. Menke, "Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells.," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 9, pp. 4662–71, May 2006.

- [279] Y. Shintani, Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M. J. Wheelock, and K. R. Johnson, "Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1.," *J. Cell Biol.*, vol. 180, no. 6, pp. 1277–89, Mar. 2008.
- [280] P. Nisticò, M. J. Bissell, and D. C. Radisky, "Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 2, Feb. 2012.
- [281] M. A. Eckert, T. M. Lwin, A. T. Chang, J. Kim, E. Danis, L. Ohno-Machado, and J. Yang, "Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis.," *Cancer Cell*, vol. 19, no. 3, pp. 372–86, Mar. 2011.
- [282] M. A. McNiven, "Breaking away: matrix remodeling from the leading edge.," *Trends Cell Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 16–21, Jan. 2013.
- [283] P. Liu, J. Yang, J. Pei, D. Pei, and M. J. Wilson, "Regulation of MT1-MMP activity by β -catenin in MDCK non-cancer and HT1080 cancer cells.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 225, no. 3, pp. 810–21, Nov. 2010.
- [284] E. Sánchez-Tilló, O. de Barrios, L. Siles, M. Cuatrecasas, A. Castells, and A. Postigo, " β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 48, pp. 19204–9, Nov. 2011.
- [285] C.-C. Yang, L.-F. Zhu, X.-H. Xu, T.-Y. Ning, J.-H. Ye, and L.-K. Liu, "Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells.," *BMC Cancer*, vol. 13, p. 171, Jan. 2013.
- [286] C. S. Scanlon, E. A. Van Tubergen, R. C. Inglehart, and N. J. D'Silva, "Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma.," *J. Dent. Res.*, vol. 92, no. 2, pp. 114–21, Feb. 2013.
- [287] L. Vičovac and J. D. Aplin, "Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation.," *Acta Anat. (Basel)*, vol. 156, no. 3, pp. 202–16, Jan. 1996.
- [288] E. D. Hay, "An overview of epithelio-mesenchymal transformation.," *Acta Anat. (Basel)*, vol. 154, no. 1, pp. 8–20, Jan. 1995.
- [289] I. Skromne and C. D. Stern, "Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo.," *Development*, vol. 128, no. 15, pp. 2915–27, Aug. 2001.
- [290] P. Liu, M. Wakamiya, M. J. Shea, U. Albrecht, R. R. Behringer, and A. Bradley, "Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation.," *Nat. Genet.*, vol. 22, no. 4, pp. 361–5, Aug. 1999.
- [291] J. L. Duband and J. P. Thiery, "Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation.," *Dev. Biol.*, vol. 94, no. 2, pp. 337–50, Dec. 1982.
- [292] T. Sauka-Spengler and M. Bronner-Fraser, "A gene regulatory network orchestrates neural crest formation.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 7, pp. 557–68, Jul. 2008.
- [293] T. Burstyn-Cohen, J. Stanleigh, D. Sela-Donenfeld, and C. Kalcheim, "Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition.," *Development*, vol. 131, no. 21, pp. 5327–39, Nov. 2004.
- [294] T. A. Wynn and T. R. Ramalingam, "Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease.," *Nat. Med.*, vol. 18, no. 7, pp. 1028–40, Jul. 2012.
- [295] F. Strutz, M. Zeisberg, F. N. Ziyadeh, C.-Q. Yang, R. Kalluri, G. A. Müller, and E. G. Neilson, "Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation.," *Kidney Int.*, vol. 61, no. 5, pp. 1714–28, May 2002.
- [296] H. Okada, T. M. Danoff, R. Kalluri, and E. G. Neilson, "Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation.," *Am. J. Physiol.*, vol. 273, no. 4 Pt 2, pp. F563–74, Oct. 1997.
- [297] R. Kalluri and R. A. Weinberg, "The basics of epithelial-mesenchymal transition.," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–8, Jun. 2009.
- [298] M. P. Rastaldi, F. Ferrario, L. Giardino, G. Dell'Antonio, C. Grillo, P. Grillo, F. Strutz, G. A. Müller, G. Colasanti, and G. D'Amico, "Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies.," *Kidney Int.*, vol. 62, no. 1, pp. 137–46, Jul. 2002.
- [299] F. Bataille, C. Rohrmeier, R. Bates, A. Weber, F. Rieder, J. Brenmoehl, U. Strauch, S. Farkas, A. Fürst, F. Hofstädter, J. Schölmerich, H. Herfarth, and G. Rogler, "Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease.," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 14, no. 11, pp. 1514–27, Nov. 2008.
- [300] E. D. Hay, "Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation.," *Cell Differ. Dev.*, vol. 32, no. 3, pp. 367–75, Dec. 1990.

- [301] M. J. Bussemakers, R. J. van Moorselaar, L. A. Girolidi, T. Ichikawa, J. T. Isaacs, M. Takeichi, F. M. Debruyne, and J. A. Schalken, "Decreased expression of E-cadherin in the progression of rat prostatic cancer.," *Cancer Res.*, vol. 52, no. 10, pp. 2916–22, May 1992.
- [302] M. A. Rubin, N. R. Mucci, J. Figurski, A. Fecko, K. J. Pienta, and M. L. Day, "E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology.," *Hum. Pathol.*, vol. 32, no. 7, pp. 690–7, Jul. 2001.
- [303] C. L. Chaffer, J. P. Brennan, J. L. Slavin, T. Blick, E. W. Thompson, and E. D. Williams, "Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2.," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 23, pp. 11271–8, Dec. 2006.
- [304] J. Banyard, I. Chung, A. M. Wilson, G. Vetter, A. Le Béchech, D. R. Bielenberg, and B. R. Zetter, "Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model.," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 3151, Jan. 2013.
- [305] B. J. W. van Denderen and E. W. Thompson, "Cancer: The to and fro of tumour spread.," *Nature*, vol. 493, no. 7433, pp. 487–8, Jan. 2013.
- [306] J. H. VAN BERLO, J. W. VONCKEN, N. KUBBEN, J. L. V. BROERS, R. DUISTERS, R. E. W. VAN LEEUWEN, H. J. G. M. CRIJNS, F. C. S. RAMAEKERS, C. J. HUTCHISON, and Y. M. PINTO, "A-type lamins are essential for TGF- β 1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 19, pp. 2839–2849.
- [307] X.-H. Feng and R. Derynck, "Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads.," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 21, pp. 659–93, Jan. 2005.
- [308] U. Valcourt, M. Kowanzetz, H. Niimi, C.-H. Heldin, and A. Moustakas, "TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 4, pp. 1987–2002, May 2005.
- [309] S. Edlund, M. Landström, C.-H. Heldin, and P. Aspenström, "Smad7 is required for TGF-beta-induced activation of the small GTPase Cdc42.," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 9, pp. 1835–47, Apr. 2004.
- [310] A. V Bakin, A. K. Tomlinson, N. A. Bhowmick, H. L. Moses, and C. L. Arteaga, "Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 47, pp. 36803–10, Nov. 2000.
- [311] M. K. Lee, C. Pardoux, M. C. Hall, P. S. Lee, D. Warburton, J. Qing, S. M. Smith, and R. Derynck, "TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA.," *EMBO J.*, vol. 26, no. 17, pp. 3957–67, Oct. 2007.
- [312] M. Yamashita, K. Fatyol, C. Jin, X. Wang, Z. Liu, and Y. E. Zhang, "TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta.," *Mol. Cell*, vol. 31, no. 6, pp. 918–24, Oct. 2008.
- [313] C. J. Powers, S. W. McLeskey, and A. Wellstein, "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling.," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 7, no. 3, pp. 165–97, Sep. 2000.
- [314] C. Billottet, M. Tuefferd, D. Gentien, A. Rapinat, J.-P. Thiery, P. Broët, and J. Jouanneau, "Modulation of several waves of gene expression during FGF-1 induced epithelial-mesenchymal transition of carcinoma cells.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 104, no. 3, pp. 826–39, Jun. 2008.
- [315] Z. Lu, S. Ghosh, Z. Wang, and T. Hunter, "Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion.," *Cancer Cell*, vol. 4, no. 6, pp. 499–515, Dec. 2003.
- [316] N. Ahmed, S. Maines-Bandiera, M. A. Quinn, W. G. Unger, S. Dedhar, and N. Auersperg, "Molecular pathways regulating EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 290, no. 6, pp. C1532–42, Jun. 2006.
- [317] S. E. Moody, D. Perez, T. Pan, C. J. Sarkisian, C. P. Portocarrero, C. J. Sterner, K. L. Notorfrancesco, R. D. Cardiff, and L. A. Chodosh, "The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence.," *Cancer Cell*, vol. 8, no. 3, pp. 197–209, Sep. 2005.
- [318] M. Stoker and M. Perryman, "An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts.," *J. Cell Sci.*, vol. 77, pp. 209–23, Aug. 1985.
- [319] P. Savagner, K. M. Yamada, and J. P. Thiery, "The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition.," *J. Cell Biol.*, vol. 137, no. 6, pp. 1403–19, Jun. 1997.
- [320] L. S. Wanami, H.-Y. Chen, S. Peiró, A. García de Herreros, and R. E. Bachelder, "Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: implications for tumor progression.," *Exp. Cell Res.*, vol. 314, no. 13, pp. 2448–53, Aug. 2008.
- [321] H.-J. Kim, B. C. Litzenburger, X. Cui, D. A. Delgado, B. C. Grabner, X. Lin, M. T. Lewis, M. M. Gottardis, T. W. Wong, R. M. Attar, J. M. Carboni, and A. V Lee, "Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and

- xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF- κ B and snail,," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 8, pp. 3165–75, May 2007.
- [322] T. R. Graham, H. E. Zhau, V. A. Odero-Marah, A. O. Osunkoya, K. S. Kimbro, M. Tighiouart, T. Liu, J. W. Simons, and R. M. O'Regan, "Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells,," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 7, pp. 2479–88, Apr. 2008.
- [323] V. Cortez, B. C. Nair, D. Chakravarty, and R. K. Vadlamudi, "Integrin-linked kinase 1: role in hormonal cancer progression,," *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, vol. 3, pp. 788–96, Jan. 2011.
- [324] Z. Yan, H. Yin, R. Wang, D. Wu, W. Sun, B. Liu, and Q. Su, "Overexpression of integrin-linked kinase (ILK) promotes migration and invasion of colorectal cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via NF- κ B signaling,," *Acta Histochem.*, vol. 116, no. 3, pp. 527–33, Apr. 2014.
- [325] Y. Matsui, K. Assi, O. Ogawa, P. A. Raven, S. Dedhar, M. E. Gleave, B. Salh, and A. I. So, "The importance of integrin-linked kinase in the regulation of bladder cancer invasion,," *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 3, pp. 521–31, Feb. 2012.
- [326] Y. Xing, J. Qi, S. Deng, C. Wang, L. Zhang, and J. Chen, "Small interfering RNA targeting ILK inhibits metastasis in human tongue cancer cells through repression of epithelial-to-mesenchymal transition,," *Exp. Cell Res.*, vol. 319, no. 13, pp. 2058–72, Aug. 2013.
- [327] D. D. Becker-Santos, Y. Guo, M. Ghaffari, E. D. Vickers, M. Lehman, M. Altamirano-Dimas, A. Oloumi, J. Furukawa, M. Sharma, Y. Wang, S. Dedhar, and M. E. Cox, "Integrin-linked kinase as a target for ERG-mediated invasive properties in prostate cancer models,," *Carcinogenesis*, vol. 33, no. 12, pp. 2558–67, Dec. 2012.
- [328] O. Leshem, S. Madar, I. Kogan-Sakin, I. Kamer, I. Goldstein, R. Brosh, Y. Cohen, J. Jacob-Hirsch, M. Ehrlich, S. Ben-Sasson, N. Goldfinger, R. Loewenthal, E. Gazit, V. Rotter, and R. Berger, "TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model,," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. e21650, Jan. 2011.
- [329] Y. Wang, Y. X. Zhang, C. Z. Kong, Z. Zhang, and Y. Y. Zhu, "Loss of P53 facilitates invasion and metastasis of prostate cancer cells,," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 384, no. 1–2, pp. 121–7, Dec. 2013.
- [330] G. van der Horst, C. van den Hoogen, J. T. Buijs, H. Cheung, H. Bloys, R. C. M. Pelger, G. Lorenzon, B. Heckmann, J. Feyen, P. Pujuguet, R. Blaque, P. Clément-Lacroix, and G. van der Pluijm, "Targeting of $\alpha(v)$ -integrins in stem/progenitor cells and supportive microenvironment impairs bone metastasis in human prostate cancer,," *Neoplasia*, vol. 13, no. 6, pp. 516–25, Jun. 2011.
- [331] C. Jamieson, M. Sharma, and B. R. Henderson, "Targeting the β -catenin nuclear transport pathway in cancer,," *Semin. Cancer Biol.*, May 2014.
- [332] Y. Komiya and R. Habas, "Wnt signal transduction pathways,," *Organogenesis*, vol. 4, no. 2, pp. 68–75, Apr. 2008.
- [333] K. Wu, D. Xie, Y. Zou, T. Zhang, R.-C. Pong, G. Xiao, L. Fazli, M. Gleave, D. He, D. A. Boothman, and J.-T. Hsieh, "The mechanism of DAB2IP in chemoresistance of prostate cancer cells,," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 17, pp. 4740–9, Sep. 2013.
- [334] D. Medici, E. D. Hay, and B. R. Olsen, "Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3,," *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 11, pp. 4875–87, Nov. 2008.
- [335] J. Heuberger and W. Birchmeier, "Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling,," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 2, p. a002915, Feb. 2010.
- [336] X. Li, Y. Xu, Y. Chen, S. Chen, X. Jia, T. Sun, Y. Liu, X. Li, R. Xiang, and N. Li, "SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/ β -catenin signal network,," *Cancer Lett.*, vol. 336, no. 2, pp. 379–89, Aug. 2013.
- [337] X. Yu, Y. Wang, D. J. DeGraff, M. L. Wills, and R. J. Matusik, "Wnt/ β -catenin activation promotes prostate tumor progression in a mouse model,," *Oncogene*, vol. 30, no. 16, pp. 1868–79, Apr. 2011.
- [338] X. Wan, J. Liu, J.-F. Lu, V. Tzelepi, J. Yang, M. W. Starbuck, L. Diao, J. Wang, E. Efstathiou, E. S. Vazquez, P. Troncoso, S. N. Maity, and N. M. Navone, "Activation of β -catenin signaling in androgen receptor-negative prostate cancer cells,," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 726–36, Feb. 2012.
- [339] S. Babayeva, Y. Zilber, and E. Torban, "Planar cell polarity pathway regulates actin rearrangement, cell shape, motility, and nephrin distribution in podocytes,," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 300, no. 2, pp. F549–60, Feb. 2011.
- [340] A. De, "Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview,," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 43, no. 10, pp. 745–56, Oct. 2011.
- [341] H. Bo, S. Zhang, L. Gao, Y. Chen, J. Zhang, X. Chang, and M. Zhu, "Upregulation of Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells,," *BMC Cancer*, vol. 13, p. 496, Jan. 2013.

- [342] M. Kanzawa, S. Semba, S. Hara, T. Itoh, and H. Yokozaki, "WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells," *Pathobiology*, vol. 80, no. 5, pp. 235–44, Jan. 2013.
- [343] Q. Wang, A. J. Symes, C. A. Kane, A. Freeman, J. Nariculam, P. Munson, C. Thrasivoulou, J. R. W. Masters, and A. Ahmed, "A novel role for Wnt/Ca²⁺ signaling in actin cytoskeleton remodeling and cell motility in prostate cancer," *PLoS One*, vol. 5, no. 5, p. e10456, Jan. 2010.
- [344] C.-L. Chen, D. Mahalingam, P. Osmulski, R. R. Jadhav, C.-M. Wang, R. J. Leach, T.-C. Chang, S. D. Weitman, A. P. Kumar, L. Sun, M. E. Gaczynska, I. M. Thompson, and T. H.-M. Huang, "Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer," *Prostate*, vol. 73, no. 8, pp. 813–26, Jun. 2013.
- [345] Y. Li, M. Y. Maitah, A. Ahmad, D. Kong, B. Bao, and F. H. Sarkar, "Targeting the Hedgehog signaling pathway for cancer therapy," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 16, no. 1, pp. 49–66, Jan. 2012.
- [346] J. T. Eggenschwiler and K. V. Anderson, "Cilia and developmental signaling," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, pp. 345–73, Jan. 2007.
- [347] X. Li, W. Deng, C. D. Nail, S. K. Bailey, M. H. Kraus, J. M. Ruppert, and S. M. Lobo-Ruppert, "Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation," *Oncogene*, vol. 25, no. 4, pp. 609–21, Jan. 2006.
- [348] M. Y. Maitah, S. Ali, A. Ahmad, S. Gadgeel, and F. H. Sarkar, "Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e16068, Jan. 2011.
- [349] I. Espinoza, R. Pochampally, F. Xing, K. Watabe, and L. Miele, "Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 6, pp. 1249–59, Jan. 2013.
- [350] L. A. Timmerman, J. Grego-Bessa, A. Raya, E. Bertrán, J. M. Pérez-Pomares, J. Díez, S. Aranda, S. Palomo, F. McCormick, J. C. Izpisua-Belmonte, and J. L. de la Pompa, "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation," *Genes Dev.*, vol. 18, no. 1, pp. 99–115, Jan. 2004.
- [351] K. Niessen, Y. Fu, L. Chang, P. A. Hoodless, D. McFadden, and A. Karsan, "Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization," *J. Cell Biol.*, vol. 182, no. 2, pp. 315–25, Jul. 2008.
- [352] S. Sethi, J. Macoska, W. Chen, and F. H. Sarkar, "Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 90–9, Jan. 2010.
- [353] H. Zhu, X. Zhou, S. Redfield, J. Lewin, and L. Miele, "Elevated Jagged-1 and Notch-1 expression in high grade and metastatic prostate cancers," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 368–78, Jan. 2013.
- [354] H. Cai, I. Babic, X. Wei, J. Huang, and O. N. Witte, "Invasive prostate carcinoma driven by c-Src and androgen receptor synergy," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 3, pp. 862–72, Feb. 2011.
- [355] T. Lu, W.-J. Lin, K. Izumi, X. Wang, D. Xu, L.-Y. Fang, L. Li, Q. Jiang, J. Jin, and C. Chang, "Targeting androgen receptor to suppress macrophage-induced EMT and benign prostatic hyperplasia (BPH) development," *Mol. Endocrinol.*, vol. 26, no. 10, pp. 1707–15, Oct. 2012.
- [356] M.-L. Zhu and N. Kyprianou, "Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells," *FASEB J.*, vol. 24, no. 3, pp. 769–77, Mar. 2010.
- [357] T. R. Graham, R. Yacoub, L. Taliaferro-Smith, A. O. Osunkoya, V. A. Odero-Marah, T. Liu, K. S. Kimbro, D. Sharma, and R. M. O'Regan, "Reciprocal regulation of ZEB1 and AR in triple negative breast cancer cells," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 123, no. 1, pp. 139–47, Aug. 2010.
- [358] S. Jacob, S. Nayak, G. Fernandes, R. S. Barai, S. Menon, U. K. Chaudhari, S. D. Kholkute, and G. Sachdeva, "Androgen receptor as a regulator of ZEB2 expression and its implications in epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 21, no. 3, pp. 473–86, Jun. 2014.
- [359] S. M. Mooney, P. Parsana, J. R. Hernandez, X. Liu, J. E. Verdone, G. Torga, C. A. Harberg, and K. J. Pienta, "The presence of Androgen Receptor Elements regulates ZEB1 expression in the absence of Androgen Receptor," *J. Cell. Biochem.*, Aug. 2014.
- [360] P. Ru, R. Steele, P. Newhall, N. J. Phillips, K. Toth, and R. B. Ray, "miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 5, pp. 1166–73, May 2012.
- [361] Y.-N. Liu, J. J. Yin, W. Abou-Kheir, P. G. Hynes, O. M. Casey, L. Fang, M. Yi, R. M. Stephens, V. Seng, H. Sheppard-Tillman, P. Martin, and K. Kelly, "MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms," *Oncogene*, vol. 32, no. 3, pp. 296–306, Jan. 2013.
- [362] M. Moes, A. Le Béhec, I. Crespo, C. Laurini, A. Halavaty, G. Vetter, A. Del Sol, and E. Friederich, "A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e35440, Jan. 2012.

