



HAL
open science

Rôle du récepteur des xénobiotiques PXR (Pregnane X Receptor) et de ses gènes cibles sur la sensibilité des lignées de cancer de prostate aux inhibiteurs de kinases

Matthieu Gassiot

► To cite this version:

Matthieu Gassiot. Rôle du récepteur des xénobiotiques PXR (Pregnane X Receptor) et de ses gènes cibles sur la sensibilité des lignées de cancer de prostate aux inhibiteurs de kinases. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT133 . tel-02356082

HAL Id: tel-02356082

<https://theses.hal.science/tel-02356082>

Submitted on 8 Nov 2019

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.

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

En Biologie-Santé

École doctorale CBS2 n°168

Unité de recherche IRCM U1194

Rôle du récepteur des xénobiotiques PXR (*Pregnane X Receptor*) et de ses gènes cibles sur la sensibilité des lignées de cancer de prostate aux inhibiteurs de kinases.

Présentée par Matthieu GASSIOT

Le 28/11/2017

Sous la direction du Pr Alexandre EVRARD
et du Dr Philippe POURQUIER

Devant le jury composé de

Pr.Jacques ROBERT, PU-PH, Institut Bergonié

Dr.Joseph CICCOLINI, MCU-PH, Université Aix-Marseille

Dr.Fabienne THOMAS, MCU-PH, Institut du cancer Toulouse

Dr.Aude FLÉCHON, PH, Centre Léon Bérard

Pr.Alexandre EVRARD, PU-PH, CHU de Nîmes/ Université de Montpellier

Dr.Philippe POURQUIER, DR2, Inserm (U1194)

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des membres du jury.

Au Professeur Jacques Robert, pour avoir accepté la présidence de ce jury. J'espère que vous apprécierez la lecture de ce manuscrit, ainsi que la soutenance. J'espère que vous me permettrez de bénéficier de votre expertise dans le domaine des inhibiteurs de kinase.

Au Docteur Fabienne Thomas, merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci pour vos commentaires et conseils qui m'ont permis d'améliorer mon manuscrit et préparer au mieux ma soutenance.

Au Docteur Joseph Ciccolini, merci d'avoir accepté de juger ce travail et de représenter mes origines au sein de ce jury « Marseille et sa faculté de pharmacie ». Merci pour les précieux commentaires et conseils que vous m'avez prodigué tout au long de ma thèse. Je tiens sincèrement à vous remercier de m'avoir transmis votre passion de la pharmacocinétique durant mes années de pharmacie et j'espère continuer à perpétuer cette passion.

Au Docteur Aude Fléchon, merci d'avoir accepté le déplacement depuis Lyon pour faire partie de ce jury. J'espère pouvoir bénéficier de votre expertise dans le domaine du cancer de la prostate.

À mon directeur de thèse, le Professeur Alexandre Evrard, merci pour ta confiance et l'autonomie que tu m'as permis d'acquérir tout au long de ces 3 années de thèse doctorale. Merci pour tes conseils qui m'ont donné l'assurance nécessaire à ma future vie professionnelle. Un grand merci de m'avoir fait re-découvrir les joies du parapente.

À mon autre directeur de thèse, le Docteur Philippe Pourquoiier (et sa tasse à café), merci pour l'ensemble des discussions scientifiques qui m'ont permis « d'aiguiser » mon esprit critique. Je tiens à te remercier pour le temps que tu m'as accordé durant ces 3 ans et notamment cette dernière année. Je tiens à te remercier particulièrement pour toute l'aide que tu m'as apporté durant la rédaction, qui m'a permis d'aboutir à ce manuscrit. Je ferais tout pour garder en mémoire tes conseils d'écriture et les utiliser au mieux, tout au long de ma carrière.

Je tiens à remercier par ces quelques lignes l'ensemble des personnes qui de près ou de loin m'ont permis de réaliser ce projet.

Au Docteur Litaty Céphanoée Mbatchi qui m'a encadré tout au long de mon stage de master 2 et qui a vu en moi la capacité à réaliser une thèse doctorale. Merci pour ta gentillesse, l'aide que tu m'as apportée et la confiance que tu m'as renouvelée, en m'offrant une place dans tes travaux. Merci de m'avoir permis d'apprendre de nouvelles techniques et de me familiariser à d'autres aspects de la pharmacocinétique à tes côtés. Je te souhaite bon courage et beaucoup de réussite dans ta carrière d'assistant MCU-PH (pour l'instant), même si je ne me fais pas trop de soucis pour toi.