- [363] C. P. Bracken, P. A. Gregory, N. Kolesnikoff, A. G. Bert, J. Wang, M. F. Shannon, and G. J. Goodall, "A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition.," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 19, pp. 7846–54, Oct. 2008.
- [364] O. Tang, X.-M. Chen, S. Shen, M. Hahn, and C. A. Pollock, "MiRNA-200b represses transforming growth factor- β -induced EMT and fibronectin expression in kidney proximal tubular cells.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 304, no. 10, pp. F1266–73, May 2013.
- [365] S. Saini, S. Majid, S. Yamamura, L. Tabatabai, S. O. Suh, V. Shahryari, Y. Chen, G. Deng, Y. Tanaka, and R. Dahiya, "Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and Metastasis.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 16, pp. 5287–98, Aug. 2011.
- [366] P. Gandellini, M. Folini, N. Longoni, M. Pennati, M. Binda, M. Colecchia, R. Salvioni, R. Supino, R. Moretti, P. Limonta, R. Valdagni, M. G. Daidone, and N. Zaffaroni, "miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon.," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 6, pp. 2287–95, Mar. 2009.
- [367] D. Kong, Y. Li, Z. Wang, S. Banerjee, A. Ahmad, H.-R. C. Kim, and F. H. Sarkar, "miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells.," *Stem Cells*, vol. 27, no. 8, pp. 1712–21, Aug. 2009.
- [368] P. A. Gregory, C. P. Bracken, E. Smith, A. G. Bert, J. A. Wright, S. Roslan, M. Morris, L. Wyatt, G. Farshid, Y.-Y. Lim, G. J. Lindeman, M. F. Shannon, P. A. Drew, Y. Khew-Goodall, and G. J. Goodall, "An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, no. 10, pp. 1686–98, May 2011.
- [369] S. Valastyan and R. A. Weinberg, "miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles.," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 11, pp. 2124–9, Jun. 2010.
- [370] F. Zheng, Y.-J. Liao, M.-Y. Cai, Y.-H. Liu, T.-H. Liu, S.-P. Chen, X.-W. Bian, X.-Y. Guan, M. C. Lin, Y.-X. Zeng, H.-F. Kung, and D. Xie, "The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2.," *Gut*, vol. 61, no. 2, pp. 278–89, Feb. 2012.
- [371] Z. Meng, X. Fu, X. Chen, S. Zeng, Y. Tian, R. Jove, R. Xu, and W. Huang, "miR-194 is a marker of hepatic epithelial cells and suppresses metastasis of liver cancer cells in mice.," *Hepatology*, vol. 52, no. 6, pp. 2148–57, Dec. 2010.
- [372] I. Serrano, P. C. McDonald, F. E. Lock, and S. Dedhar, "Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGF β -1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT).," *Oncogene*, vol. 32, no. 1, pp. 50–60, Jan. 2013.
- [373] H.-Y. Kang, K.-E. Huang, S. Y. Chang, W.-L. Ma, W.-J. Lin, and C. Chang, "Differential modulation of androgen receptor-mediated transactivation by Smad3 and tumor suppressor Smad4.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 46, pp. 43749–56, Nov. 2002.
- [374] J. Fuxe, T. Vincent, and A. Garcia de Herreros, "Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes.," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 12, pp. 2363–74, Jun. 2010.
- [375] J. Zavadil, L. Cermak, N. Soto-Nieves, and E. P. Böttinger, "Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition.," *EMBO J.*, vol. 23, no. 5, pp. 1155–65, Mar. 2004.
- [376] D. Kong, Y. Li, Z. Wang, and F. H. Sarkar, "Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins?," *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 716–29, Feb. 2011.
- [377] H. Acloque, M. S. Adams, K. Fishwick, M. Bronner-Fraser, and M. A. Nieto, "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease.," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 6, pp. 1438–49, Jun. 2009.
- [378] U. Ullmann, P. In't Veld, C. Gilles, K. Sermon, M. De Rycke, H. Van de Velde, A. Van Steirteghem, and I. Liebaers, "Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions.," *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 13, no. 1, pp. 21–32, Jan. 2007.
- [379] M. Shipitsin, L. L. Campbell, P. Argani, S. Weremowicz, N. Bloushtain-Qimron, J. Yao, T. Nikolskaya, T. Serebryiskaya, R. Beroukham, M. Hu, M. K. Halushka, S. Sukumar, L. M. Parker, K. S. Anderson, L. N. Harris, J. E. Garber, A. L. Richardson, S. J. Schmitt, Y. Nikolsky, R. S. Gelman, and K. Polyak, "Molecular definition of breast tumor heterogeneity.," *Cancer Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 259–73, Mar. 2007.
- [380] L. Vermeulen, F. De Sousa E Melo, M. van der Heijden, K. Cameron, J. H. de Jong, T. Borovski, J. B. Tuynman, M. Todaro, C. Merz, H. Rodermond, M. R. Sprick, K. Kemper, D. J. Richel, G. Stassi, and J. P. Medema, "Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 5, pp. 468–76, May 2010.
- [381] L. Patrawala, T. Calhoun, R. Schneider-Broussard, J. Zhou, K. Claypool, and D. G. Tang, "Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 14, pp. 6207–19, Jul. 2005.
- [382] J. Domingo-Domenech, S. J. Vidal, V. Rodriguez-Bravo, M. Castillo-Martin, S. A. Quinn, R. Rodriguez-Barrueco, D. M. Bonal, E. Charytonowicz, N. Gladoun, J. de la Iglesia-Vicente, D. P. Petrylak, M. C. Benson, J. M. Silva, and C. Cordon-Cardo, "Suppression of

- acquired docetaxel resistance in prostate cancer through depletion of notch- and hedgehog-dependent tumor-initiating cells.," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 373–88, Sep. 2012.
- [383] O. D. İşeri, M. D. Kars, F. Arpacı, C. Atalay, I. Pak, and U. Gündüz, "Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern.," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 65, no. 1, pp. 40–5, Feb. 2011.
- [384] M. Marín-Aguilera, J. Codony-Servat, S. G. Kalko, P. L. Fernández, R. Bermudo, E. Buxo, M. J. Ribal, P. Gascón, and B. Mellado, "Identification of docetaxel resistance genes in castration-resistant prostate cancer.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 2, pp. 329–39, Feb. 2012.
- [385] J. Ren, Y. Chen, H. Song, L. Chen, and R. Wang, "Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 114, no. 6, pp. 1395–403, Jun. 2013.
- [386] M. Puhr, J. Hoefler, G. Schäfer, H. H. H. Erb, S. J. Oh, H. Klocker, I. Heidegger, H. Neuwirt, and Z. Culig, "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Leads to Docetaxel Resistance in Prostate Cancer and Is Mediated by Reduced Expression of miR-200c and miR-205," *The American Journal of Pathology*. 2012.
- [387] S. A. Mani, W. Guo, M.-J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R. A. Weinberg, "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.," *Cell*, vol. 133, no. 4, pp. 704–15, May 2008.
- [388] F. L. Conlon, Y. Miteva, E. Kaltenbrun, L. Waldron, T. M. Greco, and I. M. Cristea, "Immunoisolation of protein complexes from *Xenopus*.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 917, pp. 369–90, Jan. 2012.
- [389] H. J. Peltier and G. J. Latham, "Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues.," *RNA*, vol. 14, no. 5, pp. 844–52, May 2008.
- [390] D. P. Tonge and T. W. Gant, "Evidence based housekeeping gene selection for microRNA-sequencing (miRNA-seq) studies," *Toxicol. Res. (Camb)*, vol. 2, no. 5, p. 328, Aug. 2013.
- [391] S. Leskelä, L. J. Leandro-García, M. Mendiola, J. Barriuso, L. Inglada-Pérez, I. Muñoz, B. Martínez-Delgado, A. Redondo, J. de Santiago, M. Robledo, D. Hardisson, and C. Rodríguez-Antona, "The miR-200 family controls beta-tubulin III expression and is associated with paclitaxel-based treatment response and progression-free survival in ovarian cancer patients.," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 85–95, Feb. 2011.
- [392] X. Zhu, Y. Li, C. Xie, X. Yin, Y. Liu, Y. Cao, Y. Fang, X. Lin, Y. Xu, W. Xu, H. Shen, and J. Wen, "miR-145 sensitizes ovarian cancer cells to paclitaxel by targeting Sp1 and Cdk6.," *Int. J. Cancer*, vol. 135, no. 6, pp. 1286–96, Sep. 2014.
- [393] H.-M. Lin, L. Castillo, K. L. Mahon, K. Chiam, B. Y. Lee, Q. Nguyen, M. J. Boyer, M. R. Stockler, N. Pavlakis, G. Marx, G. Mallesara, H. Gurney, S. J. Clark, A. Swarbrick, R. J. Daly, and L. G. Horvath, "Circulating microRNAs are associated with docetaxel chemotherapy outcome in castration-resistant prostate cancer.," *Br. J. Cancer*, vol. 110, no. 10, pp. 2462–71, May 2014.
- [394] D. M. Dykxhoorn, "MicroRNAs and metastasis: little RNAs go a long way.," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 16, pp. 6401–6, Aug. 2010.
- [395] C. J. Gröger, M. Grubinger, T. Waldhör, K. Vierlinger, and W. Mikulits, "Meta-analysis of gene expression signatures defining the epithelial to mesenchymal transition during cancer progression.," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e51136, Jan. 2012.
- [396] U. Burk, J. Schubert, U. Wellner, O. Schmalhofer, E. Vincan, S. Spaderna, and T. Brabletz, "A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells.," *EMBO Rep.*, vol. 9, no. 6, pp. 582–9, Jun. 2008.
- [397] A. Git, H. Dvinge, M. Salmon-Divon, M. Osborne, C. Kutter, J. Hadfield, P. Bertone, and C. Caldas, "Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression.," *RNA*, vol. 16, no. 5, pp. 991–1006, May 2010.
- [398] M. Croset, D. Goehrig, A. Frackowiak, E. Bonnelye, S. Ansieau, A. Puisieux, and P. Clézardin, "TWIST1 Expression in Breast Cancer Cells Facilitates Bone Metastasis Formation.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 29, no. 8, pp. 1886–99, Aug. 2014.
- [399] J.-P. Zhang, C. Zeng, L. Xu, J. Gong, J.-H. Fang, and S.-M. Zhuang, "MicroRNA-148a suppresses the epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatoma cells by targeting Met/Snail signaling.," *Oncogene*, vol. 33, no. 31, pp. 4069–76, Jul. 2014.
- [400] M.-H. Yang, J. Yu, N. Chen, X.-Y. Wang, X.-Y. Liu, S. Wang, and Y.-Q. Ding, "Elevated microRNA-31 expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene SATB2.," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e85353, Jan. 2013.
- [401] P.-C. Lin, Y.-L. Chiu, S. Banerjee, K. Park, J. M. Mosquera, E. Giannopoulou, P. Alves, A. K. Tewari, M. B. Gerstein, H. Beltran, A. M. Melnick, O. Elemento, F. Demichelis, and M. A. Rubin, "Epigenetic repression of miR-31 disrupts androgen receptor homeostasis and contributes to prostate cancer progression.," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 3, pp. 1232–44, Feb. 2013.
- [402] N. Martin, S. Aarab-Terrisse, F. Commo, N. A. Nakouzi, C. Gaudin, S. Lejuste, S. Cotteret, C. Massard, K. Fizazi, and A. Chachereau, "Abstract 823: Integration of microRNA and gene expression signatures from several models of Docetaxel-resistant prostate cancer cell lines," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 8 Supplement, pp. 823–823, Jun. 2012.

- [403] V. J. Wielenga, R. Smits, V. Korinek, L. Smit, M. Kielman, R. Fodde, H. Clevers, and S. T. Pals, "Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway.," *Am. J. Pathol.*, vol. 154, no. 2, pp. 515–23, Feb. 1999.
- [404] P. Blache, M. van de Wetering, I. Duluc, C. Domon, P. Berta, J.-N. Freund, H. Clevers, and P. Jay, "SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes.," *J. Cell Biol.*, vol. 166, no. 1, pp. 37–47, Jul. 2004.
- [405] K. A. Longo, J. A. Kennell, M. J. Ochocinska, S. E. Ross, W. S. Wright, and O. A. MacDougald, "Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 41, pp. 38239–44, Oct. 2002.
- [406] D. R. Chesire, T. A. Dunn, C. M. Ewing, J. Luo, and W. B. Isaacs, "Identification of aryl hydrocarbon receptor as a putative Wnt/beta-catenin pathway target gene in prostate cancer cells.," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 7, pp. 2523–33, Apr. 2004.
- [407] D. ten Berge, W. Koole, C. Fuerer, M. Fish, E. Eroglu, and R. Nusse, "Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies.," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 5, pp. 508–18, Nov. 2008.
- [408] M. A. van der Heyden, M. B. Rook, M. M. Hermans, G. Rijksen, J. Boonstra, L. H. Defize, and O. H. Destrée, "Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling.," *J. Cell Sci.*, vol. 111 (Pt 1), pp. 1741–9, Jun. 1998.
- [409] H. C. Crawford, B. M. Fingleton, L. A. Rudolph-Owen, K. J. Goss, B. Rubinfeld, P. Polakis, and L. M. Matrisian, "The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors.," *Oncogene*, vol. 18, no. 18, pp. 2883–91, May 1999.
- [410] P.-Y. Chu, F.-W. Hu, C.-C. Yu, L.-L. Tsai, C.-H. Yu, B.-C. Wu, Y.-W. Chen, P.-I. Huang, and W.-L. Lo, "Epithelial-mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck cancer.," *Oral Oncol.*, vol. 49, no. 1, pp. 34–41, Jan. 2013.
- [411] Y. Kam and V. Quaranta, "Cadherin-bound beta-catenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: evidence for an intersection between beta-catenin pools.," *PLoS One*, vol. 4, no. 2, p. e4580, Jan. 2009.
- [412] L. Espinosa, J. Inglés-Esteve, C. Aguilera, and A. Bigas, "Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 34, pp. 32227–35, Aug. 2003.
- [413] D. R. Foltz, M. C. Santiago, B. E. Berechid, and J. S. Nye, "Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability.," *Curr. Biol.*, vol. 12, no. 12, pp. 1006–11, Jun. 2002.
- [414] K. Furushima, A. Yamamoto, T. Nagano, M. Shibata, H. Miyachi, T. Abe, N. Ohshima, H. Kiyonari, and S. Aizawa, "Mouse homologues of Shisa antagonistic to Wnt and Fgf signalings.," *Dev. Biol.*, vol. 306, no. 2, pp. 480–92, Jun. 2007.
- [415] J. Pei and N. V. Grishin, "Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors.," *Cell. Signal.*, vol. 24, no. 3, pp. 758–69, Mar. 2012.
- [416] A. Yamamoto, T. Nagano, S. Takehara, M. Hibi, and S. Aizawa, "Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF.," *Cell*, vol. 120, no. 2, pp. 223–35, Jan. 2005.
- [417] M. Filipe, L. Gonçalves, M. Bento, A. C. Silva, and J. A. Belo, "Comparative expression of mouse and chicken Shisa homologues during early development.," *Dev. Dyn.*, vol. 235, no. 9, pp. 2567–73, Sep. 2006.
- [418] A.-C. Silva, M. Filipe, M. Vitorino, H. Steinbeisser, and J.-A. Belo, "Developmental expression of Shisa-2 in *Xenopus laevis*.," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 50, no. 6, pp. 575–9, Jan. 2006.
- [419] T. Nagano, S. Takehara, M. Takahashi, S. Aizawa, and A. Yamamoto, "Shisa2 promotes the maturation of somitic precursors and transition to the segmental fate in *Xenopus* embryos.," *Development*, vol. 133, no. 23, pp. 4643–54, Dec. 2006.
- [420] A. R. Karataeva, R. V. Klaassen, J. Ströder, M. Ruiperez-Alonso, J. J. J. Hjorth, P. van Nierop, S. Spijker, H. D. Mansvelter, and A. B. Smit, "C-Terminal Interactors of the AMPA Receptor Auxiliary Subunit Shisa9.," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, p. e87360, Feb. 2014.
- [421] M. S. Fahey, I. C. Paterson, A. Stone, A. J. Collier, Y. L. Heung, M. Davies, V. Patel, E. K. Parkinson, and S. S. Prime, "Dysregulation of autocrine TGF-beta isoform production and ligand responses in human tumour-derived and Ha-ras-transfected keratinocytes and fibroblasts.," *Br. J. Cancer*, vol. 74, no. 7, pp. 1074–80, Oct. 1996.
- [422] R. Yaraee and T. Ghazanfari, "Substance P potentiates TGFbeta-1 production in lung epithelial cell lines.," *Iran. J. Allergy. Asthma. Immunol.*, vol. 8, no. 1, pp. 19–24, Mar. 2009.
- [423] J. T. Nauseef and M. D. Henry, "Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle?," *Nat. Rev. Urol.*, vol. 8, no. 8, pp. 428–39, Aug. 2011.

- [424] C.-C. Chen, H.-Y. Chen, K.-Y. Su, Q.-S. Hong, B.-S. Yan, C.-H. Chen, S.-H. Pan, Y.-L. Chang, C.-J. Wang, P.-F. Hung, S. Yuan, G.-C. Chang, J. J. W. Chen, P.-C. Yang, Y.-C. Yang, and S.-L. Yu, "Shisa3 Is Associated with Prolonged Survival through Promoting β -Catenin Degradation in Lung Cancer.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 190, no. 4, pp. 433–44, Aug. 2014.
- [425] S. Lamouille and R. Derynck, "Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway.," *J. Cell Biol.*, vol. 178, no. 3, pp. 437–51, Jul. 2007.
- [426] D. Horbelt, G. Guo, P. N. Robinson, and P. Knaus, "Quantitative analysis of TGFBR2 mutations in Marfan-syndrome-related disorders suggests a correlation between phenotypic severity and Smad signaling activity.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 24, pp. 4340–50, Dec. 2010.
- [427] Y. Kam and V. Quaranta, "Cadherin-bound beta-catenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: evidence for an intersection between beta-catenin pools.," *PLoS One*, vol. 4, no. 2, p. e4580, Jan. 2009.
- [428] N. E. Bholra, J. M. Balko, T. C. Dugger, M. G. Kuba, V. Sánchez, M. Sanders, J. Stanford, R. S. Cook, and C. L. Arteaga, "TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer.," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 3, pp. 1348–58, Mar. 2013.
- [429] N. Al Nakouzi, O. Bawa, A. Le Pape, S. Lerondel, C. Gaudin, P. Opolon, P. Gonin, K. Fizazi, and A. Chauchereau, "The IGR-CaP1 xenograft model recapitulates mixed osteolytic/blastic bone lesions observed in metastatic prostate cancer.," *Neoplasia*, vol. 14, no. 5, pp. 376–87, May 2012.
- [430] D. J. Dykes, M. C. Bissery, S. D. Harrison, and W. R. Waud, "Response of human tumor xenografts in athymic nude mice to docetaxel (RP 56976, Taxotere).," *Invest. New Drugs*, vol. 13, no. 1, pp. 1–11, Jan. 1995.
- [431] L. Gan, S. Chen, Y. Wang, A. Watahiki, L. Bohrer, Z. Sun, Y. Wang, and H. Huang, "Inhibition of the androgen receptor as a novel mechanism of taxol chemotherapy in prostate cancer.," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 21, pp. 8386–94, Nov. 2009.
- [432] C. Festuccia, G. L. Gravina, A. M. D'Alessandro, P. Muzi, D. Millimaggi, V. Dolo, E. Ricevuto, C. Vicentini, and M. Bologna, "Azacitidine improves antitumor effects of docetaxel and cisplatin in aggressive prostate cancer models.," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 16, no. 2, pp. 401–13, Jun. 2009.
- [433] E. S. de Morree, C. M. A. de Ridder, H. Burger, E. A. C. Wiemer, R. H. J. Mathijssen, R. de Wit, and W. M. van Weerden, "Abstract 316: Cabazitaxel antitumor activity in docetaxel-resistant patient-derived prostate cancer xenograft models.," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 8 Supplement, pp. 316–316, Aug. 2013.
- [434] M. Moro, G. Bertolini, M. Tortoreto, U. Pastorino, G. Sozzi, and L. Roz, "Patient-derived xenografts of non small cell lung cancer: resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells.," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, p. 568567, Jan. 2012.
- [435] P. C. Huszthy, I. Daphu, S. P. Niclou, D. Stieber, J. M. Nigro, P. Ø. Sakariassen, H. Miletic, F. Thorsen, and R. Bjerkvig, "In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives.," *Neuro. Oncol.*, vol. 14, no. 8, pp. 979–93, Aug. 2012.
- [436] J. L. Holleran, C. J. Miller, N. L. Edgehouse, T. P. Pretlow, and L. A. Culp, "Differential experimental micrometastasis to lung, liver, and bone with lacZ-tagged CWR22R prostate carcinoma cells.," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 19, no. 1, pp. 17–24, Jan. 2002.
- [437] V. Evdokimova, C. Tognon, T. Ng, and P. H. B. Sorensen, "Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1.," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 18, pp. 2901–6, Sep. 2009.
- [438] D. Chen, Y. Zhang, J. Wang, J. Chen, C. Yang, K. Cai, X. Wang, F. Shi, and J. Dou, "MicroRNA-200c overexpression inhibits tumorigenicity and metastasis of CD117+CD44+ ovarian cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition.," *J. Ovarian Res.*, vol. 6, no. 1, p. 50, Jan. 2013.
- [439] Y.-W. Chen, H.-B. Pan, H.-H. Tseng, H.-C. Chu, Y.-T. Hung, Y.-C. Yen, and C.-P. Chou, "Differentiated epithelial- and mesenchymal-like phenotypes in subcutaneous mouse xenografts using diffusion weighted-magnetic resonance imaging.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 11, pp. 21943–59, Jan. 2013.
- [440] J.-T. Lin, J.-Y. Wang, M.-K. Chen, H.-C. Chen, T.-H. Chang, B.-W. Su, and P.-J. Chang, "Colon cancer mesenchymal stem cells modulate the tumorigenicity of colon cancer through interleukin 6.," *Exp. Cell Res.*, vol. 319, no. 14, pp. 2216–29, Aug. 2013.
- [441] J. Mezynski, C. Pezaro, D. Bianchini, A. Zivi, S. Sandhu, E. Thompson, J. Hunt, E. Sheridan, B. Baikady, A. Sarvadikar, G. Maier, A. H. M. Reid, A. Mulick Cassidy, D. Olmos, G. Attard, and J. de Bono, "Antitumour activity of docetaxel following treatment with the CYP17A1 inhibitor abiraterone: clinical evidence for cross-resistance?," *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. 11, pp. 2943–7, Nov. 2012.
- [442] R. Nadal, Z. Zhang, H. Rahman, M. T. Schweizer, S. R. Denmeade, C. J. Paller, M. A. Carducci, M. A. Eisenberger, and E. S. Antonarakis, "Clinical activity of enzalutamide in Docetaxel-naïve and Docetaxel-pretreated patients with metastatic castration-resistant prostate cancer.," *Prostate*, Aug. 2014.