Au Docteur Hanane Agherbi, reconnaissable entre toutes par son timbre de voix calme, son rire mélodieux et son optimisme légendaire... vous y avez cru ? Alors, c'est que vous ne l'avez jamais croisée. Merci pour tout ce que tu m'as appris durant ces 3 ans et pour la confiance en moi que tu as su m'insuffler à grand coup de « cacahuète ». Je te souhaite beaucoup de bonheur avec « nounours », « ta duchesse » et surtout « ton n'enfant » et j'espère que tu retrouveras rapidement un travail dans lequel tu t'épanouiras, pour « le plus grand malheur » de tes futurs collègues (dixit « l'ingrat mi-cacahuète-mi-mérou »).

Au Docteur Céline Gongora, pour m'avoir accepté dans ce groupe de recherche « très féminin », malgré le fait que la population masculine soit en constante augmentation depuis mon arrivée. Je tiens à te remercier sincèrement pour le soutien que tu m'as apporté durant la fin de ma thèse.

Je remercie bien évidemment l'ensemble des membres de cette équipe « très féminine », le Docteur Maguy Del Rio, pour l'écoute et la considération que tu as envers les étudiants et les personnes en général. A Mme Nadia Vié, merci pour ta gentillesse et ton expertise dans le Facs et Celigo. Au Docteur Diego Tosi, merci pour ta gentillesse, ta simplicité et le temps que tu nous as accordé pour nous apprendre à utiliser tes matrices de synergies. Au Professeur Nadine Houédé, merci pour votre gentillesse et votre facilité d'accès lors des « labmeeting ». Je tiens aussi à vous remercier de m'avoir « prêté » Philippe et de lui avoir donné la permission de minuit durant la rédaction de ma thèse. A Lucile, et Marie-Alice, merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur, je vous souhaite bon courage et beaucoup de bonheur dans vos carrières et vies futures. Aux « petits » (ils ne sont pas si petits que ça) étudiants de 1^{er}, 2^e et 3^e, Manda, Leila, Sara, Hadjer et Alice, je vous souhaite bon courage et beaucoup de

réussite dans votre future carrière. Un petit mot supplémentaire à Leila, qui s'est retrouvée en charge du laboratoire, je te souhaite bon courage et ne les lâche surtout pas. Enfin, pour mon apprentie « la petite Alice », je te souhaite de réaliser une belle thèse, car je sais que tu en es capable (ne me fais pas honte). Tu as déjà le gros avantage d'écrire correctement la langue de Molière (tu remercieras ta mère pour ce précieux cadeau), il ne te reste plus qu'à prendre suffisamment confiance en toi pour commencer à défendre tes idées et écrire tes premières « reviews » (on a le titre de la première).

Au Docteur Pierre Martineau, merci pour votre bienveillance, votre bonne humeur et votre enthousiasme. Je me souviendrais de nos discussions passionnées après quelques bières sur tout et rien et de ce moment où j'étais en train d'impressionner une blonde et une brune avec un tour, que vous avez ruiné en quelques instants par votre fichue représentation mentale en 3 dimensions.

Au « martinettes », Déborah, Emilie, Nadège, Cécile et Julie, merci pour les fous rires dans le bureau qui ont grandement détendu l'atmosphère dans les moments de stress. A Déborah « la blonde susceptible de Nice », merci pour tout ce que tu m'as appris dans le domaine capillaire, j'espère que tu finiras par obtenir la couleur de cheveux de tes rêves. A Emilie, merci pour les pauses cafés dont tu étais un des piliers, merci aussi pour les parties de tennis avec ou sans filet et pour tous les gâteaux que tu nous as apporté tout au long de ces 3 années. A Cécile, ma « copine de cochonnaille », merci pour nos « bonjours si particulier » et pour tes obsessions diverses et variées, toujours déplacées mais tellement passionnantes. A Nadège, si particulière, ne serait-ce que par son mobilier ou son tempérament, lui permettant de s'accorder si bien avec Cécile. A Julie, la petite dernière des « martinettes » et surement la plus douce, je te souhaite beaucoup de bonheur avec ton « jojo » et bon courage dans la confection de tes cadeaux de Noël si particuliers. Enfin, merci à Vincent, Laurence et Marion pour les pauses café et les bières partagées tout au long de ces 3 années, ainsi que la découverte du fameux « gâteau au chocolat de Marion ». Je vous souhaite bon courage, à Vincent pour l'arrivée des deux nouveaux « piou-piou », et Laurence pour la finalisation de l'écriture de son HDR

Au Docteur Patrick Balaguer et Mme Marina Grimaldi, merci pour votre aide précieuse, tant au niveau de la technique que d'un point de vue scientifique.

À Mr Abdel Boulahtouf, merci pour ta gentillesse et toute l'aide que tu m'as apporté lors de la transfection et la sélection de mes clones. Je te souhaite bon courage pour le travail qui t'attend avec la thèse d'Hadjer, et j'espère que tu continueras à garder ta jovialité et ta bienveillance.

Au Professeur Serge Lumbroso, merci de m'avoir accueilli au sein de votre service et d'avoir suivi mes recherches tout au long de ces 3 années, en acceptant de participer à mes comités de thèse.

À toute l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Nîmes, aux Docteurs Anne Polge, David De Brauwere, Jean Paul Brouillet et Jean Christophe Boyer, merci pour votre accueil, votre gentillesse et votre intérêt pour mon travail tout au long de ces 3 ans. Je remercie également Nadège, Michel, Ghislaine, Mireille et Marie Christine pour leur accueil, leur bonne humeur et leur expertise technique dont ils m'ont fait bénéficier. Merci à Angélique pour l'aide que tu m'as apporté pour la spectrométrie de masse. Un grand merci aux Docteurs Kevin Mouzat et Serge Carillo pour les nombreuses discussions et conseils (quelques fois farfelus voir étonnants, mais toujours intéressants) que vous m'avez prodigué tout au long de ces 3 ans. À Sarah, ma partenaire de qPCR, merci pour « les batailles de créneaux » aux Light Cycler 480 et ton intérêt (à ta manière) pour mon projet de recherche.

À Mr Jean Yves Cance, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité dont tu fais preuve au quotidien, je te souhaite une belle retraite bien méritée. À Mr Philippe Collet, merci pour ta bonne humeur et tes « trucs et astuces » si particuliers, mais toujours intéressants. À Mme Céline Passet, merci pour ta gentillesse et toute l'aide que tu nous apportes quotidiennement.

À tous mes amis, que ce soit ceux du lycée, de la fac, ou du Festival, Seb, Max, Alex, Brice, Yannick, Marjo, Charlotte, Fanny, Vincent, Manon, Julie, Cédric, Jo, Rachid, Mounir, Mathilde et Thomas. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble durant nos belles années étudiantes. Quand, je pense à nous, trentenaires (presque tous), en couple ou mariés et pour certains parents, et n'ayant quasiment plus que des discussions « de vieux »... elles sont loin nos co.....

Je remercie sincèrement toute ma famille (remplie de médecin) qui m'a soutenu, même quand j'ai fait le choix de faire des études de pharmacie...Tout particulièrement mes parents qui m'ont accompagné tout au long de mes études et soutenu quels que soient mes choix professionnels. À ma sœur « ma petite Attila », qui se destine à un brillant avenir dans le droit, je te souhaite beaucoup de réussite. Enfin, à « Pipite et Momo » qui font aussi partie de la famille, je vous remercie pour toute l'affection et la bienveillance que vous m'avez apportée durant ma jeunesse.

Enfin à Eve, ton caractère si particulier fait de toi une personne tellement spéciale à mes yeux. Tu es la personne la plus passionnée (un peu trop parfois) et la plus chanceuse que je connaisse, grâce à toi n'importe quelle discussion ou petit voyage devient une aventure. Je te remercie de m'avoir soutenu dans les moments compliqués et permis de ne pas craquer. Ces deux dernières années passées ensemble ont été géniales, mais sont allées tellement vite et j'espère sincèrement que nous en passerons encore de nombreuses à travers le monde.