- [443] R. J. van Soest, M. E. van Royen, E. S. de Morré, J. M. Moll, W. Teubel, E. A. C. Wiemer, R. H. J. Mathijssen, R. de Wit, and W. M. van Weerden, "Cross-resistance between taxanes and new hormonal agents abiraterone and enzalutamide may affect drug sequence choices in metastatic castration-resistant prostate cancer.," *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 18, pp. 3821–30, Dec. 2013.
- [444] P. Li, R. Yang, and W.-Q. Gao, "Contributions of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells to the development of castration resistance of prostate cancer.," *Mol. Cancer*, vol. 13, p. 55, Jan. 2014.
- [445] Y. Sun, B.-E. Wang, K. G. Leong, P. Yue, L. Li, S. Jhunjhunwala, D. Chen, K. Seo, Z. Modrusan, W.-Q. Gao, J. Settleman, and L. Johnson, "Androgen deprivation causes epithelial-mesenchymal transition in the prostate: implications for androgen-deprivation therapy.," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 2, pp. 527–36, Jan. 2012.
- [446] P. Kavsak, R. K. Rasmussen, C. G. Causing, S. Bonni, H. Zhu, G. H. Thomsen, and J. L. Wrana, "Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation.," *Mol. Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 1365–75, Dec. 2000.
- [447] G. M. Di Guglielmo, C. Le Roy, A. F. Goodfellow, and J. L. Wrana, "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. 410–21, May 2003.
- [448] L. Izzi and L. Attisano, "Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation.," *Oncogene*, vol. 23, no. 11, pp. 2071–8, Mar. 2004.
- [449] L. Sun, Y. Yao, B. Liu, Z. Lin, L. Lin, M. Yang, W. Zhang, W. Chen, C. Pan, Q. Liu, E. Song, and J. Li, "MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1.," *Oncogene*, vol. 31, no. 4, pp. 432–45, Jan. 2012.
- [450] M. T. Di Martino, A. Gullà, M. E. Gallo Cantafio, E. Altomare, N. Amodio, E. Leone, E. Morelli, S. G. Lio, D. Caracciolo, M. Rossi, N. M. Frandsen, P. Tagliaferri, and P. Tassone, "In vitro and in vivo activity of a novel locked nucleic acid (LNA)-inhibitor-miR-221 against multiple myeloma cells.," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, p. e89659, Jan. 2014.
- [451] H. Yang, W. Zheng, W. Zhao, C. Guan, and J. An, "[Roles of miR-590-5p and miR-590-3p in the development of hepatocellular carcinoma].," *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, vol. 33, no. 6, pp. 804–11, Jun. 2013.

Annexes

Identification of SHISA3, a novel regulator of Epithelial-Mesenchymal transition through TGF β signaling in Docetaxel-resistant prostate cancer cells

Nicolas J-P. MARTIN^{1,2,3,4}, Sophie COTTERET^{1,2,3,4}, Catherine GAUDIN^{1,2,3,4}, Marine GARRIDO^{1,2,3,4}, Safae AARAB-TERRISSE⁴, Nader AL NAKOUZI^{1,2,3,4*}, Lucas GENTILINI⁵, Daniel COMPAGNO⁵, Vasily OGRYZKO^{3,4,6}, Guillaume MEURICE⁷, Karim FIZAZI^{1,2,3,4}, Anne CHAUCHEREAU^{1,2,3,4}

¹Prostate Cancer Group, INSERM U981, Villejuif, F-94805, France

²LabEx LERMIT

³Univ Paris-Sud, UMR981, Villejuif, France

⁴GustaveRoussy, Villejuif, France

⁵ Laboratorio de Glicómica Funcional, IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Univ. De Buenos Aires, Argentina

⁶ CNRS UMR 8126, Villejuif, France.

⁷Bioinformaticsplatform, Gustave Roussy, Villejuif, France

*Present address: Vancouver Prostate Centre, Canada

Running title: Role of SHISA3 in Docetaxel resistance in prostate cancer

Word count (excluding references): 7484

Main Text Figures: 6

Supplementary Material: 3 figures and 3 Tables

Corresponding author: Anne Chauchereau, PhD

Prostate Cancer Group, INSERM U981, GustaveRoussy, Molecular Medicine Building, 114 rue EdouardVaillant, Villejuif, F-94805, France. Tel:+33142116607, Fax:+33142116094, E-mail:anne.chauchereau@gustaveroussy.fr

ABSTRACT

SHISA3 is a transmembrane protein that was originally identified as an inhibitor of Wnt and FGF signaling during development in *Xenopus* and was recently identified as a tumor suppressor in lung cancer by promoting β -catenin degradation. Consistently, we found that *SHISA3* was highly expressed in genitourinary and digestive normal tissues and was significantly lost in the corresponding tumors. By comparing genes and miRs expression profiles established in two Docetaxel-resistant models, we showed that *SHISA3* was lost during the epithelial-to-mesenchymal transition which coincides with the acquisition of resistance to Docetaxel in prostate cancer cells. Knockdown of *SHISA3* in the parental IGR-CaP1 and PC3 cells triggered loss of the tight junction protein Occludin, engaged the Cadherin switch and increased the migratory properties of cells *in vitro*. Proteomic analyses of SHISA3 partners in both cell lines led us to the identification of the Transforming Growth Factor Beta Receptor II (TGF β R2) as SHISA3 interacting protein. The complexes were localized both as discrete speckles at the plasma membrane and in cytoplasmic granules, suggesting that SHISA3 could be implicated in the down-regulation of TGF β signaling and in the maintenance of the epithelial phenotype. In resistant cells, loss of SHISA3, which allows TGF β signaling, led to mesenchymal phenotype. Furthermore, our results suggested that the TGF β R1 kinase inhibitor LY2157299 could be used in combination with Docetaxel to overcome Docetaxel resistance. Together, these experiments describe a new mechanism of acquisition of chemoresistance in prostate cancer and suggest a therapeutic strategy to circumvent this resistance.

KEY WORDS

Prostate cancer, resistance, Docetaxel, SHISA3, Epithelial-to mesenchymal transition, TGF β R2, TGF β signaling

INTRODUCTION

Prostate Cancer (PCa) has become the most common nonskin cancer in men in the Western world and the sixth leading cause of cancer-related death among men worldwide[1]. Docetaxel is the standard of care as first-line chemotherapy for progressing patients with metastatic castration-resistant PCa(mCRPC) and improves patient survival by months. Unfortunately, a great number of patients respond poorly to Docetaxel owing to inherent or acquired drug resistance. Today, there is no standard second line treatment for CRPC resistant to chemotherapy[2]. Since 2010, treatment options have changed substantially for patients with CRPC, with six new molecules being approved, including the new taxane Cabazitaxel and two new androgen castration therapies, Abiraterone and Enzalutamide[3]. But except for Cabazitaxel, which was developed to overcome the MDR efflux pump, which limits the efficacy of Docetaxel, these new molecules are not intended to directly overcome Docetaxel resistance. Indeed, cross-resistance between Docetaxel and the new hormone therapies was reported based on both *in vitro* and clinical data[4–8]. These observations suggest that it would be preferable to use biology-driven therapeutics directly implicated in the Docetaxel-resistance mechanism.

The knowledge of the resistance mechanism is thus crucial and could lead to both the identification of biomarkers that can be used to determine the prognosis of CRPC patients receiving Docetaxel-based therapy, and to the discovery of new therapeutic agents to improve chemosensitivity to Docetaxel in PCa patients.

The complexity and the multimodal aspect of the mechanism of resistance to taxane in PCa have been illustrated by numerous studies [9–11]. During the past few years, we and several other investigators have developed *in vitro* models that mimic the resistance to Docetaxel observed in clinics. From these models, studies using an *non a-priori* approach led to the discovery of new signaling pathways and new genes involved in the chemoresistance in PCa. As demonstrated *in vitro* and *in vivo* by Domingo-Domenechet *al.*, a population of Docetaxel-resistant cells harboring high tumor-initiating capacity under the control of the

developmental signaling pathways Notch and Hedgehog was identified, suggesting that these pathways could represent a therapeutic strategy for abrogating Docetaxel resistance in CRPC[12]. With a similar *in vitro* approach, we reported the loss of the cell cycle regulator LZTS1 conferring Docetaxel resistance by down-regulating CDC25C phosphatase at the mitotic checkpoint. Indirect targeting of CDC25C with inhibitors of cell cycle kinases CHK1 and PLK1 provides a mean to overcome chemoresistance[13]. More recently, Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) has been found to play a critical role in cancer drug resistance, but the nature of this intrinsic link remains unclear[14].

Cancer cells have the property to change their phenotype by engaging themselves in EMT which allows the acquisition of migratory and invasive properties necessary for metastasis dissemination. During this process, tumor cells lose their epithelial cell markers, namely E-Cadherin and β -catenin, and gain mesenchymal cell markers such as N-cadherin and Vimentin. These changes are responsible for the characteristic loss of cellular adhesion and gain of migratory capacities, leading to metastasis spreading. Depending on the cell context, the plasticity of the epithelial phenotype enables cells to transition through multiple rounds of EMT and Mesenchymal-to-Epithelial Transition (MET). EMT and MET have been closely linked to stemness in development and cancer. In the recent years, accumulating evidences indicate that EMT and cancer stem cells (CSC) play important roles during the development of drug resistance of prostate cancer[15]. Several studies have reported that the cells which underwent EMT are enriched in CSC markers which delineate a cell population supposed to be responsible for the chemoresistance[16,17]. During this process, miRNAs play a critical role in linking EMT phenotypes and CSC signatures, namely miR-200 family, miR-203 and miR-205[16,18–22]. However, the role of CSCs, their relationship with EMT and the regulation of signaling pathways in CaPchemoresistance still need to be investigated.

In a previous work, we identified a signature of genes differentially expressed between parental and Docetaxel resistant IGR-CaP1 cell line [13]. In the present work, we compiled

both differential gene expression and miR expression profiles in two Docetaxel-resistant IGR-CaP1 and PC3 models to go further inside the mechanisms of Docetaxel resistance. We showed that the resistance is accompanied by the expression of EMT markers, such as a high increase of ZEB1 expression. In addition, we discovered the *SHISA3* gene in prostate cancer cells, and its implication in the EMT process. Functional validation of its role with siRNA showed that SHISA3 regulates the TGF β -mediated EMT process by interacting with the Transforming Growth Factor Beta Receptor II (TGF β R2). Finally, our results led to the demonstration that combined treatment of Docetaxel with therapies targeting TGF β signaling can circumvent Docetaxel resistance in prostate cancer.

RESULTS

Identification of *SHISA3* as the most under-expressed gene in Docetaxel-resistant cells

To investigate the molecular mechanisms implicated in resistance to taxane, we compared gene expression profiles of Docetaxel-resistant versus parental cells. A previous analysis obtained in the IGR-CaP1 prostate cancer cells showed that *SHISA3* was the most under-expressed gene in the Docetaxel-resistant IGR-CaP1 (IGR-CaP1-R) cells (Fold-change = -187, p-value<0.05) [13]. We generated a second model of Docetaxel-resistant cells by exposing PC3 cells to increasing Docetaxel concentration in long term cultures (Supplementary Figure S1). As we did with the IGR-CaP1-R model, we obtained a signature of 450 genes potentially implicated in the resistance of the PC3 model (Supplementary Table S1) and observed that the *SHISA3* gene was also down-regulated in Docetaxel-resistant PC3 (PC3-R) cells (Fold-Change=-3.62, p-value<0.05). Extinction of the *SHISA3* gene was confirmed by RT-qPCR in both resistant cell lines (Figure 1A). The *SHISA3* gene encodes a protein of 26 kDa which was detected in western blot in parental IGR-CaP1 cells and to a lesser extent in PC3 cells, but was undetectable in Docetaxel-resistant cell lines (Figure 1B).

To date the *SHISA3* gene has been poorly described in humans; the expression of *SHISA3* in various human cell lines was determined by RT-PCR. Various expression levels were observed in prostate cancer cell lines, the IGR-CaP1 and PC3 cell lines showing the highest *SHISA3* expression level. We also detected *SHISA3* in HEK kidney cells and in SKMEL-31 melanoma cells (Figure 1D). In addition, we determined *SHISA3* expression by quantitative RT-PCR in a panel of human normal tissues. Figure 1E shows that *SHISA3* was preferentially expressed in genitourinary tissues and in the digestive system. As we identified *SHISA3* in prostate cancer cell lines, we compared *SHISA3* expression in normal and in tumors tissues and we showed that *SHISA3* expression was generally lost in prostate cancer. This differential expression was also significantly observed in renal, colon and lung tumors (Figure 1F).

In both *Xenopus* and mouse, the SHISA3 homologues were implicated in the head formation and somites development, preventing the maturation of the Frizzled and fibroblast growth factor (FGF) receptors by trapping them in the endoplasmic reticulum (ER)[23–25]. We examined the subcellular localization of SHISA3 using confocal microscopy. Based on these previous data, we expected to observe SHISA3 on the ER at the cellular level. Commercial antibodies did not allow detection of the endogenous SHISA3 protein in IGR-CaP1 cells. Surprisingly, we observed that over-expressed Flag-tagged SHISA3 in HEK cells was localized both in a large cytoplasmic structure and in discontinuous speckles at the cytoplasmic membrane (Figure 1F). The same cytoplasmic localization was also observed in PC3 transfected cells (data not shown), without any overlapping with the ER labeling. All together, we showed that SHISA3, is generally down-regulated in tumors, even more so in the chemoresistant cell lines, suggesting a role of this protein in the mechanism of Docetaxel-resistance in prostate cancer.

Docetaxel-resistant cells is correlated with EMT phenotype

Implication of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is established in cancer progression[26]. More recently, the concept has emerged that EMT is implicated in drug resistance in several solid cancers, including acquisition of resistance to chemotherapeutic agents[27–29]. Recently published results reported the implication of EMT in Docetaxel resistance, in a process which implies both cancer stem cells (CSC) properties and specific miRNA expression[16]. A small set of miRNAs were shown to play a pivotal role in the regulation of EMT in prostate cancers[30–32]. Considering the importance of miRNAs in the mechanisms of resistance, we analyzed the miRNA gene expression profiles in our resistant models.

To go further in determining particular pathways implicated in Docetaxel resistance in PCa, we first analyzed a miRNA signature which was differentially expressed between Docetaxel-resistant and parental cells in the two cell lines IGR-CaP1 and PC3. The miRNA expression

levels were quantified by RT-qPCR by using TLDA microfluidic cards (Supplementary Table S2). We thus identified a number of miRNAs that have been implicated in EMT (Figure 2A). Among the repressed miRNAs, many have been reported previously as critical regulators of EMT, such as the miR-200 family (miR-200b, miR-200c, miR-141) and miR-203 [16,33]. When we compared transcriptional gene signatures of Docetaxel-resistant IGR-CaP1 and PC3 cells with an EMT gene signature [26], we found that genes of the EMT process were significantly enriched in both the IGR-CaP1-R signature (9.25%; p-value = 4.10×10^{-15}) and in the PC3-R signature (11%; p-value = 4.96×10^{-41}) (Fisher test) (Figure 2B). We noted that the EMT expression signatures slightly overlapped and were mostly distinct between the two cell lines, suggesting differences in the specific genes implicated in the same cellular process. Thus, our results suggest that EMT is a major process in Docetaxel resistance in our models. Indeed, we observed that Docetaxel-resistant cells have different morphological characteristics compared to the parental cell lines (Figure 2C). PC3-R cells were individualized and showed a fibroblast-like phenotype, whereas the resistant IGR-CaP1-R cells showed an increase in cell size suggesting changes in the intercellular junctions, typical of mesenchymal cells [34]. Therefore we decided to study the expression of known epithelial and mesenchymal markers by western-blotting and immunofluorescence. Western blot analysis showed the loss of epithelial markers such as E-cadherin (CDH1) and β -catenin (CTNNB1) in both Docetaxel-resistant cells concomitant with a gain of expression of mesenchymal markers such as N-cadherin (CDH2) and Vimentin (VIM) (Figure 2D). Surprisingly, VIM was expressed in the parental IGR-CaP1 cell line. Immunofluorescence staining confirmed the loss of plasma membrane E-Cadherin in resistant cells (Figure 2D). The change of cellular morphology of Docetaxel-resistant cells suggests a disorganization of cellular junctions. Intercellular junctions are composed of tight and adherent junctions including desmosomes, characterized by the expression of various proteins such as claudins, occludins (OCLN), Zona Occludens (ZO) proteins, plakoglobin (JUP) or desmoglein. To study the junctions, we looked at the expression of the tight-junction protein OCLN and JUP. Western blot and immunofluorescence analysis in Figure 2E and 2F showed the

decrease of OCLN and JUP in resistant cells of both cell lines respectively. The reorganization of the cytoskeletal architecture depends on the expression of master regulators including Snail (SNAI1), Slug (SNAI1), TWIST and Zinc-finger E-box binding (ZEB) transcription factors, which have been characterized in EMT. Figure 2G shows that ZEB1 was overexpressed in both Docetaxel-resistant cells, whereas SNAI1 was increased only in IGR-CaP1-R by qRT-PCR. The results were confirmed by Western-blotting, although SNAI1 was barely detectable. Immunofluorescence shows the nuclear localization of ZEB1 in resistant cells. Overall, our results showed that Docetaxel-resistant cells have undergone a profound remodeling and have become mesenchymal cells.

SHISA3 silencing promotes EMT in parental cells

To question the functional relationship between the repressed *SHISA3* gene and EMT in Docetaxel-resistant cells, we mimicked the resistant phenotype in both parental cell lines by using siRNA against *SHISA3* (siSHISA3). Loss of tight junctions is the first event in the process of EMT. Therefore to determine if SHISA3 knockdown had a similar effect as loss of SHISA3 in resistant cells on the expression of tight junction proteins, we looked at the expression of OCLN by western-blot analysis. Our results show that the silencing of SHISA3 induced the loss of OCLN in both cell lines suggesting a link between loss of tight junctions and down-regulation of SHISA3 in resistant cells (Figure 3A). We then investigated if this loss induced morphological changes, as observed in resistant cells. Strikingly, using phase contrast microscopy, we showed that SHISA3 knockdown induced morphological changes in both IGR-CaP1 and PC3 cell lines; the major effect was observed with siSHISA3-3 (Figure 3B). To go further, we analyzed the expression of epithelial and mesenchyme markers in SHISA3-KD cells. As observed in the Docetaxel-resistant cells, siSHISA3 decreases the expression of the epithelial marker CDH1 and increases the expression of the mesenchymal proteins CDH2 and SNAI1 (Figure 3C) suggesting an induction of EMT when *SHISA3* is down-regulated.

As EMT is often accompanied by an increased cell migration, we measured cell migration by performing a wound healing assay 5 days after siSHISA3 transfections (Figure 3D). Consistently, silencing of SHISA3 significantly increased cell migration after 24h in both cell types. Together, our results show a functional relationship between SHISA3 and EMT suggesting the importance of this gene in the early steps of EMT.

SHISA3 interacts with TGF β R2

SHISA3 homologues were originally described as inhibitors of Wnt and FGF signaling pathways. Based on sequence similarity searches upon the SHISA gene family, Pei *et al.* proposed that SHISA3 may correspond to transmembrane adapters that could interact with ubiquitin ligases to regulate membrane proteins such as cell surface receptors [35].

To identify cytosolic proteins potentially interacting with SHISA3, we performed a comprehensive proteomic profiling of co-immunoprecipitated proteins. First, we constructed a SHISA3 expression vector containing an internal Flag tag to allow the cytoplasmic moiety of the protein free to interact with cytoplasmic proteins (Figure 4A). Flag-tagged *SHISA3* was transiently expressed in IGR-CaP1 and PC3 cells, and Flag co-precipitated proteins were analyzed by nano-MS/MS (Orbitrap Q-Exactive) after tryptic digestion. Using this approach, protein extraction with milder detergent Brij 97 is supposed to retain both direct and indirect interactions. Twenty-eight proteins from a total of 3741 were specifically identified in both cell lines expressing SHISA3 (Supplementary Table S3). By clustering these proteins using cancer networks analysis Ingenuity[©] software, we identified one significant network which highlighted the EGFR and the TGF β R2 signaling pathways (Figure 4B). These two membrane receptors were present at different expression levels in both models (Supplementary Figure S2), suggesting that SHISA3 may be implicated in EGFR and TGF β R2 signaling.

To test this hypothesis, immunoprecipitations were performed in SHISA3-Flag overexpressing cells either with antibodies against TGF β R2, EGFR, and Flag-tag or with non-specific immunoglobulines. Co-immunoprecipitation from IGR-CaP1 cells showed that

SHISA3 interacted specifically with TGF β R2 whether the immunoprecipitating antibody was anti-TGF β R2 or anti-SHISA3 (anti-Flag) (Figure 4C). EGFR did not co-precipitate with SHISA3. Identical results were observed in PC3 and in HEK cells (Figure 4C). Endogenous SHISA3 was also co-immunoprecipitated with TGF β R2 in IGR-CaP1 and in PC3 cells (Supplementary Figure S3). To confirm this interaction, we examined the subcellular localization of both SHISA3 and TGF β R2 by confocal microscopy after ectopic expression of *HA-TGF β R2* and *SHISA3-Flag* in HEK cells. SHISA3 was preferentially observed in both speckles near plasma membrane and in cytoplasmic granules where it co-localized with TGF β R2 (Figure 4D). As we observed cytoplasmic SHISA3 in Golgi, we hypothesized that the complex SHISA3/TGF β R2 is localized in Golgi. Indeed TGF β R2 has been reported to localize in Golgi apparatus[36].

To determine if SHISA3 was involved in the regulation of TGF β signaling through its interaction with TGF β R2, we treated parental IGR-CaP1 and PC3 cells with TGF β for 5 days and then, analyzed the effect on the expression of SHISA3 and EMT markers (Figure 4E). We observed a decrease in SHISA3 expression in the treated cells compared to control cells. We also observed a decrease of CDH1 expression and an increase in CDH2 and VIM expression in treated cells. Therefore we concluded that TGF β mimicked the effect triggered by loss of SHISA3 in resistant cells and SHISA3 knockdown in parental cells.

Together these results suggest that in epithelial cells, SHISA3 interacts with TGF β R2 receptor in order to inhibit TGF β signaling. In resistant cells, absence of SHISA3 alleviates this inhibition thus rendering TGF β R2 available to interact with TGF β in order to maintain the mesenchymal state.

SHISA3 regulates TGF β R2 through ubiquitination

SHISA3 was proposed to inhibit transmembrane receptors by interacting with ubiquitin ligase[35]. Herein, we should observe poly-ubiquitinated forms of TGF β R2 in the presence of SHISA3. To test this hypothesis, immunoprecipitation was performed with TGF β R2

antibody in parental and resistant IGR-CaP1 cells. Immunoprecipitated proteins were subjected to an immunoblot analysis and revealed with anti-TGF β R2 and anti-ubiquitin antibodies. Figure 5A showed that endogenous TGF β R2 was expressed as a high molecular weight receptor in these cells, corresponding to highly glycosylated forms of the receptor [36,37]. This non-ubiquitinated form was expressed to the same extent in parental and resistant cells. Moreover, ubiquitinated forms of TGF β R2 were much more co-immunoprecipitated in the SHISA3-expressing parental cells. This result suggested that the interaction between SHISA3 and TGF β R2 triggers the ubiquitination of TGF β R2 which inhibits its signaling. To confirm this hypothesis, we evaluated the impact of ectopically expressed SHISA3 on the ubiquitination of TGF β R2 in IGR-CaP1 cells in the presence or not of co-expressed HA tagged-ubiquitin vectors (Figure 5B). The results show that the expression of SHISA3 highly increased the ubiquitinated forms of endogenous TGF β R2 (compare lane 2 and lane 4). These data showed that SHISA3 increases the ubiquitination of TGF β R2 suggesting that it participates in the regulation of TGF β R2 expression.

Inhibition of TGF β R2 signaling increases cell death of Docetaxel-resistant cells

We showed that SHISA3 interacts with the TGF β R2 receptor. This interaction may thus prevent its interaction with TGF β R1 and impedes TGF β signaling, maintaining cells in an epithelial state. In resistant cells where SHISA3 is absent, TGF β R2 is able to trigger and to maintain the mesenchymal state. We thus hypothesized that blocking TGF β R2 in resistant mesenchymal cells could induce the death of resistant cells restoring their sensibility to Docetaxel. In cancer cells, TGF β binding to the membranous TGF β R2 receptor homodimer allows the dimerization of TGF β R2 with TGF β R1 receptor homodimers, then leading to activation of TGF β R1 kinase and subsequent activation of the signal transduction which finally promotes tumour progression [38].

Inhibition of TGF β R1 is a strategy to inhibit TGF β signaling. LY2157299 is a small molecule inhibitor of TGF β R1 which is the most advanced TGF β signaling inhibitor under clinical development. Furthermore, in a triple-negative breast cancer xenograft model, LY2157299

had synergistic effect with paclitaxel chemotherapy preventing the development of cancer stem cells [39]. We thus decide to examine the impact of targeting the TGF β signaling pathway with the specific pharmacological LY2157299 inhibitor on the survival of parental and Docetaxel-resistant prostate cancer cells. Figure 5A shows that treatment of cells with 25 μ M of LY2157299 alone did not affect the survival of parental and resistant cells. However, when combined with 100nM of Docetaxel, the survival of the resistant cells was significantly decreased (more than 50% of colonies). We wanted to determine if cells died from apoptosis and if co-treatment of Docetaxel and LY2157299 could have a synergistic effect. Thus, parental and resistant IGR-CaP1 cells were treated with Docetaxel or LY2157299 or a combination of both as indicated in figure legend. We observed that Docetaxel or LY2157299 alone induced apoptosis in parental cells (21% and 17% respectively). Combination of Docetaxel and LY2157299 had no additive effect. In resistant cells, Docetaxel or LY2157299 alone had no effect whereas the combination induced an increase of apoptosis (21% apoptotic cells compared to 15% in control or Docetaxel-treated cells). Therefore, we conclude that cells died only partially from apoptosis, other mechanisms are likely involved. Our results show that the targeting of the TGF β signaling pathway with LY2157299 in combination with Docetaxel induces cell death of the Docetaxel-resistant cells.

DISCUSSION

The mechanism of resistance to Docetaxel is complex and multifactorial, involving both the tumor microenvironment and profound changes of the intrinsic properties of tumor cells. Intensive studies on taxane resistance have accumulated during the past ten years suggesting co-existence of multiple mechanisms and intrinsic specificities of prostate cancer[9,10]. However, therapeutic strategies used so far to overcome Docetaxel resistance in prostate cancer have proved inefficient as evidenced by reported negative phase III clinical trials combining new agents with Docetaxel[3,40]. So, efforts need to be pursued to circumvent taxane resistance in prostate cancer.

During the last four years, the development of cellular models of chemoresistant prostate cancer and the use of whole-genome arrays have enabled the identification by investigators of new molecular pathways implicated in the mechanism of survival of chemoresistantPCa cells. Previous work from our group correlated the loss of the cell cycle regulator LZTS1 with docetaxel resistance [13]. Other study support a role for the Notch and Hedgehog pathways in the development of resistance to Docetaxel [12]. Other studies have also shown the implication of the Epithelial-to-Mesenchymal transition (EMT) in this process[16,17].

Emerging evidence suggests that reactivation of EMT processes may facilitate the development of prostate cancer and metastases [41]. During this process, epithelial cells lose their junctions, reorganize their cytoskeleton and undergo a signaling program to modify their gene expression. These changes are responsible for the characteristic loss of cellular adhesion and gain of migratory capacities, leading to metastasis spreading. These data are supported by the observations that E-cadherin expression is inversely related to patient survival[42]. The EMT phenotype was also associated with increased stem cell characteristics and activated TGF β signaling [43]. In preclinical models of prostate cancer, EMT endows epithelial cells to undergo mesenchymal properties such as invasion, stem-cell like phenotype and prevention of apoptosis, thus facilitating cancer metastasis. The

implication of androgen-deprivation regarding EMT is still not totally elucidated. Conflicting data have been shown, some reports showing that androgens induce activation of EMT and its effectors [44,45], while others demonstrate that EMT is activated in response to androgen deprivation [46–48]. We and others observed EMT in androgen receptor negative cell lines and show evidence that EMT is one of the mechanisms by which tumour cells acquire Docetaxel resistance, thus corroborating previous studies in other models [16,17]. In addition, our data show that loss of *SHISA3* is an early event linked to the EMT process.

Using two prostate cancer cellular models, we have identified the *SHISA3* as one of the most down-regulated gene between the parental and the resistant cells. There is very little data available on the function of this gene in humans. Only results published this year showed that *SHISA3* acts as a tumor suppressor in lung cancer by accelerating the degradation of β -catenin [49]. Herein, we observed that *SHISA3* is expressed predominantly in tissues of the digestive and the urogenital systems, and is down-regulated in tumors, including prostate and kidney cancers. These observations suggest that *SHISA3* expression is regulated during tumor progression, consistently with a role as a tumor suppressor gene. *SHISA3* is highly expressed in prostate cancer cell lines, especially in IGR-CaP1 and PC3 cell lines and its expression is markedly decreased in cells that became resistant to Docetaxel. Nevertheless, the mechanism leading to the loss of *SHISA3* expression in resistant cells is still unknown. We brought evidence of the impact of *SHISA3* loss in the induction of EMT and the potentiation of key characteristic features, such as E-cadherin loss, the Snail transcription factor nuclear accumulation and enhanced expression of mesenchymal features such as N-cadherin. Inversely, treatment of cells with TGF β for 5 days turning off *SHISA3* expression could implicate a transcriptional regulation of *SHISA3* gene expression. Thus our findings suggest that impaired *SHISA3* function participates in the Docetaxel resistance mechanism via TGF β -induced EMT.

Phylogenetic comparison of *SHISA3* gene sequences suggested that this family may correspond to transmembrane adapters capable of regulating the activity of membrane receptors. We and the group of S-L Yu [49] experimentally confirmed that human SHISA3 is actually an adapter protein that regulates the activity of cell surface receptors. However, whereas in lung cancer SHISA3 regulates expression of Frizzled receptors, as previously observed during embryonic development in *Xenopus* and mice, we demonstrated that SHISA3 regulates the TGF β signaling pathway by interacting with the TGF β R2 receptor in two PCa cell lines. In cancer cells, TGF β activates a heterodimeric complex formed by TGF β R2 and TGF β R1 and initiates an intracellular signaling cascade through phosphorylation of the SMAD proteins. Although the downstream signal transduction of the TGF β signaling pathway has been well characterized, the signals directing receptors to another method of endocytosis have been less studied. It was shown that receptors that are endocytosed via clathrin-mediated endocytosis enter the early endosome, access Smad2/3 and propagate TGF β signal transduction. However, receptors that are localized in membrane rafts are targeted for degradation by ubiquitination[50]. It is known that TGF β signaling is tightly regulated through protein ubiquitination[51,52]. Consistently, our results showed that the interaction between SHISA3 and TGF β R2 provokes ubiquitinylation of the TGF β R2 receptor. In addition, we observed a colocalization of SHISA3 and TGF β R2 in speckles both at the cell membrane and in the cytoplasm, evoking a membrane-raft-dependent endocytosis of the TGF β R2 receptor. Our results thus suggest that SHISA3/TGF β R2 complexes may participate in the internalization of TGF β R2 by lipids-rafts mediated endocytosis. The implication of SHISA3 in TGF β R2 endocytosis is of great interest and need further investigations.

More importantly, the results presented herein showed that targeting the TFG β signaling with the TGF β R1 kinase inhibitor LY2157299 provoked the cell death of Docetaxel-resistant PCa cells when combined with Docetaxel. Consistent with our results, the LY2157299 was shown to sensitize triple-negative breast cancer xenografts to paclitaxel [39]. This small molecule inhibitor seemed to be well tolerated in patient and its efficacy is currently ongoing in phase II

trials in patients with pancreatic cancer, hepatocellular carcinoma, glioblastoma and multiple myeloma. Interestingly, preliminary results from a phase II clinical trial, in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with LY2157299, have shown improved clinical outcome and also changes consistent with a reduction of EMT [53]. Overall, our results suggest that taxane-based chemotherapy in combination with inhibitors of the TGF β receptors could be efficient in patients who are refractory to taxane regimen.

This therapeutic strategy point out to the need for a better selection of patients eligible for the combination of taxanes and TGF β signaling inhibitors with predictive biological biomarkers. As EMT is associated with the acquisition of Docetaxel-resistance, EMT biomarkers could be appropriate as a predictive value for response to taxane therapy. Aberrant E-cadherin expression was shown to be a predictor of biochemical recurrence and failure of the salvage radiotherapy in prostatectomies specimens [54]. Desmoglein 2, a component of desmosome, which are disrupted during EMT, was recently shown to be reduced in primary prostate tumors with an aggressive biological behavior [55]. To our knowledge, none of these markers have been assessed on tumors from taxane-refractory patient. Our results suggest that SHISA3 loss of expression may allow identifying mesenchymal Docetaxel-resistant cells in tumors. So, SHISA3 could have an added value to predict Docetaxel response in CRPC patient and to guide the choice of a therapy combining taxane and TGF signaling inhibitors.

In conclusion, we described the role of *SHISA3* as a new gene in the mechanism of Docetaxel resistance in prostate cancer. SHISA3 is implicated in the early steps of EMT and modifies the migratory properties of tumors cells. It inhibits TGF β signaling through its interaction with the TGF β R2 receptor. Our findings suggest that SHISA3 may constitute a predictive biomarker for therapeutic response and supports the use of a combination of taxane and TGF β signaling inhibitors in order to overcome chemoresistance in prostate cancer.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and selection of Docetaxel-resistant clones

The parental and Docetaxel-resistant IGR-CaP1 [56] and PC3 human prostate cancer cell lines were maintained in RPMI1640 medium supplemented with 10% FBS. The parental PC3 cell line and human embryonic kidney HEK-293 cells was purchased from ATCC. Docetaxel-resistant PC3 clones were selected by exposing cells to Docetaxel in a dose-escalation manner as described for IGR-CaP1[13]. Both resistant cell lines were treated monthly with the maximal dose of Docetaxel to maintain the resistant phenotype (100nM or 12nM for IGR-CaP1-R and PC3-R cells, respectively). HEK cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS.

Plasmids and reagents

The nucleotide sequence corresponding to the human *SHISA3*cDNA with an in-frame insertion of the Flag tag sequence at position 259 was purchased from Genewiz. The *SHISA3-Flag* coding sequence was inserted by standard cloning into the pLv-2028 provided by D. Compagno (IQUIBICEN-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Argentina). The pLv-*SHISA3-Flag* vector expresses GFP as reporter under the control of eukaryotic EF-1a promoter. The expression vector for HA-TGF β R2[57] was provided by N. Théret (Inserm U620, Rennes, France). TGF β 1 was purchased from R&D Systems and was resuspended in 4mM HCl supplemented with 1mg/ml bovine serum albumin. LY2157299 inhibitor was obtained from AbMole Biosciences and was resuspended in DMSO.

Quantitative real-time RT-PCR

The TissueScan Human Normal and TissueScan Cancer cDNA Arrays (Origene) were used to provide template cDNA for 48 major human tissues and for 19 specific cancers. TaqMan gene expression assays were used for human *SHISA3* gene (Hs01380806_m1), human SNAI1/Snail (Hs00195591_m1) and human ZEB1 (Hs00232783_m1) with GAPDH as

endogenous control. Total RNA was extracted using Trizol from parental and Docetaxel-resistant cells as previously described [13]. Real-time quantification was performed using TaqMan gene expression master mix as described [58] on Vii7 System (Applied Biosystems). The $\Delta\Delta\text{CT}$ method was used to quantify transcripts.

Microarray Assay

Gene expression was profiled using a 4x44K Human Whole Genome (AMADID 14850) expression array (Agilent Technologies, Santa Clara, Cal.) as previously described [13]. Microarray images were analysed by using Feature Extraction software version (10.7.3.1) from Agilent technologies. Defaults settings were used.

Microarray data processing and analysis

Raw data files from Feature Extraction were imported into R with LIMMA, an R package from the Bioconductor project, and processed as follow: gMedianSignal and rMedianSignal data were imported, controls probes were systematically removed, and flagged probes (gIsSaturated, gIsFeatpopnOL, gIsFeatNonUnifOL, rIsSaturated, rIsFeatpopnOL, rIsFeatNonUnifOL) were set to NA. Intra-array normalization was performed by loess normalization, followed by a quantile normalization of both Cy3 and Cy5 channel. Then inter-array normalization was performed by quantile normalization on M values. To get a single value for each transcript, taking the mean of each replicated probes summarized data. Missing values were inferred using KNN algorithm from the package 'impute' from R bioconductor.

Normalized data were then analyzed. To assess differentially expressed genes between two groups, we start by fitting a linear model to the data. Then we used an empirical Bayes method to moderate the standard errors of the estimated log-fold changes. The top-ranked genes were selected with the following criteria: an absolute fold-change > 2 and an adjusted p-value (FDR) < 0.05.

MicroRNA extraction and expression profiling

MicroRNAs were reverse transcribed to cDNA using the TaqmanMegaplex Primer Pools A kit (Applied Biosystems). RT-qPCR was performed using human MicroRNA Panel ATaqManlow density array (TLDA) (Applied Biosystems) as described by the supplier and quantified on 7900HT system (Applied Biosystems). Independent biological replicates were used for each cell lines. The relative quantification value of the target, normalized to a control, was calculated by the comparative Ct methods. MicroRNAs expressed at a Ct value over 32 in both parental and resistant cell lines were eliminated from the analysis. RNU6B and endogenous hsa-miR-24 were used as internal controls. Fold changes represent the mean of the fold change values obtained with the two controls. Using this procedure, MiR signatures were extracted for each cell line with a fold change cut-off set at 1.5 (Table SII).

EMT induction

$2.5 \cdot 10^4$ IGR-CaP1 cells and $5 \cdot 10^4$ PC3 cells were plated in 6-well plates for 24 hours then transiently transfected with 10nM synthetic siRNA targeting SHISA3 gene (Stealth RNAi™, siSHISA3-94 : HSS152694, siSHISA3-95 : HSS152695, and siSHISA3-96 : HSS152696) using lipofectamineRNAiMax (Invitrogen) or treated with 10ng/ml TGFβ1. After 36 hours, a second treatment was performed in order to maintain EMT induction over 5 days. Negative controls were obtained by treating cells with siRNA negative controls (siNT) (Invitrogen) or TGFβ1 vehicle. Whole cell extracts were prepared in RIPA buffer complemented with proteases inhibitors (Roche) and phosphatase inhibitors (Sigma).

Western Blot analysis

Fifty µg of lysates were used for Western-Blot probed with specific antibodies: SHISA3 (Abgent), E-cadherin (BD Biosciences, clone 36), N-Cadherin (BD Biosciences, Clone 32), β-catenin (Santa Cruz, clone 12F7), Vimentin (BD Pharmingen, clone RV202), Occludin (Life Technologies, Clone OC-3F10), Plakoglobin (Sigma-Aldrich, Clone 15F11), Snail (Cell Signaling, Clone C15D3), ZEB1 (Cell Signaling, D80D), EGFR (Cell Signaling, Clone

D38B1), TGF β R2 (Santa Cruz, Clone E-6), Ubiquitin (Santa Cruz, Clone P4D1), Flag (Sigma, clone M2), HA (Roche, clone 3F10). β -actin (Sigma-Aldrich, Clone AC-15) was used as a loading control. Immunoblot analyses were performed using the enhanced chemoluminescence-based detection kit (Pierce).

Wound healing assay

IGR-CaP1 and PC3 cells were plated in 6-well plates then EMT was induced as described above. Wounds were realized after 5 days of treatment, and then the medium was replaced for medium without FBS. Images were taken at starting point, 12 hours and 24 hours after the wound using an inverse microscope (EVOS AMEX1200, Life Technologies). Area between the wound edges is quantified with the ImageJ software (NIH).

Immunoprecipitation

For immunoprecipitation, IGR-CaP1, PC3 and HEK cells were transfected with the pLV-*SHISA3-Flag* lentiviral expression vector or empty vector using jetPRIME transfection reagent (Ozyme). 48h after transfection, cell extracts were prepared using cryolysis. Cells were trypsinised and resuspended in 20mM HEPES pH 7.5, 1.2% polyvinylpyrrolidone and protease inhibitors. Cellular suspension was added to liquid nitrogen, and mechanically disrupted using the Tissue Lyser system (Qiagen). Protein extracts were obtained by incubating the cryopowder with a solution of 120mM NaCl, 20mM HEPES, 1mM EDTA, 5% glycerol, 1% Brij97, protease inhibitors, at 4°C. SHISA3, EGFR or TGF β R2 proteins were co-immunoprecipitated using standard procedures and subjected to immunoblotting, in order to verify the efficiency of the immunoprecipitation procedure. The proteins eluted with FLAG peptide were digested with trypsin, using the FASP protocol[59], and the resulting peptides were desalted and concentrated using Vivapure C-18 Micro Spin Columns (VS-RP218L24_Sartorius stedim). The analyses of peptide mixtures were performed on EASY 1000nLC Q-EXACTIVE (Thermo Scientific), using EASY-Spray nanocolumn(ES800 15cm 75um), 300 nanoliter/min flow and 2h gradient of acetonitrile (starting concentration 5%

Acetonitrile and final 35%). The mass resolution for MS was set at 70000, whereas the mass resolution for MS/MS was set for 17500, and the collision energy for set for 27. The acquired data were analysed with Proteome Discoverer Software package using Mascot search engine.