Sommaire

A	CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
I.	Les cancers.....	21
1.	La cancérogenèse	21
1.1	Les chiffres du cancer	23
2.	Le cancer de la prostate	25
2.1	Physiologie de la prostate.....	25
2.2	Les pathologies de la prostate	26
2.3	Epidémiologie du cancer de la prostate.....	27
2.4	Etiologies et mécanismes pathologiques du cancer de la prostate	27
2.5	Diagnostic.....	31
2.6	Prise en charge thérapeutique.....	34
2.6.1	Traitements différés et surveillance active.....	36
2.6.2	Traitements curatifs	36
2.6.3	Traitements palliatifs.	37
2.7	Le cancer de la prostate résistant à la castration	38
II.	Le système de détoxification ADME	43
1.	Les étapes Absorption, Distribution, Métabolisation, Excretion	43
1.1	L'absorption	43
1.2	La distribution	43
1.3	La métabolisation	44
1.4	L'excrétion	44
2.	Les déterminants moléculaires du système ADME	45
2.1	Les protéines d'influx (phase 0).....	45
2.2	Les enzymes de fonctionnalisation (phase I)	45
2.3	Les enzymes de conjugaison (phase II).....	46
2.4	Les protéines d'efflux (phase III).....	47
3.	Variabilité intra/inter individuelle du système ADME	48
4.	Chimiorésistance et système de détoxification	49
4.1	Enzymes de la phase I	51
4.2	Enzymes de la phase II.....	53
4.3	Transporteurs de la phase III.....	54
III.	Les récepteurs nucléaires	57
1.	La superfamille des récepteurs nucléaires (RNs).....	57
2.	Classification et Structure générale des RNs	57
3.	PXR et CAR.....	61
3.1	Structure de PXR.....	62
3.2	Mécanisme d'activation transcriptionnelle de PXR.....	63
3.3	Gènes du système ADME cibles de PXR et/ou CAR	64
3.4	Ligands de l'activité des xénorécepteurs.....	67
3.4.1	Les agonistes des xénorécepteurs	67
3.4.2	Antagonistes de PXR	68
3.5	Rôle de PXR dans le métabolisme des endobiotiques	70
3.6	Régulation de PXR.....	71
3.6.1	Régulation transcriptionnelle	71
3.6.2	Régulation Post-traductionnelle.....	72
3.7	PXR et chimiorésistance	74
IV.	Les Inhibiteurs de Kinases.....	77
1.	Les protéines Kinases.....	77

2.	Pharmacodynamie des Inhibiteurs de Kinases	78
3.	Pharmacocinétique des Inhibiteurs de Kinases	81
4.	Les IKs substrats et inhibiteurs des transporteurs ABC au niveau tumoral	82
B	MATÉRIEL ET MÉTHODES	89
I.	Sélection de gènes du métabolisme et du transport corrélés aux IKs	91
1.	Sélection des inhibiteurs de kinases testés ou en cours d'évaluation clinique dans le cancer de la prostate	91
2.	Sélection des gènes du système ADME via le site PharmGKB.....	91
II.	Expression de PXR dans des coupes de tumeurs de prostate.....	97
1.	Patients et Méthodes.....	97
2.	<i>Tissue MicroArray</i> (TMA).....	97
3.	Immunohistochimie.....	98
III.	Approche In Vitro	99
1.	Les lignées cancéreuses de prostate	99
2.	Conditions de culture	99
3.	Extraction ARN et <i>Reverse Transcription</i>	100
3.1.	Extraction des ARN totaux	100
3.2.	Reverse Transcription	101
4.	PCR quantitative en temps réel (qPCR).....	102
4.1.	Protocole de PCR quantitative.....	104
5.	Extraction des protéines et Western Blotting.....	106
5.1.	Extraction et dosage protéique	106
5.2.	Western Blot.....	106
6.	Tests de cytotoxicité à la sulforhodamine B	108
7.	Etablissement de modèles de sur-expression stable de hPXR	110
7.1.	Mesure de l'expression et de l'activité de PXR dans les clones stables	112
8.	Evaluation de l'effet ligand des inhibiteurs de kinases sur PXR	113
C	RÉSULTATS	115
1.	Mesure de l'expression de PXR dans les tumeurs de prostate	117
2.	Mesure de l'expression des gènes du métabolisme et du transport dans les lignées de cancer de la prostate	121
3.	Effet de la 5-aza-2-déoxycytidine sur l'expression des gènes du métabolisme	123
4.	Evaluation de la fonctionnalité de PXR dans les lignées de cancer de la prostate	125
5.	Effet de l'activation de PXR sur la cytotoxicité des inhibiteurs de kinases dans les lignées de cancer de la prostate	127
6.	Sélection et caractérisation de modèles isogéniques de surexpression stables de PXR	131
7.	Effets de la surexpression de PXR sur la sensibilité de la lignée 22RV1 aux inhibiteurs de kinases	135
8.	Effets du R1881 sur l'activité transcriptionnelle de PXR dans les lignées surexprimant PXR.....	139
9.	Etude de l'effet agoniste potentiel de différents IKs sur PXR.....	141
10.	Effet de la surexpression de PXR sur la sensibilité cellulaire aux associations contenant un inhibiteur de B-RAF.	149
D	DISCUSSION et PERSPECTIVES	151
E	CONCLUSION GÉNÉRALE	161
F	ANNEXES	161
G	BIBLIOGRAPHIE	163