Clonogenicity assay

IGR-CaP1 and IGR-CaP1-R cells were plated in 6 well plates for 24 hours. Cells were pre-treated with 25 μ M LY2157299 or vehicle for 72 hours, and then co-treated with LY2157299 and Docetaxel (12nM for parental cells, 100nM for resistant cells). After 2 weeks, clones were methanol fixed and stained using Crystal violet (sigma). Clones were counted using ImageJ software.

Flow cytometry

Flow cytometry was used to quantify apoptosis in LY2157299 and/or Docetaxel treated cells. Cells were stained using BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, 556547) according to the supplier instructions. Fluorescence was measured with FACSCalibur system (Becton Dickinson).

Immunofluorescence microscopy

Cells were plated on coverslips and grown for 2 days. Depending on experimental procedures, cells were transiently transfected for 48h with the lenti-*Flag-SHISA3* expression vector lentiviral or empty vector using jetPRIME transfection reagent (Ozyme). Cells were fixed in 4% formaldehyde and permeabilized with 0.2% triton X100. Cells were labelled with specific antibodies followed by incubation with dye-conjugated antibodies (Molecular Probes). Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus stainings were obtained by using Calnexin (Santa Cruz Biotechnology) and GM130 (BD Biosciences) antibodies respectively. Images were acquired on confocal microscope (Leica TCS SPE) or fluorescence microscope

(Zeiss Axioplan 2). Tridimensional reconstructions of stacked confocal images were obtained using Imaris software (Bitplane).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from INSERM, the Université Paris-Sud11, the PAIR PROSTATE grant n°2010-1-PRO-03 from the National Institute for Cancer (INCA), the ARC Foundation, and the Ligue contre le Cancer, the ECOS-SudA10S03 program and from AMGEN. NM was supported by the PARRAINAGE CHERCHEUR charity program of GustaveRoussy, SC was supported by the PAIR prostate grant, MG was supported by the Idex Paris-Saclay fellowship and SAT was supported by the ARC Foundation. This work received the grant from the TA program of GustaveRoussy for genomic and proteomic analyses. We gratefully thank FrédéricCommo for his help in miR signature design, Emilie Cochet and Marion Le Gentil for excellent technical help for high-throughput analyses and Sophie Salomé for technical help at the Cellular Imaging and Cytometry platform (PFIC).

REFERENCES

1. Eeles R, Goh C, Castro E, *et al.* The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol* 2014; **11**:18–31.
2. Fitzpatrick JM, Bellmunt J, Fizazi K, *et al.* Optimal management of metastatic castration-resistant prostate cancer: highlights from a European Expert Consensus Panel. *Eur J Cancer* 2014; **50**:1617–1627.
3. Yap TA, Zivi A, Omlin A, de Bono JS. The changing therapeutic landscape of castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; **8**:597–610.
4. Nadal R, Zhang Z, Rahman H, *et al.* Clinical activity of enzalutamide in Docetaxel-naïve and Docetaxel-pretreated patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 2014; **74**:1560–1568.
5. Schweizer MT, Zhou XC, Wang H, *et al.* The Influence of Prior Abiraterone Treatment on the Clinical Activity of Docetaxel in Men with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol* 2014; **66**:646–652.
6. Badrising S, van der Noort V, van Oort IM, *et al.* Clinical activity and tolerability of enzalutamide (MDV3100) in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer who progress after docetaxel and abiraterone treatment. *Cancer* 2014; **120**:968–975.
7. Van Soest RJ, van Royen ME, de Morrée ES, *et al.* Cross-resistance between taxanes and new hormonal agents abiraterone and enzalutamide may affect drug sequence choices in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur J Cancer* 2013; **49**:3821–3830.
8. Mezynski J, Pezaro C, Bianchini D, *et al.* Antitumour activity of docetaxel following treatment with the CYP17A1 inhibitor abiraterone: clinical evidence for cross-resistance? *Ann Oncol* 2012; **23**:2943–2947.

9. Seruga B, Ocana A, Tannock IF. Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; **8**:12–23.
10. Mahon KL, Henshall SM, Sutherland RL, Horvath LG. Pathways of chemotherapy resistance in castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2011; **18**:R103–123.
11. Fitzpatrick JM, de Wit R. Taxane mechanisms of action: potential implications for treatment sequencing in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2014; **65**:1198–1204.
12. Domingo-Domenech J, Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, *et al.* Suppression of acquired docetaxel resistance in prostate cancer through depletion of notch- and hedgehog-dependent tumor-initiating cells. *Cancer Cell* 2012; **22**:373–388.
13. Nakouzi N Al, Cotteret S, Commo F, *et al.* Targeting CDC25C, PLK1 and CHEK1 to overcome Docetaxel resistance induced by loss of LZTS1 in prostate cancer. *Oncotarget* 2014; **5**:667–678.
14. Shang Y, Cai X, Fan D. Roles of epithelial-mesenchymal transition in cancer drug resistance. *Curr Cancer Drug Targets* 2013; **13**:915–929.
15. Li P, Yang R, Gao W-Q. Contributions of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells to the development of castration resistance of prostate cancer. *Mol Cancer* 2014; **13**:55.
16. Pühr M, Hofer J, Schäfer G, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. *Am J Pathol* 2012; **181**:2188–2201.

17. Marín-Aguilera M, Codony-Servat J, Reig Ò, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition mediates docetaxel resistance and high risk of relapse in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2014; **13**:1270–1284.
18. Feng X, Wang Z, Fillmore R, Xi Y. MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett* 2014; **344**:166–173.
19. Yu J, Lu Y, Cui D, *et al.* miR-200b suppresses cell proliferation, migration and enhances chemosensitivity in prostate cancer by regulating Bmi-1. *Oncol Rep* 2014; **31**:910–918.
20. Massoner P, Thomm T, Mack B, *et al.* EpCAM is overexpressed in local and metastatic prostate cancer, suppressed by chemotherapy and modulated by MET-associated miRNA-200c/205. *Br J Cancer* 2014; **111**:955–964.
21. Qu Y, Li W-C, Hellem MR, *et al.* MiR-182 and miR-203 induce mesenchymal to epithelial transition and self-sufficiency of growth signals via repressing SNAI2 in prostate cells. *Int J Cancer* 2013; **133**:544–555.
22. Viticchiè G, Lena AM, Latina A, *et al.* MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle* 2011; **10**:1121–1131.
23. Yamamoto A, Nagano T, Takehara S, Hibi M, Aizawa S. Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell* 2005; **120**:223–235.
24. Nagano T, Takehara S, Takahashi M, Aizawa S, Yamamoto A. Shisa2 promotes the maturation of somitic precursors and transition to the segmental fate in *Xenopus* embryos. *Development* 2006; **133**:4643–4654.
25. Furushima K, Yamamoto A, Nagano T, *et al.* Mouse homologues of Shisa antagonistic to Wnt and Fgf signalings. *Dev Biol* 2007; **306**:480–492.

26. Gröger CJ, Grubinger M, Waldhör T, Vierlinger K, Mikulits W. Meta-analysis of gene expression signatures defining the epithelial to mesenchymal transition during cancer progression. *PLoS One* 2012; **7**:e51136.
27. Pinto CA, Widodo E, Waltham M, Thompson EW. Breast cancer stem cells and epithelial mesenchymal plasticity - Implications for chemoresistance. *Cancer Lett* 2013; **341**:56–62.
28. Wang Z, Li Y, Ahmad A, *et al.* Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; **8**:27–33.
29. Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, Quinn M. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; **10**:268–278.
30. Ding X, Park SI, McCauley LK, Wang C-Y. Signaling between transforming growth factor β (TGF- β) and transcription factor SNAI2 represses expression of microRNA miR-203 to promote epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis. *J Biol Chem* 2013; **288**:10241–10253.
31. Moes M, Le Béhec A, Crespo I, *et al.* A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition. *PLoS One* 2012; **7**:e35440.
32. Ceppi P, Peter ME. MicroRNAs regulate both epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Oncogene* 2014; **33**:269–278.
33. Moes M, Le Béhec A, Crespo I, *et al.* A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition. *PLoS One* 2012; **7**:e35440.

34. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; **19**:156–172.
35. Pei J, Grishin N V. Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors. *Cell Signal* 2012; **24**:758–769.
36. Wells RG, Yankelev H, Lin HY, Lodish HF. Biosynthesis of the type I and type II TGF-beta receptors. Implications for complex formation. *J Biol Chem* 1997; **272**:11444–11451.
37. Luga V, McLean S, Le Roy C, O'Connor-McCourt M, Wrana JL, Di Guglielmo GM. The extracellular domain of the TGFbeta type II receptor regulates membrane raft partitioning. *Biochem J* 2009; **421**:119–131.
38. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; **19**:156–172.
39. Bhole NE, Balko JM, Dugger TC, *et al.* TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest* 2013; **123**:1348–1358.
40. Corcoran NM, Gleave ME. Targeted therapy in prostate cancer. *Histopathology* 2012; **60**:216–231.
41. Nauseef JT, Henry MD. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? *Nat Rev Urol* 2011; **8**:428–439.
42. Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, Fecko A, Pienta KJ, Day ML. E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Hum Pathol* 2001; **32**:690–697.
43. Li P, Yang R, Gao W-Q. Contributions of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells to the development of castration resistance of prostate cancer. *Mol Cancer* 2014; **13**:55.

44. Anose BM, Sanders MM. Androgen Receptor Regulates Transcription of the ZEB1 Transcription Factor. *Int J Endocrinol* 2011; **2011**:903918.
45. Zhu M-L, Kyprianou N. Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells. *FASEB J* 2010; **24**:769–777.
46. Sun Y, Wang B-E, Leong KG, *et al.* Androgen deprivation causes epithelial-mesenchymal transition in the prostate: implications for androgen-deprivation therapy. *Cancer Res* 2012; **72**:527–536.
47. Izumi K, Fang L-Y, Mizokami A, *et al.* Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. *EMBO Mol Med* 2013; **5**:1383–1401.
48. Jacob S, Nayak S, Fernandes G, *et al.* Androgen receptor as a regulator of ZEB2 expression and its implications in epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2014; **21**:473–486.
49. Chen C-C, Chen H-Y, Su K-Y, *et al.* Shisa3 Is Associated with Prolonged Survival through Promoting β -Catenin Degradation in Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; **190**:433–444.
50. Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**:112–126.
51. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2007; **19**:176–184.
52. Wicks SJ, Grocott T, Haros K, Maillard M, ten Dijke P, Chantry A. Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 2006; **34**:761–763.

53. Giannelli G, Villa E, Lahn M. Transforming growth factor- β as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2014; **74**:1890–1894.
54. Kachroo N, Gnanapragasam VJ. The role of treatment modality on the utility of predictive tissue biomarkers in clinical prostate cancer: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; **139**:1–24.
55. Barber AG, Castillo-Martin M, Bonal DM, Rybicki BA, Christiano AM, Cordon-Cardo C. Characterization of desmoglein expression in the normal prostatic gland. Desmoglein 2 is an independent prognostic factor for aggressive prostate cancer. *PLoS One* 2014; **9**:e98786.
56. Chauchereau A, Al Nakouzi N, Gaudin C, *et al.* Stemness markers characterize IGR-CaP1, a new cell line derived from primary epithelial prostate cancer. *Exp Cell Res* 2011; **317**:262–275.
57. Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, *et al.* TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992; **71**:1003–1014.
58. Chauchereau A, Al Nakouzi N, Gaudin C, *et al.* Stemness markers characterize IGR-CaP1, a new cell line derived from primary epithelial prostate cancer. *Exp Cell Res* 2011; **317**:262–275.
59. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009; **6**:359–362.
60. Díaz-Martín J, Díaz-López A, Moreno-Bueno G, *et al.* A core microRNA signature associated with inducers of the epithelial-to-mesenchymal transition. *J Pathol* 2014; **232**:319–329.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Expression of SHISA3 in Docetaxel-resistant prostate cancer cells and in other cancers

A. Real-time qRT-PCR showing the inhibition of *SHISA3* gene expression in Docetaxel-resistant IGR-CaP1-R and PC3-R cells. **B.** Whole cell extracts of parental and drug-resistant cells were subjected to immunoblotting with antibodies specific for SHISA3 or β -actin (loading control). Arrows indicate specific bands corresponding to SHISA3, star indicates a non-specific band. **C.** Quantitative RT-PCR shows *SHISA3* expression in several prostate, kidney and melanoma cell lines. **D-E.** *SHISA3* mRNA was assessed by determining Δ Ct in normal tissues and in several solid tumors. Results were normalized to the universal RNA included in each panel. In **D**, out of all the tested tissues for *SHISA3* expression, only tissues with the highest expression were shown. In **E**, the bars represent the mean. *P* value was derived from the two-tailed Student's *t* test. **F.** Subcellular localization after transfection of *SHISA3-Flag-GFP* in HEK cells. Cells were analyzed by confocal microscopy. GFP stained the transfected cells, SHISA3 was labeled with anti-SHISA3 antibody (red) and nucleus was stained with Dapi. Z-projections (right) highlighted the two localizations of SHISA3: Arrows show cell membrane speckles and the star shows the intracytoplasmic localization. Co-labeling of SHISA3 with anti-SHISA3 (red) and anti-Calnexin (green), marker of the ER, showed the absence of colocalization of SHISA3 with ER. Co-labeling of SHISA3 (red) and anti-GM130 (green), marker of the Golgi, showed the colocalization of cytoplasmic SHISA3 with Golgi. Secondary antibodies were used as followed: Alexa-568 for SHISA3 and Alexa-647 for Calnexin and GM130.

Figure 2: Characterization of EMT in Docetaxel-Resistant cells compared to parental IGR-CaP1 and PC3 Cells

A. Heat map showing the miRNA signature ($FC > 1.5$) obtained in Docetaxel-resistant cells overlapping with an EMT-associated miRNA signature[60]. **B.** Venn diagram showing genes

with differential expression ($FC > 2$) in Docetaxel-resistant IGR-CaP1 and PC3 cell lines compared with the EMT-associated gene signature (5). **C.** Cell morphological difference between parental and Docetaxel-resistant cell lines in phase contrast microscopy. **D-F.** Expression of EMT markers in parental and Docetaxel-resistant IGR-CaP1 and PC3 cells by western-blot and immunofluorescence analyses: **(D)** Epithelial (E-cadherin/CDH1 and β -catenin/CTNNB1) and mesenchymal (N-cadherin/CDH2 and Vimentin/VIM) markers; **(E)** **(F)** Tight junction proteins Occludin (OCLN) and desmosome protein Plakoglobin (JUP), respectively. Immunofluorescence was performed on IGR-CaP1 and PC3 cells using anti-occludin and anti-plakoglobin antibodies and labeled with alexa-488 conjugated antibody. Nuclei were stained with Dapi **G.** Expression of EMT transcription factors Snail/SNAI1 and ZEB1 in parental and resistant cells determined by qRT-PCR, western blot, and immunofluorescence analyses using anti-ZEB1 antibodies. Nuclei were stained with Dapi.

Figure 3: Silencing of SHISA3 induces EMT in IGR-CaP1 and PC3 parental cells

A. *SHISA3* depletion with siRNA leads to the loss of tight junction protein Occludin. Cells transfected for 5 days with either a non-targeted siRNA (siNT) or with different siRNA targeting *SHISA3* and were analyzed by western-blot and immunofluorescence. Western-blot analysis was performed using specific antibodies for *SHISA3*, Occludin (OCLN) or actin. **B.** Cell morphological changes observed 8 days after transfection of non-targeted siRNA (siNT) or different specific *SHISA3*siRNAs. **C.** *SHISA3*siRNA decreases the expression of the epithelial E-cadherin (CDH1) and increases the expression of N-cadherin (CDH2) and snail (SNAI1) as determined by immunoblot. Quantification of bands relative to actin is shown. **D.** Cell migration was measured in wound healing assays after 5 days with siSHISA3 or siNT. The area between the wound edges was quantified by Image J at 0, 12, and 24 hours after wound healing. Bars represent the mean \pm SEM (n=14). *P* value was derived from the two-tailed Student's *t* test. (p < 0.05 : * ; p < 0.005 : ** ; p < 0.0005 : ***).

Figure 4: SHISA3 interacts with TGF β R2

A. Schematic structure of *SHISA3* and *SHISA3-Flag* sharing a signal peptide (black box), an amino-terminal CRD (blue box), a predicted transmembrane segment (TM), and a carboxy-terminal proline-rich region (Grey box). The position of the FLAG tag (red box) is indicated.

B. Functional inter-dependence of a subset of the differentially expressed proteins found in the proteomic study as determined with the Ingenuity Pathway Analysis software program (Ingenuity Systems, Inc.).

C. *SHISA3* and endogenous TGF β R2 interaction. Cells extracts from IGR-CaP1, PC3 and HEK cells transfected with *SHISA3-Flag* were immunoprecipitated with anti-TGF β R2, anti-EGFR, anti-Flag antibodies or IgG as control and analyzed by immunoblot using anti-TGF β R2, anti-EGFR and anti-*SHISA3* antibodies. Input represents 10% of the IP.

D. Co-localization of *SHISA3* and TGF β R2 in cytoplasmic granules and speckles at the membrane. Subcellular localizations of *SHISA3* and TGF β R2 were analyzed by confocal microscopy after co-transfection of *SHISA3-Flag* and *HA-TGF β R2* in HEK cells using anti-*SHISA3* and anti-TGF β R2 primary antibodies, and Alexa-568- and Alexa-647-conjugated secondary antibodies respectively. Nuclei were labeled with Dapi. Overlapped fluorescent signals (yellow) indicated co-localized proteins.

E. *SHISA3* and EMT markers expression 5 days after cell treatment with TGF β 1. Whole cells extracts of cells treated with mock or TGF β were subjected to immunoblot and revealed with anti-*SHISA3* and EMT marker antibodies. Quantification of bands relative to actin is shown.

Figure 5: SHISA3 increases TGF β R2 ubiquitination

A. Immunoprecipitated forms of endogenous TGF β R2 were highly ubiquitinated in *SHISA3*-expressing parental IGR-CaP1 cells. Immunoprecipitated proteins with the anti-TGF β R2 antibody or IgG as control were analyzed by immunoblotting with anti-TGF β R2 and anti-ubiquitin antibodies. Input represents 10% of immunoprecipitated proteins. Expression of co-immunoprecipitated *SHISA3* is shown.

B. *SHISA3* increases ubiquitination of endogenous TGF β R2. IGR-CaP1 cells were transfected with *SHISA3-Flag* and HA-Ubiquitine-expressing vectors or corresponding empty vectors. Cellular extracts were prepared 48h after

transfection and proteins were immunoprecipitated with anti-TGF β R2 antibody. Immunoblots were revealed with anti-TGF β R2 and anti-HA antibodies.

Figure 6: Targeting the TGF β signaling with a small inhibitor increases cell death of Docetaxel resistant cells

A. Colony formation assay. Cells were pretreated with 25 μ M LY2157299 or vehicle for 72 hours. Then, cells were treated with Docetaxel and/or 25 μ M LY2157299, control cells were treated with vehicle. Docetaxel was used at 12nM in parental IGR-CaP1 and 100nM in resistant IGR-CaP1-R100. Cells were stained with Crystal Violet 2 weeks later. Data are represented as mean \pm SD. *P* value was derived from the two-tailed Student's *t* test, significantly different (**P*<0.05,). Representative cell colonies obtained in each condition is shown. **B.** Apoptosis. Cells treated for 72h with Docetaxel and/or LY2157299 (25 μ M) as described in A. Apoptosis was assessed using Annexin V and propidium iodide staining. Data represent mean \pm SEM of three independent experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table SI

List of the 450 human genes which were highly regulated in Docetaxel-resistant PC3 cell lines (FC ≥ 2 , p-value $< 5 \times 10^{-2}$)

Table SII

List of miRNA which were deregulated in Docetaxel-resistant IGR-CaP1 and PC3 cells (FC ≥ 1.5)

Table SIII

List of the 28 proteins issued of the proteomic analysis which potentially interact with SHISA3 in human prostate cancer cells

Figure S1: Cell-growth characteristics of Docetaxel-resistant PC3 cells

Docetaxel-resistant PC3-R12 cells were established as described in Materials and Methods. The cell survival assay was performed after 2 weeks of culture in presence or in absence of 12nM of Docetaxel. The number of clones was determined.

Figure S2: Expression of endogenous EGF and TGF β R2 receptors in parental and Docetaxel-resistant cells

A. Whole cell extracts of IGR-CaP1, IGR-CaP1-R100, PC3 and PC3-R12 cells were subjected to immunoblot and revealed with anti-EGFR antibody (Cell signaling, clone D38B1). Actin was used as loading control. **B.** Expression of TGF β R2 was determined by qRT-PCR in the same four cell lines and in HEK cells. Mean CT_{TGF β R2} are 24.2 in IGR-CaP1 model, 22.6 in PC3 model and 25.1 in HEK cells. Results were expressed relative to the GAPDH gene by using the ratio method and were normalized to the universal RNA.

Figure S3: Immunoprecipitation of endogenous TGF β R2 in IGR-CaP1 and PC3 cells

Endogenous TGF β R2 from IGR-CaP1 and PC3 cells were immunoprecipitated with anti-TGF β R2 antibody or IgG as control. Immunoblot of immunoprecipitated proteins was revealed with anti-TGF β R2 antibody and with anti-ubiquitin antibody to observe the poly-ubiquitinated forms of the receptor. A loading control of whole cell extracts of cells treated with MG132 was used as control of ubiquitinated proteins. Input represents 10% of the IP. Expression of co-immunoprecipitated SHISA3 is shown. Star represents a non-specific band.

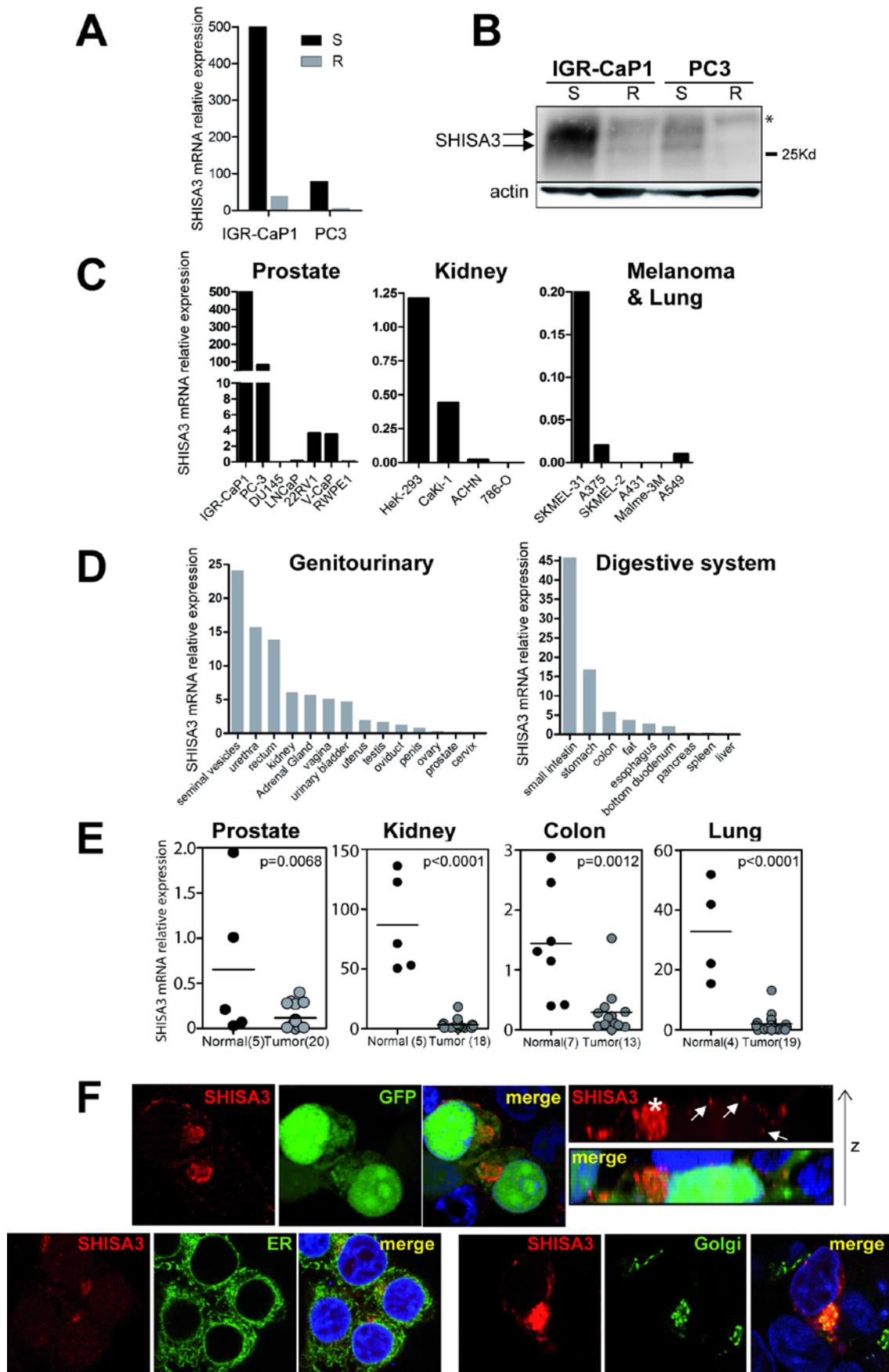


Figure 1

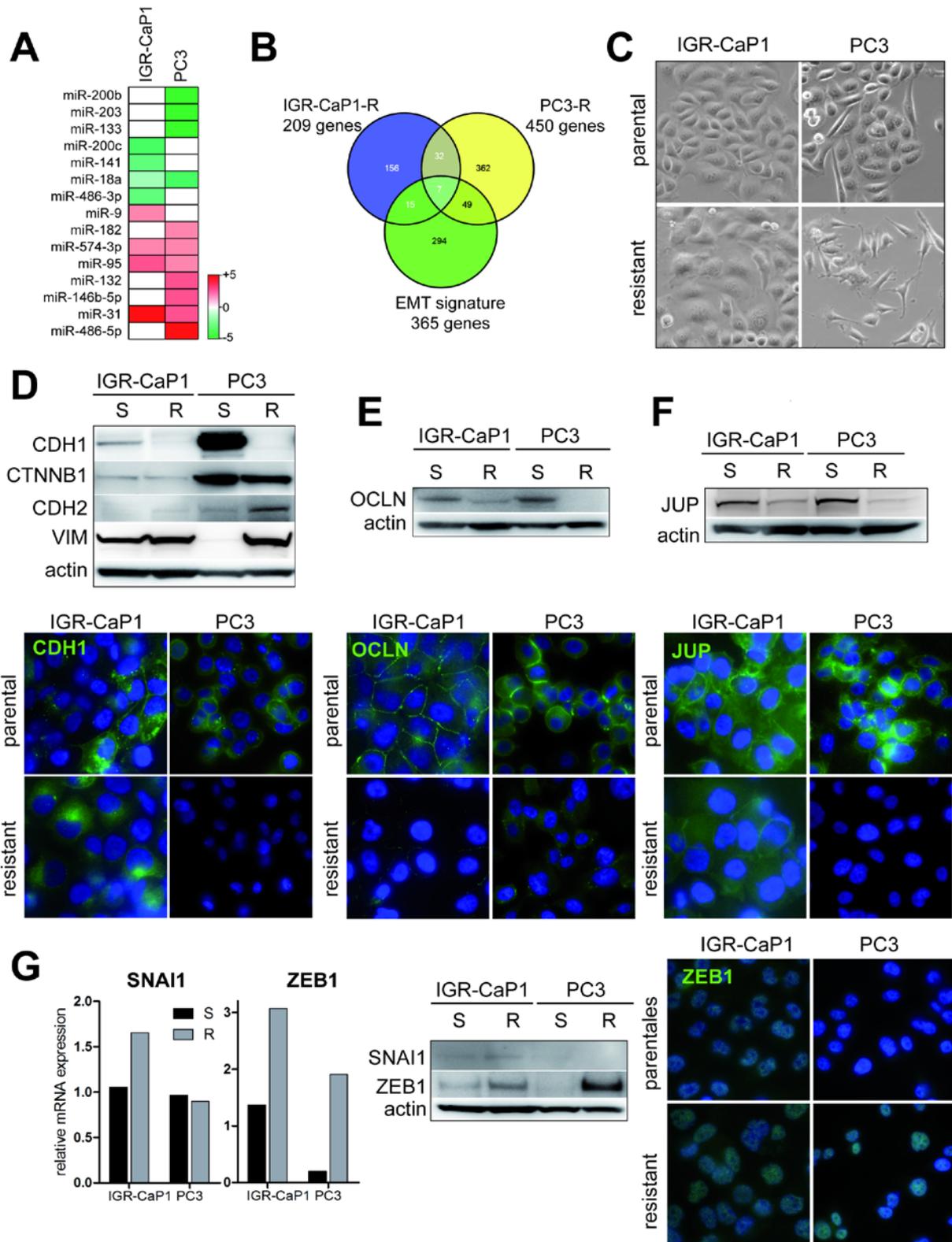


Figure 2

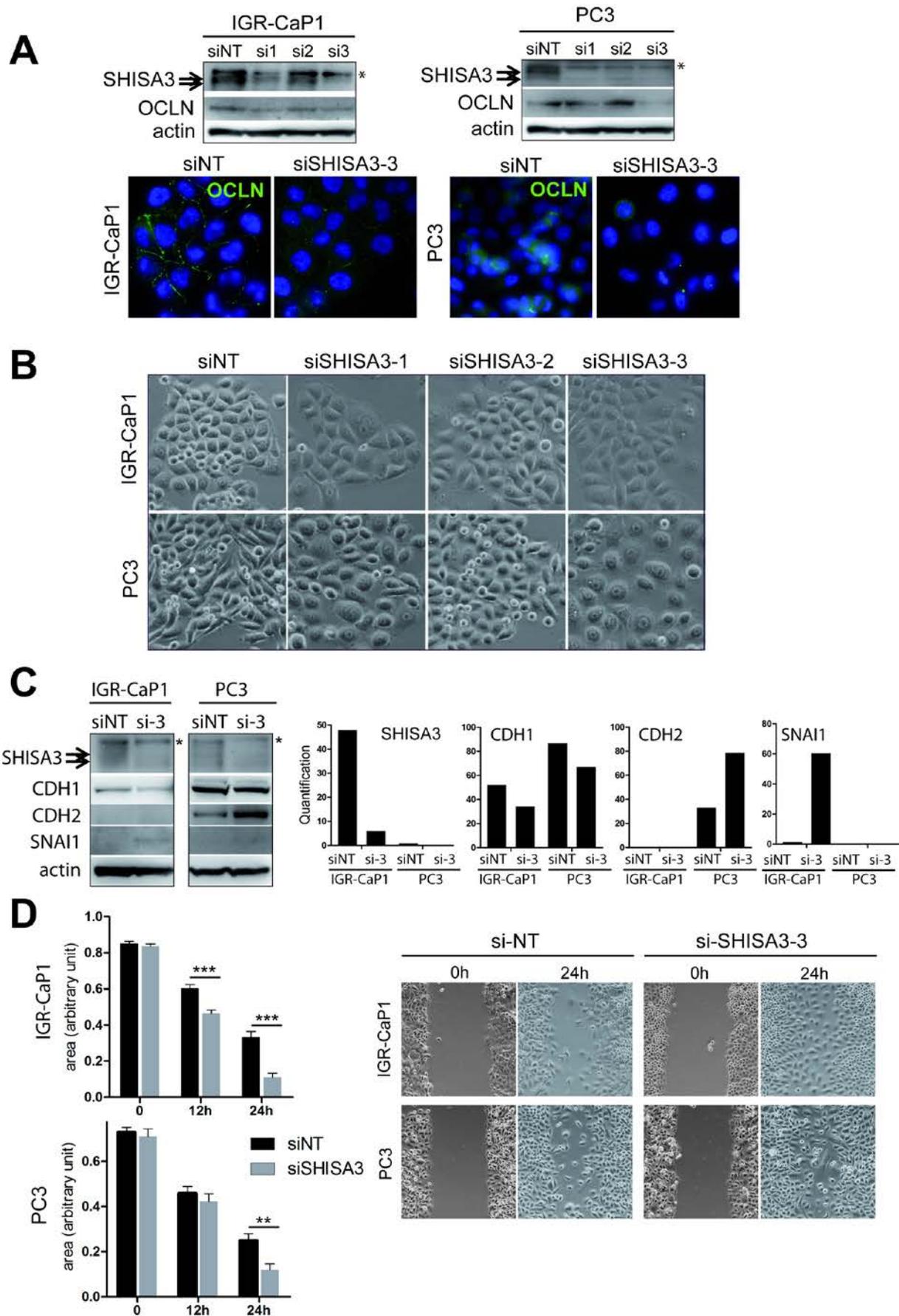


Figure 3

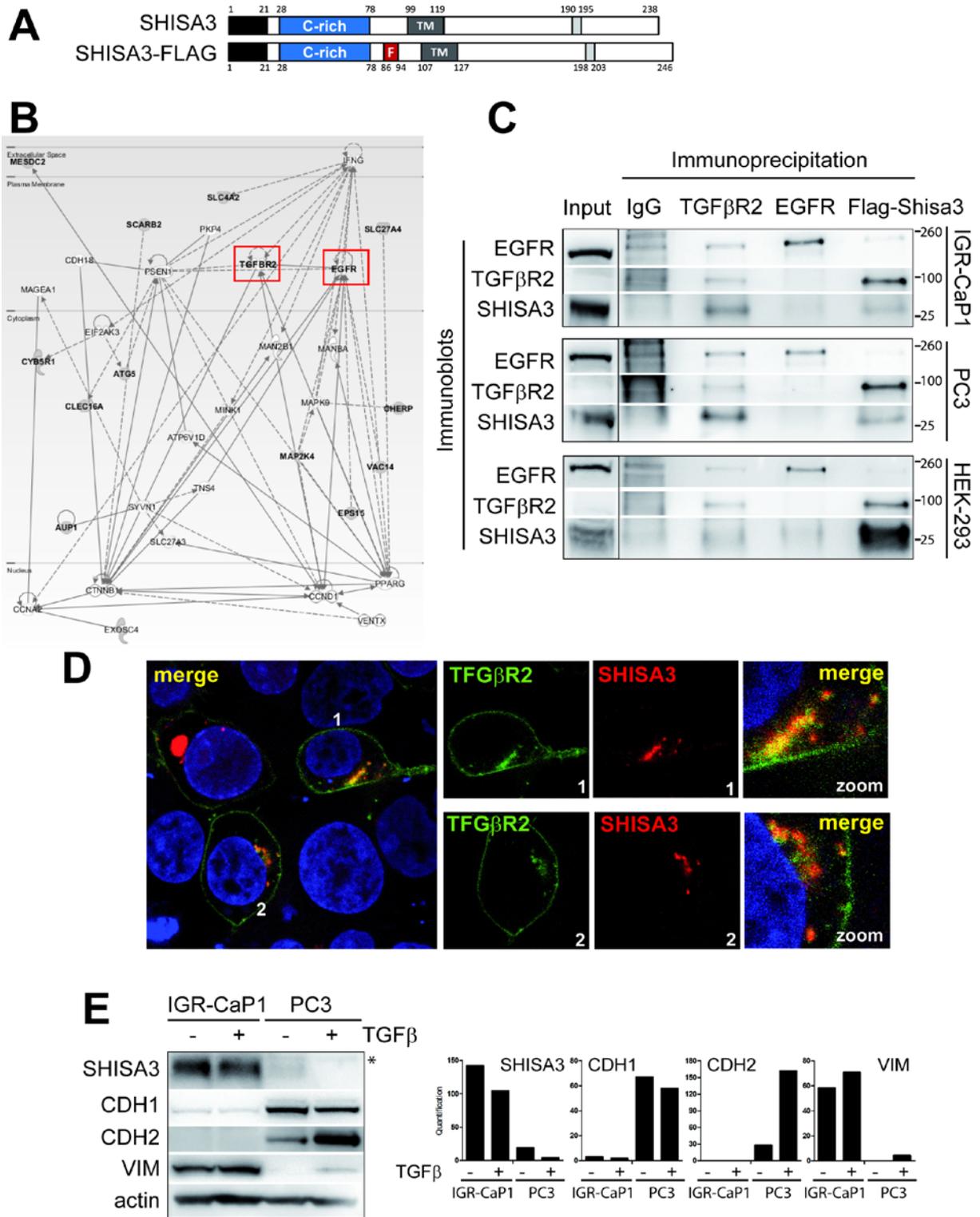


Figure 4

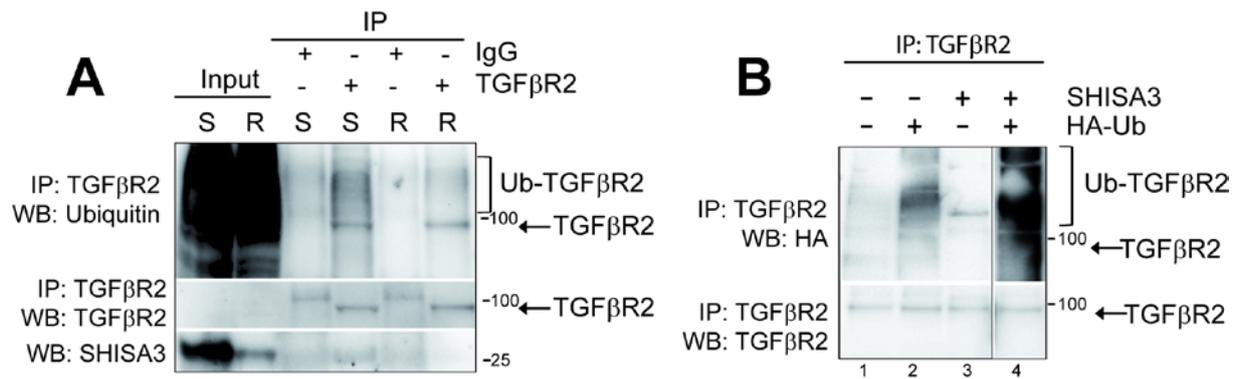


Figure 5

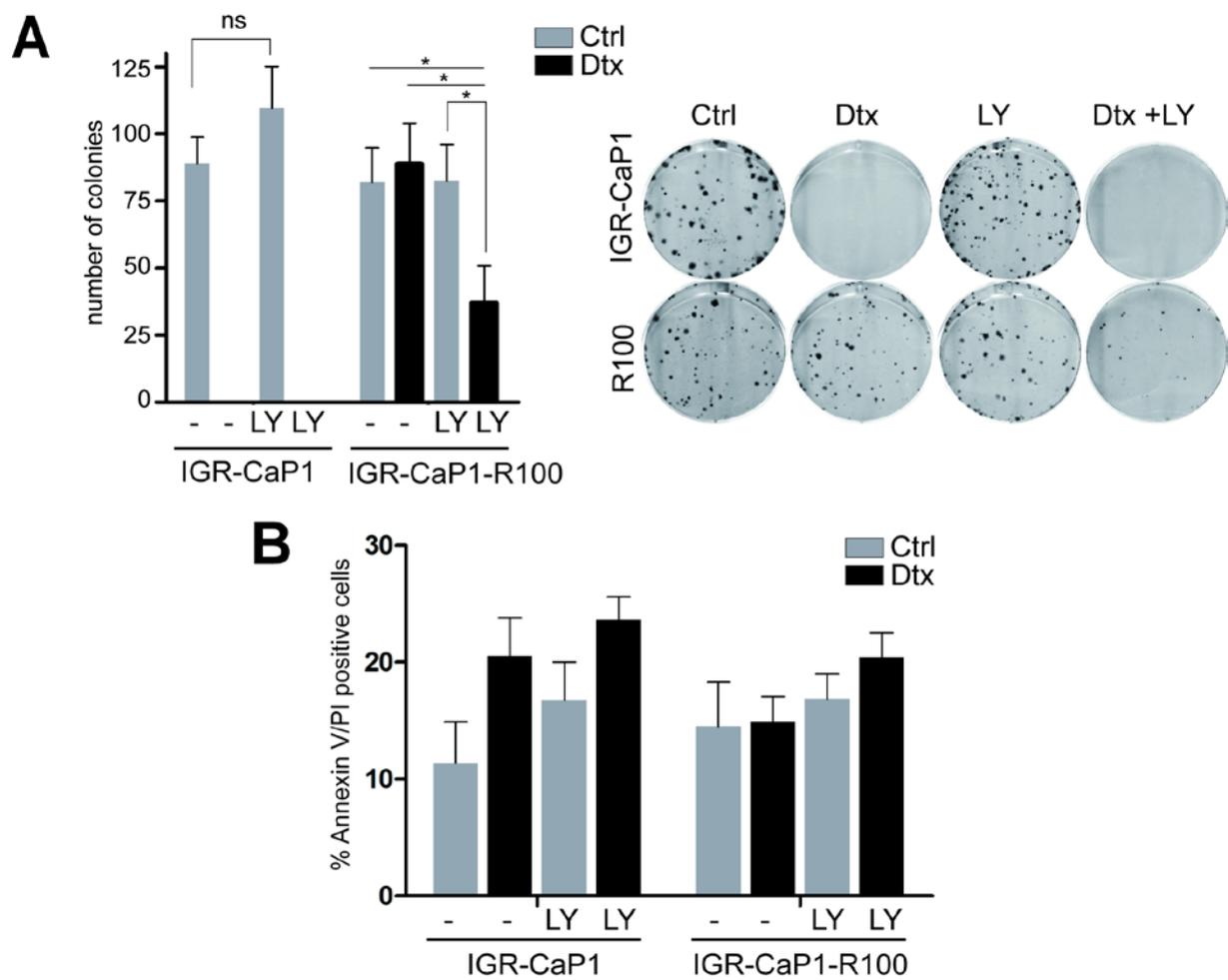


Figure 6

Table S1

List of the 450 human genes which were highly regulated in Docetaxel-resistant PC3 cell lines (FC ≥ 2 , p-value < 0.05)