Table des illustrations

Figure 1 : Processus de cancérogenèse.....	21
Figure 2 : Anatomie de l'appareil reproducteur de l'homme.....	25
Figure 3 : Les grades de Gleason et degrés de différenciation de la tumeur.....	32
Figure 4 : Les différents déterminants du métabolisme et du transport présents dans la cellule.	44
Figure 5 : Classification des récepteurs nucléaires en fonction de leur capacité à fixer un ligand.....	59
Figure 6 : Fixation de l'hétérodimère PXR/RXR sur les séquences consensus des « Hormone Responsive Element », suite à l'activation par un ligand.....	64
Figure 7 : Exemple de gènes du système ADME cibles de PXR et CAR.	66
Figure 8 : Rôle de PXR dans l'interaction entre 2 médicaments.	69
Figure 9 : Les différents facteurs responsables de la modulation de l'activité et de l'expression PXR.....	73
Figure 10 : Schéma résumant les conséquences de l'activation de PXR dans les lignées cancéreuses.....	76
Figure 11 : Schéma résumant la complexité des voies métaboliques de l'erlotinib et du pazopanib.	96
Figure 12 : Principe du test de cytotoxicité à la sulforhodamine B.	109
Figure 13 : Représentation schématique de l'approche de « matrices de synergie » utilisée pour la détermination des effets synergiques, additifs ou antagonistes d'une combinaison de différentes concentrations de deux composés.	109
Figure 14 : Principe de la bioluminescence avec un gène rapporteur.....	111
Figure 15 : Expression de PXR selon les différents stades du cancer de la prostate mesurée par immunohistochimie.....	119
Figure 16 : Niveaux d'expression de 16 gènes du métabolisme et du transport et des 2 xénorécepteurs NR1I2 et NR1I3 dans les lignées de cancer de la prostate DU145 (A), PC3 (B), 22RV1 (C) et LNCap (D).	122
Figure 17 : Niveau d'expression des ARNm de NR1I2 et de ses gènes cibles après traitement par 1 ou 2 μ M de 5 aza-2-déoxycytidine (5-AZA) pendant 36h dans la lignée 22RV1 (A) et 48h dans la lignée LnCap (B).....	124
Figure 18 : Niveau d'expression des ARNm des gènes CYP3A4, UGT1A9 et ABCB1 dans les lignées cultivées en milieu classique (SVF) ou contenant une concentration connue d'androgènes (DCC + R1881) et après traitement par 3 μ M de SR12813.	126
Figure 19 : Effet de l'activation de PXR par 3 μ M de SR12813 sur la sensibilité de la lignée LnCap (A), 22RV1 (B) et PC3 (C) à 4 IKs, cultivées en milieu classique (SVF) ou contenant une concentration connue d'androgènes (DCC + R1881).	128
Figure 20 : Caractérisation de la fonctionnalité de PXR dans chacun des clones traités par 3 μ M de SR12813 et évaluée par luminométrie.....	131
Figure 21 : Caractérisation de l'expression et de la fonctionnalité de PXR dans les clones de surexpression stable de PXR (cl10 et cl15) par rapport au clone contrôle (cl3).	133
Figure 22 : Caractérisation de l'expression de la protéine PXR par Western Blot et de son activité par bioluminescence.	134
Figure 23 : Influence de l'expression de PXR sur la sensibilité aux inhibiteurs de kinases dans les clones de surexpression de PXR (cl10 et cl15) par rapport au clone contrôle (cl3).	136
Figure 24 : Niveau d'expression des gènes ABCB1 et CYP3A4 dans le modèle 22RV1hPXR cl15, après traitement par une gamme de concentrations de SR12813.....	137