ID	log2(ratio)	Fold Change (FC)	P-Value	adj. P-Value
TFPI2	2,44	5,41	3,32E-03	3,94E-02
HIST2H2AA4	2,39	5,25	2,47E-05	9,94E-04
HIST1H2AD	2,25	4,77	1,36E-05	6,22E-04
IGFBP3	2,03	4,09	8,74E-06	4,35E-04
BC034319	1,95	3,87	7,40E-06	3,82E-04
GNG11	1,93	3,81	7,05E-04	1,26E-02
LOX	1,92	3,78	3,10E-08	6,51E-06
ADAMTS1	1,91	3,75	7,11E-06	3,72E-04
AK055386	1,70	3,26	5,50E-07	5,59E-05
KCNB1	1,68	3,21	2,90E-07	3,52E-05
C1S	1,67	3,19	6,32E-07	6,20E-05
SPOCK1	1,67	3,18	1,90E-11	8,73E-08
NNMT	1,66	3,16	3,20E-07	3,73E-05
PLCB1	1,57	2,96	3,53E-06	2,17E-04
RNF150	1,55	2,93	3,03E-09	1,43E-06
VCX3A	1,54	2,91	7,68E-05	2,31E-03
AMY1C	1,52	2,87	9,09E-04	1,52E-02
LTK	1,52	2,86	1,67E-08	4,34E-06
SPANXA1	1,52	2,86	2,61E-05	1,03E-03
AP1S2	1,50	2,82	4,27E-08	7,98E-06
HIST1H2AE	1,48	2,78	4,58E-04	9,03E-03
BIRC3	1,47	2,77	7,67E-03	7,14E-02
HIST2H2BE	1,46	2,76	1,39E-05	6,33E-04
RUNDC3B	1,45	2,73	2,54E-05	1,02E-03
PTN	1,45	2,73	1,97E-07	2,66E-05
HIST1H1C	1,44	2,71	3,45E-04	7,25E-03
VCX	1,42	2,67	8,59E-05	2,52E-03
THC2738878	1,41	2,65	9,75E-05	2,77E-03
ABCB1	1,40	2,64	1,43E-02	1,11E-01
FGF13	1,39	2,62	2,95E-07	3,55E-05
ENST00000421003	1,39	2,61	5,53E-08	9,72E-06
ARHGAP44	1,38	2,61	6,69E-09	2,31E-06
ADAM23	1,37	2,59	4,89E-08	8,99E-06
RGS5	1,37	2,58	5,66E-06	3,12E-04
THC2753543	1,36	2,57	1,96E-06	1,40E-04
SPARC	1,36	2,57	6,66E-04	1,20E-02
CREB5	1,34	2,53	1,37E-08	3,85E-06
OASL	1,34	2,53	2,46E-05	9,92E-04
LOC338620	1,34	2,52	5,55E-05	1,81E-03
AP3S1	1,33	2,52	2,70E-05	1,05E-03
IFI44	1,32	2,50	3,89E-04	7,93E-03
SPANXD	1,32	2,49	6,34E-05	2,00E-03
DUSP1	1,32	2,49	1,74E-06	1,28E-04

CLGN	1,31	2,48	5,06E-03	5,33E-02
PCDH9	1,30	2,46	2,89E-06	1,88E-04
HIST1H2AC	1,29	2,45	6,69E-04	1,20E-02
GBP1	1,29	2,44	1,07E-03	1,71E-02
KCNJ8	1,29	2,44	2,26E-07	2,92E-05
SERPINB2	1,28	2,43	1,27E-04	3,43E-03
GDF15	1,27	2,41	3,48E-05	1,27E-03
ATP8A2	1,27	2,41	3,76E-08	7,29E-06
CTBP1	1,27	2,41	8,95E-09	2,88E-06
N4BP2L2	1,26	2,40	8,19E-04	1,40E-02
VLDLR	1,26	2,39	2,91E-06	1,88E-04
HIST1H2BK	1,26	2,39	9,61E-04	1,58E-02
HIST3H2A	1,26	2,39	6,07E-04	1,12E-02
KCNJ2	1,25	2,38	6,60E-06	3,55E-04
ANXA10	1,24	2,37	2,19E-05	9,06E-04
CNTNAP3	1,24	2,36	6,44E-07	6,26E-05
NAP1L3	1,24	2,36	1,24E-04	3,37E-03
MCTP1	1,24	2,35	7,00E-05	2,16E-03
SPTLC3	1,22	2,34	7,38E-07	6,88E-05
THC2496620	1,22	2,33	2,10E-06	1,47E-04
NTNG2	1,21	2,32	1,96E-03	2,67E-02
KAL1	1,21	2,31	3,26E-08	6,73E-06
MX1	1,20	2,29	7,94E-03	7,34E-02
CHSY3	1,19	2,29	6,87E-08	1,17E-05
LOC100507165	1,19	2,28	6,78E-06	3,62E-04
THC2676635	1,19	2,28	2,88E-05	1,10E-03
ZBTB20	1,18	2,27	8,20E-05	2,43E-03
TTC25	1,18	2,27	8,02E-04	1,38E-02
EID3	1,18	2,26	1,97E-08	4,91E-06
SCG5	1,17	2,26	1,32E-07	1,95E-05
RBP4	1,17	2,25	8,05E-06	4,08E-04
MST1P2	1,17	2,25	8,36E-04	1,43E-02
WNT5A	1,17	2,24	4,73E-09	1,79E-06
BX098660	1,16	2,24	7,15E-07	6,71E-05
PCDHB14	1,16	2,24	3,97E-10	7,00E-07
ADAM22	1,16	2,24	6,56E-07	6,34E-05
MT1B	1,16	2,23	6,11E-05	1,95E-03
MAP1LC3B	1,16	2,23	1,33E-06	1,06E-04
LOC100505971	1,15	2,22	1,84E-04	4,52E-03
KCTD12	1,15	2,22	2,71E-03	3,41E-02
NEAT1	1,14	2,21	3,95E-04	8,01E-03
MT1L	1,14	2,20	6,49E-05	2,03E-03
EDN1	1,14	2,20	3,72E-09	1,60E-06
GLS	1,14	2,20	5,95E-03	5,96E-02
DDIT3	1,14	2,20	2,49E-04	5,70E-03
A_23_P251002	1,13	2,19	1,95E-07	2,66E-05
MST1	1,13	2,19	7,29E-04	1,28E-02
ARPP21	1,13	2,19	8,48E-05	2,49E-03

ANXA1	1,13	2,18	4,48E-02	2,36E-01
TLR3	1,12	2,18	6,86E-05	2,13E-03
MAP1B	1,12	2,17	8,75E-04	1,48E-02
ENST00000447898	1,12	2,17	7,12E-06	3,72E-04
PCDH7	1,12	2,17	9,55E-04	1,58E-02
FRAS1	1,12	2,17	7,57E-05	2,29E-03
RHOBTB1	1,11	2,16	4,92E-04	9,57E-03
OSCAR	1,10	2,15	1,55E-09	1,06E-06
APOL3	1,10	2,15	1,51E-06	1,13E-04
SERPINI1	1,10	2,15	3,99E-10	7,00E-07
CACNG6	1,10	2,14	5,59E-03	5,70E-02
PID1	1,10	2,14	7,46E-04	1,31E-02
LINC00461	1,10	2,14	3,38E-07	3,86E-05
THC2660361	1,10	2,14	1,72E-07	2,38E-05
BC020539	1,09	2,13	1,07E-07	1,66E-05
MARCKS	1,09	2,13	2,76E-03	3,45E-02
NFKBIZ	1,09	2,13	3,35E-03	3,96E-02
A_32_P23872	1,09	2,13	9,86E-06	4,74E-04
TMTC1	1,09	2,12	1,04E-03	1,67E-02
MT2A	1,08	2,11	1,30E-04	3,47E-03
CNTNAP3B	1,08	2,11	7,40E-06	3,82E-04
A_32_P173922	1,07	2,10	1,02E-04	2,87E-03
ADM	1,07	2,10	9,49E-03	8,36E-02
HERPUD1	1,07	2,10	1,56E-05	6,94E-04
IGFBP1	1,07	2,09	3,93E-03	4,43E-02
BC031314	1,06	2,09	3,23E-05	1,20E-03
C16orf45	1,06	2,08	4,92E-08	8,99E-06
IGFBP5	1,06	2,08	4,18E-06	2,48E-04
GJA1	1,06	2,08	3,35E-05	1,23E-03
LRRC6	1,06	2,08	7,41E-07	6,88E-05
BC035518	1,06	2,08	1,61E-04	4,10E-03
FBXO15	1,05	2,08	1,58E-04	4,03E-03
IFIT1	1,05	2,08	1,64E-02	1,22E-01
AY831680	1,05	2,07	3,10E-05	1,17E-03
SLC6A13	1,05	2,07	3,06E-06	1,94E-04
CLU	1,05	2,07	1,29E-03	1,94E-02
ADAMTS5	1,05	2,06	6,27E-03	6,21E-02
MT1E	1,04	2,06	4,31E-04	8,59E-03
LOC643454	1,04	2,06	1,09E-05	5,18E-04
OAS3	1,04	2,06	5,12E-03	5,37E-02
DOCK3	1,03	2,05	1,38E-06	1,08E-04
C4orf47	1,03	2,05	1,59E-06	1,18E-04
FRMD6	1,03	2,04	1,31E-08	3,75E-06
LEPREL1	1,02	2,03	1,24E-03	1,90E-02
LOC157562	1,02	2,03	4,21E-04	8,43E-03
PTX3	1,02	2,03	9,66E-05	2,76E-03
THC2526402	1,02	2,03	3,29E-05	1,22E-03
CCPG1	1,02	2,02	1,56E-03	2,26E-02

ODZ2	1,01	2,02	2,41E-06	1,62E-04
ENST00000369158	1,01	2,02	9,04E-04	1,51E-02
DOK3	1,01	2,02	5,85E-05	1,88E-03
KCNQ1OT1	1,01	2,02	1,34E-03	2,00E-02
ZNF469	1,01	2,02	4,62E-07	4,93E-05
MALAT1	1,01	2,01	1,12E-02	9,38E-02
HIST3H2BB	1,01	2,01	3,40E-06	2,12E-04
C5orf54	1,01	2,01	1,64E-05	7,23E-04
LOC100652951	1,01	2,01	9,91E-06	4,76E-04
ANGPTL4	1,00	2,00	1,55E-04	3,97E-03
LOC572558	1,00	2,00	6,29E-03	6,22E-02
LOC100505894	1,00	2,00	4,27E-05	1,50E-03
IL15	1,00	2,00	1,16E-03	1,81E-02
PSD4	-1,00	-2,00	4,07E-04	8,20E-03
DSP	-1,00	-2,00	8,83E-05	2,57E-03
C8orf73	-1,00	-2,01	5,45E-06	3,05E-04
SERPINA1	-1,00	-2,01	1,01E-03	1,64E-02
MCAM	-1,01	-2,01	1,12E-04	3,11E-03
CBLC	-1,01	-2,02	1,93E-08	4,88E-06
MYL9	-1,01	-2,02	8,81E-04	1,49E-02
COMTD1	-1,01	-2,02	1,57E-06	1,18E-04
LRG1	-1,02	-2,02	5,16E-03	5,40E-02
ARRB1	-1,02	-2,02	1,54E-03	2,24E-02
FASN	-1,02	-2,02	4,63E-03	4,98E-02
NUP210	-1,02	-2,02	8,55E-07	7,70E-05
LOXL3	-1,02	-2,02	1,38E-07	2,01E-05
TMPRSS2	-1,02	-2,02	7,50E-03	7,06E-02
CYB5A	-1,02	-2,03	2,90E-05	1,11E-03
KLK1	-1,02	-2,03	3,77E-04	7,73E-03
CHST6	-1,02	-2,03	1,39E-03	2,06E-02
SOX13	-1,02	-2,03	5,48E-05	1,80E-03
A_32_P25065	-1,02	-2,03	2,22E-08	5,25E-06
TLX2	-1,02	-2,03	2,01E-04	4,79E-03
PRKCD	-1,03	-2,04	1,81E-06	1,31E-04
SULT2B1	-1,03	-2,04	7,15E-04	1,27E-02
AK094799	-1,03	-2,04	3,25E-03	3,87E-02
AHNAK	-1,03	-2,04	9,93E-03	8,62E-02
A_24_P900555	-1,03	-2,04	5,04E-07	5,28E-05
APOE	-1,03	-2,04	3,59E-05	1,29E-03
WNT7A	-1,03	-2,04	1,38E-02	1,08E-01
RAB17	-1,03	-2,04	7,30E-05	2,24E-03
POLD2	-1,03	-2,04	7,70E-04	1,34E-02
TJP3	-1,03	-2,05	4,40E-03	4,81E-02
ICOSLG	-1,03	-2,05	5,71E-03	5,78E-02
LOC643988	-1,03	-2,05	3,65E-04	7,57E-03
FLJ23867	-1,04	-2,05	2,01E-06	1,43E-04
NOX5	-1,04	-2,06	4,45E-05	1,53E-03
PI3	-1,04	-2,06	3,44E-03	4,04E-02

PRTFDC1	-1,04	-2,06	8,99E-04	1,51E-02
FAM110C	-1,05	-2,07	5,67E-03	5,75E-02
RPP25	-1,05	-2,07	4,50E-05	1,54E-03
PCDH1	-1,05	-2,07	6,79E-03	6,56E-02
PEG3-AS1	-1,05	-2,08	2,77E-08	6,06E-06
NFE2	-1,05	-2,08	9,44E-03	8,33E-02
HPGD	-1,06	-2,08	7,48E-06	3,86E-04
COBL	-1,06	-2,08	2,36E-13	3,80E-09
MF12	-1,06	-2,08	6,89E-08	1,17E-05
GSPT2	-1,06	-2,08	9,05E-03	8,08E-02
TINAGL1	-1,06	-2,08	8,87E-05	2,58E-03
CLMN	-1,06	-2,08	4,60E-08	8,52E-06
THC2613527	-1,06	-2,09	1,58E-03	2,28E-02
CKB	-1,06	-2,09	1,12E-04	3,10E-03
ADAP2	-1,07	-2,09	2,97E-09	1,43E-06
HCAR1	-1,07	-2,10	1,62E-07	2,27E-05
SLC45A3	-1,07	-2,10	5,50E-05	1,80E-03
CXCL5	-1,07	-2,10	8,07E-07	7,42E-05
MMP23B	-1,07	-2,10	1,79E-04	4,44E-03
HS6ST2	-1,08	-2,11	2,05E-05	8,64E-04
GSTO2	-1,08	-2,11	1,55E-08	4,12E-06
SHROOM2	-1,08	-2,11	1,70E-06	1,26E-04
ZBED2	-1,08	-2,12	3,83E-04	7,83E-03
NUDT14	-1,08	-2,12	4,04E-05	1,43E-03
CXXC5	-1,09	-2,12	9,64E-05	2,76E-03
ENST00000439058	-1,09	-2,12	1,43E-05	6,47E-04
CGN	-1,09	-2,13	1,70E-07	2,38E-05
APOBEC3G	-1,10	-2,14	3,80E-03	4,34E-02
AK027383	-1,10	-2,14	1,11E-07	1,70E-05
AF088004	-1,10	-2,14	2,70E-06	1,79E-04
PDGFRA	-1,10	-2,14	1,92E-04	4,65E-03
ST6GALNAC1	-1,10	-2,15	2,85E-06	1,86E-04
DLC1	-1,10	-2,15	1,71E-02	1,25E-01
HSD11B2	-1,11	-2,15	1,43E-06	1,10E-04
THC2732746	-1,11	-2,16	2,09E-04	4,93E-03
DUSP13	-1,11	-2,16	4,52E-02	2,38E-01
C3	-1,11	-2,16	2,22E-06	1,55E-04
SLC12A3	-1,12	-2,17	2,65E-02	1,68E-01
PF4	-1,12	-2,17	4,18E-08	7,92E-06
CALHM2	-1,12	-2,17	2,41E-09	1,32E-06
A_24_P418744	-1,12	-2,18	9,94E-04	1,62E-02
SUSD3	-1,12	-2,18	1,03E-02	8,83E-02
PCBP2	-1,12	-2,18	6,75E-07	6,51E-05
COL9A3	-1,13	-2,18	1,01E-04	2,86E-03
IQCA1	-1,13	-2,18	7,73E-10	9,01E-07
DHDH	-1,13	-2,19	9,05E-05	2,62E-03
VAMP8	-1,13	-2,19	1,25E-04	3,38E-03
LOC100287525	-1,13	-2,19	5,74E-05	1,86E-03

CDC42BPG	-1,13	-2,19	1,24E-07	1,87E-05
A_32_P224345	-1,14	-2,20	5,00E-07	5,26E-05
HES2	-1,14	-2,20	8,75E-06	4,35E-04
UNC13D	-1,14	-2,20	2,31E-09	1,30E-06
IL28RA	-1,14	-2,20	1,90E-06	1,37E-04
ACTR3C	-1,14	-2,21	4,33E-12	3,48E-08
A_32_P142160	-1,14	-2,21	1,11E-08	3,36E-06
GLS2	-1,15	-2,22	5,16E-05	1,72E-03
LAMC3	-1,15	-2,22	1,33E-03	2,00E-02
ISYNA1	-1,15	-2,22	3,37E-04	7,16E-03
A_24_P93321	-1,15	-2,22	3,42E-06	2,12E-04
FOXQ1	-1,16	-2,23	1,66E-08	4,33E-06
IL1R2	-1,16	-2,23	1,47E-02	1,13E-01
DNALI1	-1,16	-2,23	9,98E-04	1,62E-02
FBP1	-1,16	-2,23	4,67E-09	1,79E-06
LLGL2	-1,16	-2,24	4,75E-04	9,31E-03
HIST1H4B	-1,17	-2,24	4,12E-03	4,60E-02
LRRC38	-1,17	-2,25	1,78E-08	4,59E-06
SLC6A10P	-1,17	-2,25	8,54E-04	1,45E-02
A_32_P78488	-1,17	-2,26	1,37E-06	1,08E-04
C19orf21	-1,17	-2,26	2,51E-04	5,71E-03
MUC5AC	-1,18	-2,26	3,34E-09	1,51E-06
A_24_P298894	-1,18	-2,27	6,46E-05	2,03E-03
HIST1H4L	-1,18	-2,27	3,16E-03	3,78E-02
GJB3	-1,18	-2,27	4,53E-09	1,78E-06
LOC645249	-1,18	-2,27	1,98E-03	2,69E-02
IL23A	-1,19	-2,28	2,15E-04	5,06E-03
BU540282	-1,19	-2,28	1,10E-05	5,22E-04
LOC100505880	-1,19	-2,28	1,77E-06	1,29E-04
FAM101B	-1,19	-2,29	6,30E-10	8,10E-07
ABHD1	-1,20	-2,29	5,53E-05	1,81E-03
CERS4	-1,20	-2,29	7,04E-04	1,26E-02
KCTD14	-1,20	-2,29	8,57E-06	4,29E-04
PYCARD	-1,20	-2,29	1,46E-06	1,12E-04
S100P	-1,20	-2,30	2,41E-03	3,12E-02
WNT3A	-1,21	-2,31	6,34E-05	2,00E-03
FANCF	-1,21	-2,31	7,83E-06	4,00E-04
AK057704	-1,21	-2,31	9,41E-09	2,98E-06
BCL11A	-1,21	-2,32	2,33E-06	1,60E-04
HSH2D	-1,22	-2,32	4,39E-09	1,78E-06
EPN3	-1,22	-2,33	1,31E-10	3,83E-07
CHD7	-1,22	-2,33	1,41E-05	6,39E-04
RHOV	-1,22	-2,33	1,60E-05	7,07E-04
S100A2	-1,22	-2,34	7,25E-06	3,76E-04
A_23_P66347	-1,23	-2,34	6,74E-06	3,61E-04
PLAU	-1,23	-2,34	1,22E-02	9,99E-02
LOC100652944	-1,23	-2,35	4,59E-09	1,78E-06
BM045853	-1,23	-2,35	5,68E-05	1,84E-03