Figure 25: Niveau d'expression des gènes PXR, CYP3A4 et ABCB1 dans le modèle 22RV1hPXR cl15, après traitement par une gamme de concentrations de R1881.....	140
Figure 26: Mesure de l'effet agoniste de PXR d'un panel d'inhibiteurs de kinases et de l'enzalutamide par rapport au SR12813 dans les modèles de LS-PXR (A), HepG2-PXR (B) et 22RV1hPXR (C).	142
Figure 27 : Niveau d'expression des gènes PXR, CYP3A4 et ABCB1 dans le modèle 22RV1hPXR cl15, après traitement par des concentrations croissantes de vémurafénib.....	144
Figure 28: Niveaux d'expression du gène CYP3A4 dans la lignée 22RV1hPXR cl15, après traitement par des concentrations croissantes de dabrafénib et de SR12813	145
Figure 29: Niveau d'ARN messagers des gènes NR1I2 (A), ABCB1 (B) et CYP3A4 (C) dans le modèle LS-PXR, après traitement par des concentrations croissantes de dabrafénib ou de SR12813.	147
Figure 30 : Effet de la surexpression de PXR sur la sensibilité des cellules 22RV1 aux combinaisons dabrafénib+tramétinib (A) et dabrafénib+cobimétinib (B) évalué par le test de cytotoxicité à la sulforhodamine B.....	150

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de l'incidence et la mortalité des cancers en 2015.....	23
Tableau 2 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer (1980-2012).....	24
Tableau 3 : Incidence et mortalité des trois principaux cancers chez l'homme.....	27
Tableau 4: La classification TNM pour les cancers de la prostate	33
Tableau 5 : La classification d'Amico des cancers de la prostate.....	34
Tableau 6 : Recommandations thérapeutiques.....	35
Tableau 7 : Les différentes hormonothérapie utilisées pour la déprivation androgénique.	38
Tableau 8: Récapitulatif d'essais cliniques majeurs réalisés dans le cancer de la prostate. ...	40
Tableau 9 : Exemples d'agents cytotoxiques substrats des principaux acteurs du système ADME.	50
Tableau 10 : Liste des antagonistes connus de PXR.....	69
Tableau 11 : Classification des inhibiteurs de kinases majoritairement utilisés en cancérologie.	80
Tableau 12 : Profil des inhibiteurs de kinases vis-à-vis des ABC transporteurs ABCB1 et ABCG2.....	84
Tableau 13 : Gènes du métabolisme et du transport des IKs sélectionnés grâce au site PharmGKB.	95
Tableau 14 : Tableau récapitulatif des derniers essais cliniques utilisant les IKs dans le cancer de la prostate.....	92
Tableau 15 : Structure chimique et mode d'action des principaux IKs sélectionnés.	93
Tableau 16 : Mélange réactionnel utilisé pour la <i>Reverse Transcription</i>	101
Tableau 17 : Séquence des amorces de qPCR.	103
Tableau 18 : Mélange réactionnel utilisé pour la PCR quantitative.....	104
Tableau 19 : Protocole d'amplification par qPCR.	104

Liste des abréviations

ABC: ATP Binding Cassette
Abl: Abelson
ACTH : adrénocorticotrophine
ADME : Absorption Distribution Métabolisme Elimination
ADN : Acide désoxyribonucléique
AF: Activation Function
AGP : Alpha-1-acid glycoprotein
AhR: Arylhydroxycarbon receptor
Akt: V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALDH : Aldehyde dehydrogenase
AR: Androgen Receptor
ARE: Androgen Responsive Element
ARN: Acide RiboNucléique
ASAP: Atypical Small Acinar Proliferation
ATP: Adénosine Tri-Phosphate

Bcl2: B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia/lymphoma 2
BPH: Benign Prostatic Hyperplasia
BRCP: breast cancer resistance protein
BRCA1/2: BReast CAncer 1/2
BXR: Benzoate X Receptor

CAR : Constitutive Androstane Receptor
CDA : cytidine déaminase
COMT : catéchol Ométhyltransférase
CREB: C-AMP Response Element-binding protein
CRPC : Castration-Resistant Prostate Cancer
CYP450 : Cytochromes P450

DBD: DNA binding domain
DO: Densité optique
DPD : dyhydropyrimidine déshydrogénase
DR: direct repeat
DRO : Dérivés réactifs de l'oxygène
ENZH2: Enhancer of Zeste Homolg 2
ER: everted repeat
ERG: V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)
ETS: E Twenty-Six
EGF: Facteur de croissance de l'épithélium

FDA: Food and Drug Administration

FOXO1: Forkhead box protein O1

GST: Glutathion-S-transférases

GTP1: Glutathione S-transferase P1

G418: Généticine

HNF1/4: Hepatocyte nuclear factor 1/4 receptor

HRE: Hormone Responsive Elements

HSP: Heat Shock Protein

IC50 : Concentration inhibant 50 % de la croissance

IGH : Institut Génomique Humaine

IR: inverted repeats

ITK: Inhibiteur de tyrosine kinase

IK: Inhibiteur de Kinase

LBD: Ligand Binding Domain

LBP: Ligand binding pocket

LH-RH: Luteinizing Hormone-Releasing Hormone

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MDR: Multi Drug Resistance

miRNA: Non Coding Regulatory RNA

MRP: multidrug resistance protein

MST : Maladie sexuellement transmissible

Myc : V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog

NAT : N-acétyltransférases

NCI: National Cancer Institute

OATP: Organic Anion Transporting Peptides

OCT: Organic Cation Transporters

PBREM : Phenobarbital Responsive Element

P-gp: Glycoprotéine-P

PIA: Proliferative Inflammatory Atrophy

PIN: Prostatic Intraepithelial Neoplasia

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase

PKA/C: Proteine Kinase A et C

PK/PD : Pharmacocinétique/Pharmacodynamie

PSA: Prostatic Specific Antigen

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

PXR: Pregnane X Receptor

RANK-L: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RAR: Retinoic Acid Receptor

RAS: Ras oncogene

Rb1: retinoblastoma 1

RTK : récepteurs tyrosine kinase

RXR : Récepteurs de l'acide rétinoïque

SLC: Solute-linked carrier

SPOP: Speckle-type POZ protein

SULT: sulfotranférases

SXR: Steroid Xenobiotic Receptor

TMPRSS2 : Transmembrane protease serine 2

TNM : Tumeur Adénopathies Métastases

TPMT : Thiopurine méthyltransférase

TP53: Tumor Protein 53

UGT : UDP-glucuronyltransférases

UV : Ultra-Violet

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

XRE : Xénorecepteurs Responsive Element

5-FU : 5-Fluoro-Uracile

Introduction

Malgré l'émergence de nouveaux traitements anticancéreux, et notamment le développement des thérapies dites "ciblées", la grande majorité des patients ayant des cancers métastatiques sont en échec thérapeutique à plus ou moins long terme à cause de résistances aux traitements [1]. L'un des mécanismes impliqués dans cette résistance multifactorielle est très certainement lié au fait que la forme active du médicament n'est plus en concentration suffisante au sein des cellules tumorales pour inhiber sa cible de manière optimale. La concentration intracellulaire (ou nucléaire) du médicament dépend bien sûr de la dose de médicament administré et du mode d'administration, mais également des processus d'Absorption, de Distribution, de Métabolisation, et d'Excrétion (ADME) de ce dernier, qui sont régulés par diverses enzymes de métabolisation et par des transporteurs d'influx ou d'efflux. Ces déterminants jouent un rôle clé dans l'activation ou l'inactivation de nombreuses molécules cytotoxiques et leur expression peut donc influencer la sensibilité des tumeurs aux anticancéreux [2]. Ces phénomènes sont relativement bien décrits pour les chimiothérapies conventionnelles mais relativement peu pour les thérapies ciblées de type inhibiteurs de kinases, notamment pour les plus récentes dont le nombre ne cesse d'augmenter. Pourtant ces médicaments, administrés très souvent par voie orale et de manière quotidienne, subissent un métabolisme intense par ces enzymes et sont fréquemment des substrats des transporteurs d'efflux que ce soit au niveau hépatique ou tumoral [3]. Les gènes du système ADME sont généralement exprimés dans les cellules épithéliales de foie et d'intestin, mais sont aussi exprimés dans des cellules épithéliales cancéreuses, notamment les cancers du sein, du colon et de la prostate [4]. Or, la transcription de beaucoup de ces gènes est sous contrôle du récepteur nucléaire PXR (*Pregnane X Receptor*), codé par le gène *NRI12*. PXR peut être activé par de nombreux ligands d'origine endogène ou exogène comme certains anticancéreux (taxol, vincristine, vinblastine) [5], induisant une cascade de détoxification coordonnée qui conduit en général à la formation de métabolites plus hydrophiles qui sont éliminés par l'organisme. PXR est connu pour jouer un rôle important dans la résistance aux chimiothérapies [4] mais beaucoup moins dans la réponse aux inhibiteurs de kinases. Concernant le cancer de la prostate, une seule étude a rapporté une expression de PXR au niveau des tumeurs de patients mais sans en avoir évalué l'impact sur la réponse aux traitements utilisés dans cette indication (hormonothérapie ou chimiothérapie) [6]. Les différents travaux réalisés se sont surtout focalisés sur l'utilisation de PXR en tant que