BU686948	-1,24	-2,36	1,39E-07	2,01E-05
GRB14	-1,24	-2,36	4,44E-05	1,53E-03
A_32_P169353	-1,24	-2,37	9,51E-07	8,27E-05
BTG3	-1,25	-2,38	5,52E-04	1,05E-02
PTGES	-1,25	-2,38	3,84E-06	2,32E-04
AKR1B1	-1,25	-2,38	5,97E-07	5,97E-05
AK123096	-1,26	-2,39	1,04E-05	4,96E-04
CWH43	-1,26	-2,40	1,88E-09	1,14E-06
A_24_P33055	-1,26	-2,40	1,26E-06	1,02E-04
MACC1	-1,26	-2,40	2,40E-09	1,32E-06
BATF3	-1,27	-2,40	6,29E-08	1,08E-05
MARVELD3	-1,27	-2,41	1,34E-08	3,82E-06
SLC7A8	-1,28	-2,43	1,62E-05	7,14E-04
GRHL3	-1,29	-2,44	3,12E-07	3,66E-05
LRRC61	-1,29	-2,44	8,48E-09	2,76E-06
ENST00000425412	-1,29	-2,44	6,12E-07	6,04E-05
LOC100506687	-1,29	-2,44	4,63E-06	2,67E-04
MDFI	-1,29	-2,45	3,61E-07	4,06E-05
OSTalpha	-1,29	-2,45	1,15E-08	3,42E-06
SMPDL3B	-1,30	-2,46	1,54E-03	2,24E-02
B3GALT4	-1,30	-2,47	2,09E-03	2,80E-02
KLHL29	-1,31	-2,47	4,57E-04	9,02E-03
MAPK13	-1,31	-2,47	3,11E-07	3,66E-05
GPR4	-1,31	-2,48	1,39E-08	3,85E-06
TGM2	-1,32	-2,50	8,37E-04	1,43E-02
PCSK9	-1,32	-2,50	5,33E-05	1,77E-03
KCNK5	-1,32	-2,50	2,61E-05	1,03E-03
BTBD11	-1,33	-2,51	2,32E-08	5,41E-06
RASEF	-1,33	-2,51	4,53E-06	2,64E-04
BIK	-1,33	-2,52	7,14E-07	6,71E-05
LSR	-1,35	-2,55	9,05E-06	4,45E-04
PLCG2	-1,35	-2,55	1,30E-06	1,04E-04
A_24_P101742	-1,36	-2,56	5,07E-06	2,86E-04
FAM198B	-1,36	-2,57	3,87E-02	2,15E-01
PTPN3	-1,36	-2,57	2,67E-04	5,99E-03
LOC100509498	-1,37	-2,59	2,64E-05	1,04E-03
KRT7	-1,38	-2,60	3,69E-04	7,63E-03
EPHA1	-1,38	-2,60	2,97E-09	1,43E-06
ERBB3	-1,39	-2,62	3,36E-08	6,84E-06
TFCP2L1	-1,40	-2,63	5,20E-10	7,00E-07
EGFL7	-1,40	-2,64	2,38E-06	1,62E-04
PRR5-ARHGAP8	-1,41	-2,65	2,79E-08	6,06E-06
TNFRSF18	-1,41	-2,66	1,02E-06	8,72E-05
FAM83F	-1,42	-2,67	7,97E-10	9,01E-07
SERTAD4	-1,42	-2,68	1,42E-09	1,04E-06
A_32_P181443	-1,43	-2,69	4,38E-09	1,78E-06
CHDH	-1,43	-2,69	1,29E-08	3,75E-06
A_24_P367100	-1,43	-2,70	6,51E-07	6,31E-05

MGAT4A	-1,43	-2,70	1,61E-03	2,31E-02
ACTG2	-1,44	-2,71	4,39E-05	1,52E-03
C15orf48	-1,44	-2,72	5,78E-05	1,86E-03
A_24_P152845	-1,44	-2,72	5,12E-09	1,89E-06
IRF6	-1,45	-2,73	1,49E-08	4,05E-06
OVOL1	-1,45	-2,73	1,69E-09	1,07E-06
CALB1	-1,46	-2,74	4,37E-04	8,68E-03
COL2A1	-1,46	-2,75	1,24E-06	1,01E-04
TTC39A	-1,46	-2,75	5,61E-06	3,11E-04
GATA2	-1,46	-2,75	3,08E-10	6,60E-07
ITGB2	-1,47	-2,76	6,95E-06	3,66E-04
MCF2L-AS1	-1,47	-2,76	4,83E-10	7,00E-07
VDR	-1,49	-2,80	2,21E-07	2,91E-05
PROM2	-1,49	-2,81	3,84E-09	1,62E-06
CEACAM1	-1,49	-2,82	7,84E-05	2,34E-03
ARHGDI3	-1,50	-2,83	1,00E-03	1,63E-02
SH2D3A	-1,50	-2,83	1,72E-05	7,46E-04
RBP7	-1,50	-2,84	2,15E-06	1,50E-04
THC2668815	-1,50	-2,84	8,05E-08	1,32E-05
B3GNT3	-1,51	-2,84	1,30E-09	1,02E-06
PLAC8	-1,52	-2,87	4,00E-04	8,10E-03
AJ420543	-1,53	-2,89	4,76E-06	2,73E-04
NCF2	-1,53	-2,89	3,18E-03	3,80E-02
PPP1R1B	-1,53	-2,90	2,31E-09	1,30E-06
C11orf52	-1,55	-2,92	9,38E-08	1,49E-05
FUT3	-1,56	-2,95	3,32E-08	6,81E-06
A_23_P64962	-1,56	-2,96	8,63E-10	9,13E-07
S100A9	-1,57	-2,97	5,73E-09	2,10E-06
SPINT1	-1,57	-2,97	4,74E-04	9,30E-03
WSCD1	-1,58	-2,98	9,06E-06	4,45E-04
A_24_P358606	-1,58	-3,00	1,20E-06	9,90E-05
GPR160	-1,59	-3,00	1,37E-06	1,08E-04
BEX1	-1,59	-3,02	4,50E-09	1,78E-06
ENST00000417112	-1,61	-3,05	2,46E-09	1,32E-06
A_23_P21882	-1,61	-3,05	6,83E-09	2,32E-06
RNF125	-1,61	-3,06	8,75E-07	7,86E-05
KLK8	-1,62	-3,06	5,30E-08	9,52E-06
ASS1	-1,62	-3,08	1,33E-06	1,06E-04
METRNL	-1,63	-3,09	8,03E-06	4,08E-04
CRB3	-1,63	-3,10	7,29E-08	1,22E-05
ANKRD22	-1,64	-3,11	3,58E-09	1,57E-06
DAPP1	-1,64	-3,11	3,58E-08	7,16E-06
GPRIN2	-1,65	-3,13	4,80E-10	7,00E-07
SYK	-1,66	-3,16	1,29E-09	1,02E-06
C6orf132	-1,66	-3,16	3,39E-09	1,51E-06
ARHGEF40	-1,68	-3,20	5,99E-05	1,92E-03
TTC22	-1,68	-3,21	3,26E-08	6,73E-06
TP53I11	-1,70	-3,26	5,35E-07	5,49E-05

ITGA1	-1,71	-3,28	3,57E-03	4,15E-02
C1orf116	-1,71	-3,28	2,65E-08	5,89E-06
TM4SF1	-1,74	-3,33	1,12E-03	1,77E-02
A_32_P42895	-1,74	-3,34	6,50E-09	2,27E-06
JAG2	-1,76	-3,39	7,12E-08	1,20E-05
GJB2	-1,78	-3,43	2,02E-08	4,95E-06
A_24_P306814	-1,78	-3,45	6,12E-07	6,04E-05
CRIP1	-1,79	-3,46	1,23E-06	1,01E-04
CGNL1	-1,81	-3,50	2,19E-05	9,05E-04
LTB	-1,81	-3,50	1,93E-03	2,65E-02
AL832534	-1,81	-3,50	1,00E-06	8,61E-05
CEACAM6	-1,81	-3,50	3,62E-09	1,57E-06
MID1IP1	-1,81	-3,51	1,38E-06	1,08E-04
MAP7	-1,84	-3,58	3,79E-06	2,30E-04
SHISA3	-1,85	-3,62	4,50E-02	2,37E-01
TMC6	-1,89	-3,69	1,09E-06	9,23E-05
A_24_P178444	-1,89	-3,70	7,01E-07	6,71E-05
CKMT1A	-1,89	-3,70	2,47E-08	5,69E-06
CCNA1	-1,90	-3,72	6,96E-09	2,33E-06
A_24_P110601	-1,91	-3,76	3,02E-07	3,61E-05
THC2529323	-1,91	-3,76	8,66E-06	4,33E-04
GUCY1A3	-1,92	-3,79	5,49E-05	1,80E-03
KRT4	-1,93	-3,81	3,38E-10	6,80E-07
CCDC64B	-1,94	-3,84	4,83E-09	1,81E-06
S73202	-1,98	-3,93	4,39E-07	4,74E-05
THC2566704	-1,98	-3,94	1,95E-09	1,14E-06
CST6	-2,02	-4,05	1,27E-07	1,91E-05
RNF43	-2,04	-4,10	2,57E-08	5,82E-06
DENND2D	-2,06	-4,16	5,81E-08	1,02E-05
ESRP1	-2,10	-4,30	1,27E-09	1,02E-06
ARHGEF16	-2,11	-4,32	4,39E-07	4,74E-05
SLC44A3	-2,14	-4,40	8,40E-07	7,64E-05
CD24	-2,17	-4,49	4,08E-06	2,43E-04
AP1M2	-2,18	-4,55	1,07E-14	3,45E-10
AIF1L	-2,20	-4,60	6,76E-06	3,61E-04
ST14	-2,21	-4,62	3,64E-08	7,18E-06
EPPK1	-2,22	-4,65	2,60E-09	1,35E-06
FA2H	-2,22	-4,66	5,06E-06	2,86E-04
THC2624264	-2,22	-4,67	3,62E-08	7,18E-06
FAM174B	-2,22	-4,67	3,09E-09	1,44E-06
ACOT11	-2,24	-4,71	2,24E-10	5,57E-07
TSTD1	-2,25	-4,76	2,55E-08	5,81E-06
CLDN7	-2,31	-4,97	1,37E-07	2,01E-05
ATP2C2	-2,33	-5,03	9,49E-10	9,26E-07
EPS8L1	-2,38	-5,19	6,19E-09	2,19E-06
EFEMP1	-2,41	-5,32	7,78E-05	2,33E-03
AKR1B10	-2,44	-5,41	1,26E-08	3,68E-06
A_23_P15226	-2,48	-5,56	5,22E-10	7,00E-07

FXYD3	-2,48	-5,59	1,20E-09	1,02E-06
SLC1A3	-2,49	-5,62	4,19E-11	1,69E-07
THC2548807	-2,50	-5,67	1,69E-09	1,07E-06
MYB	-2,53	-5,78	2,14E-08	5,18E-06
CDH1	-2,54	-5,80	3,49E-06	2,16E-04
TCN1	-2,62	-6,13	7,49E-10	9,01E-07
TNS4	-2,65	-6,28	4,66E-10	7,00E-07
MPZL2	-2,70	-6,50	1,56E-08	4,12E-06
LCN2	-2,72	-6,59	4,24E-07	4,64E-05
TMEM125	-2,72	-6,60	1,84E-07	2,53E-05
GRHL2	-2,78	-6,85	1,27E-09	1,02E-06
BSPRY	-2,78	-6,87	9,33E-10	9,26E-07
IGFBP2	-2,83	-7,13	2,26E-08	5,30E-06
CYP1B1	-2,85	-7,19	1,55E-09	1,06E-06
C1orf172	-3,03	-8,18	1,30E-09	1,02E-06
S100A14	-3,09	-8,53	4,58E-09	1,78E-06
LAD1	-3,10	-8,58	1,23E-10	3,83E-07
OVOL2	-3,15	-8,90	2,25E-10	5,57E-07
PRR15L	-3,19	-9,11	1,08E-06	9,16E-05
TACSTD2	-3,20	-9,20	2,19E-08	5,25E-06
LCP1	-3,38	-10,37	8,34E-08	1,36E-05
EPCAM	-3,42	-10,69	1,48E-06	1,13E-04
GAL	-3,78	-13,75	6,22E-11	2,23E-07

Table SII

List of miRNA which were deregulated in Docetaxel resistant IGR-CaP1 and PC3 cells (FC \geq 1.5)

MiR signature in IGR-CaP1

Hsa-miRID	Fold Change
miR-367	-4,04
miR-200c	-3,16
miR-135a	-3,04
miR-331-5p	-2,82
miR-302a	-2,78
miR-302b	-2,60
miR-494	-2,58
miR-190	-2,43
miR-141	-2,22
hsa-let-7b	-2,11
miR-20a	-2,02
miR-486-3p	-1,84
miR-212	-1,83
miR-221	-1,77
miR-302c	-1,76
miR-210	-1,68
miR-422a	-1,63
miR-361-5p	-1,61
miR-365	-1,56
miR-455-5p	-1,53
miR-20b	-1,53
miR-18a	-1,52
miR-19b	-1,47
miR-652	-1,46
miR-19a	-1,45
miR-101	1,46
miR-532-3p	1,47
miR-484	1,47
miR-106b	1,51
miR-27b	1,51
miR-30c	1,51
miR-500	1,52
miR-28-3p	1,52
miR-345	1,53
miR-185	1,56
miR-425	1,60
miR-339-3p	1,61
miR-23b	1,66
miR-9	1,66
miR-27a	1,67

MiR signature in PC3

Hsa-miRID	Fold Change
miR-200b	-10914,6
miR-203	-227,7
miR-365	-24,3
miR-126	-20,5
miR-135b	-11,7
miR-133a	-11,6
miR-335	-11,1
miR-152	-8,4
miR-148a	-5,6
miR-139-5p	-4,6
miR-301a	-3,1
miR-18a	-2,9
miR-15b	-2,0
miR-590-5p	-1,9
miR-425	-1,9
miR-652	-1,8
miR-93	-1,8
miR-96	-1,8
miR-744	-1,7
miR-339-5p	-1,5
miR-106b	-1,5
miR-138	-1,5
miR-16	1,5
miR-532-3p	1,5
hsa-let-7e	1,6
hsa-let-7d	1,6
miR-125a-5p	1,6
miR-197	1,6
miR-196b	1,7
miR-484	1,7
hsa-let-7f	1,7
miR-128	1,7
miR-362-5p	1,7
miR-26b	1,8
miR-222	1,9
miR-182	2,0
miR-95	2,0
miR-340	2,1
miR-125b	2,1
miR-195	2,1

miR-148a	1,67
miR-191	1,72
miR-195	1,75
miR-501-5p	1,76
miR-342-3p	1,78
miR-362-5p	1,94
miR-574-3p	2,06
miR-660	2,17
miR-449a	2,50
miR-140-3p	2,51
miR-532-5p	2,55
miR-139-5p	2,70
miR-95	2,87
miR-194	2,99
miR-218	3,32
miR-628-5p	3,43
miR-10b	3,96
miR-143	4,27
miR-145	6,34
miR-181a	8,44
miR-31	45,31

miR-574-3p	2,1
miR-374b	2,1
hsa-let-7b	2,2
miR-130a	2,2
miR-181a	2,3
miR-628-5p	2,3
miR-21	2,4
miR-26a	2,4
miR-146b-5p	3,0
miR-320	3,0
miR-31	3,1
miR-132	3,1
miR-218	3,1
miR-625	3,7
miR-210	3,8
miR-494	3,8
miR-140-5p	5,7
miR-491-5p	5,7
miR-361-5p	6,2
miR-455-5p	7,0
miR-146a	8,2
miR-140-3p	13,6
miR-486-5p	77,0

Table SIII

List of the 28 proteins issued of the proteomic analysis which potentially interact with SHISA3 in human prostate cancer cells

ID	Symbol	Entrez Gene Name
Q9NZ32	ACTR10	actin-related protein 10 homolog
Q9H1Y0	ATG5	autophagyrelated 5
Q9Y679	AUP1	ancientubiquitousprotein 1
Q8IWX8	CHERP	calcium homeostasisendoplasmicreticulumprotein
Q2KHT3	CLEC16A	C-type lectin domain family 16, member A
P83436	COG7	component of oligomericgolgi complex 7
Q9UHQ9	CYB5R1	cytochrome b5 reductase 1
O95834	EML2	echinoderm microtubule associatedproteinlike 2
P42566	EPS15	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
Q9Y3B2	EXOSC1	exosome component 1
Q9NPD3	EXOSC4	exosome component 4
P45985	MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4
Q14696	MESDC2	mesodermdevelopment candidate 2
Q9Y2Q9	MRPS28	mitochondrial ribosomal protein S28
Q8TCD5	NT5C	5', 3'-nucleotidase, cytosolic
Q9NX40	OCIAD1	OCIA domaincontaining 1
Q96SU4	OSBPL9	oxysterolbindingprotein-like 9
P07477	PRSS1	protease, serine, 1 (trypsin 1)
Q14108	SCARB2	scavenger receptor class B, member 2
A0PJX4	SHISA3	shisafamilymember 3
Q6P1M0	SLC27A4	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4
P04920	SLC4A2	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 2
Q13445	TMED1	transmembrane emp24 protein transport domaincontaining 1
Q9P0U1	TOMM7	translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog
Q7Z2T5	TRMT1L	tRNAmethyltransferase 1 homolog-like
Q96IX5	USMG5	up-regulated during skeletal muscle growth 5 homolog
Q08AM6	VAC14	Vac14 homolog
Q96I51	WBSCR16	Williams-Beuren syndrome chromosome region 16

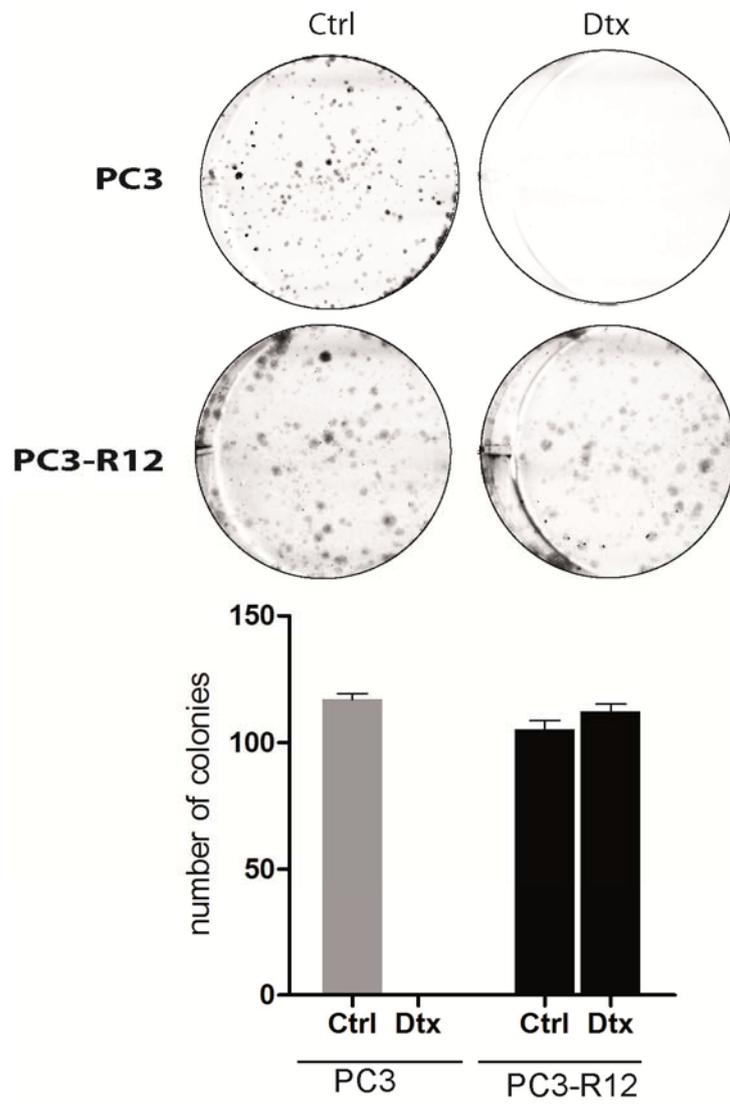


Figure S1

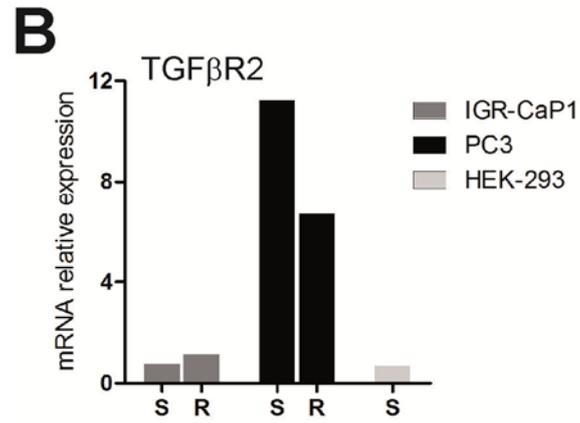
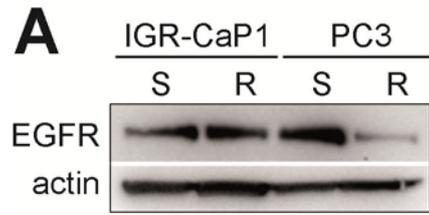


Figure S2

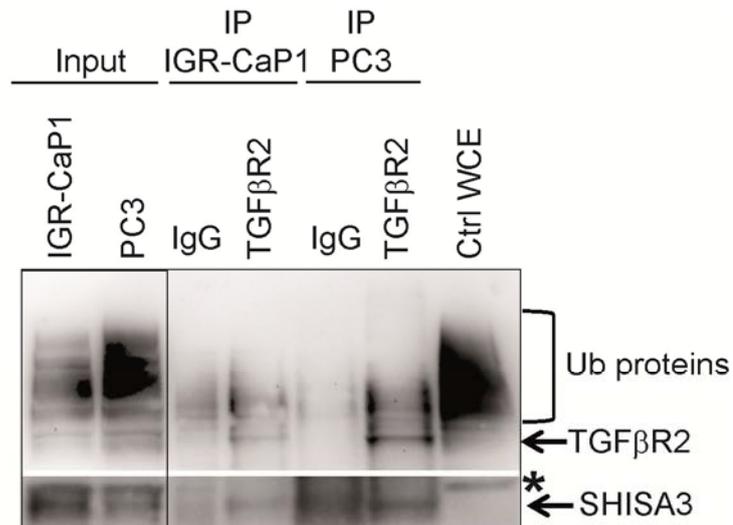


Figure S3