marqueur pronostic, mais n'ont pas adressé la question de la corrélation entre l'expression de PXR au niveau tumoral et la réponse aux anticancéreux [7], [8]. Le cancer de la prostate représente chez l'homme un enjeu de santé publique majeur de par son incidence (1^{er} rang) et sa mortalité (4^{ème} rang). Les essais cliniques réalisés avec un certains nombre d'inhibiteurs de kinases dans cette indication ont donné des résultats mitigés, malgré la présence des cibles pharmacologiques de ces thérapies ciblées dans les cellules tumorales [9]. L'une des hypothèses que nous avons émise est que l'absence d'efficacité de ces inhibiteurs était liée, du moins en partie, à un problème d'ordre pharmacocinétique au niveau périphérique et/ou au niveau tumoral. Cette hypothèse repose sur des travaux antérieurs ayant démontré que la résistance aux taxanes comme le docetaxel était associée à une augmentation de son efflux par les transporteurs d'efflux de type ABC transporteurs, notamment ABCB1 directement régulé par PXR [10].

Ce projet de Thèse consiste donc à étudier le rôle de PXR et de ses gènes cibles dans la réponse cellulaire à divers inhibiteurs de kinases dans des modèles de cancers de prostate et à rechercher une corrélation entre l'expression de ces gènes et la résistance à ces agents. Nous nous sommes également intéressés à la possibilité que ces inhibiteurs de kinases puissent également jouer le rôle d'agoniste de PXR et activer ce xénorécepteur, avec pour conséquence une augmentation de leur propre métabolisme ou de celui de médicaments co-administrés ce qui revêt un intérêt particulier dans la mesure où ces inhibiteurs sont rarement utilisés seuls. Dans ce contexte, l'objectif de notre travail visait également à apporter un rationnel biologique pour prédire les associations les plus efficaces entre inhibiteur de kinases ou entre un inhibiteur de kinase et les hormonothérapies ou les chimiothérapies utilisées dans le traitement du cancer de la prostate et orienter le choix de ces associations dans les essais futurs.

Rôle du récepteur des xénobiotiques PXR (*Pregnane X Receptor*) et de ses gènes cibles sur la sensibilité des lignées de cancer de prostate aux inhibiteurs de kinases

A CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les cancers

1. La cancérogenèse

Le mot cancer regroupe un ensemble de tumeurs qui se développent dans à peu près tous les tissus de l'organisme. C'est une prolifération incontrôlée de cellules dont l'organisme ne peut plus réguler la croissance normale. Chaque tumeur possède, en fonction de sa localisation dans l'organisme, des caractéristiques bien spécifiques ce qui fait que l'on parle toujours de cancers au pluriel [11].

Les cancers sont classés en 4 grandes familles, selon le type de cellule, de tissu ou de l'organe concernés initialement ; i) les carcinomes qui sont les plus fréquents (plus de 85 %) et concernent les tissus épithéliaux (ii) les sarcomes, beaucoup plus rares (moins de 1 %) qui concernent les tissus conjonctifs de soutien (les os, la graisse ou les muscles) (iii) les lymphomes qui sont des cancers du tissu hématopoïétique (iv) les leucémies qui concernent les tissus de la moelle osseuse responsables de la production des globules blancs [12].

Le développement d'une tumeur maligne à partir d'une cellule normale s'étale généralement sur une longue période de notre vie. Cette transformation est le résultat de mutations qui vont progressivement déréguler les systèmes complexes de l'homéostasie cellulaire (**Fig. 1**) [11] [13].7

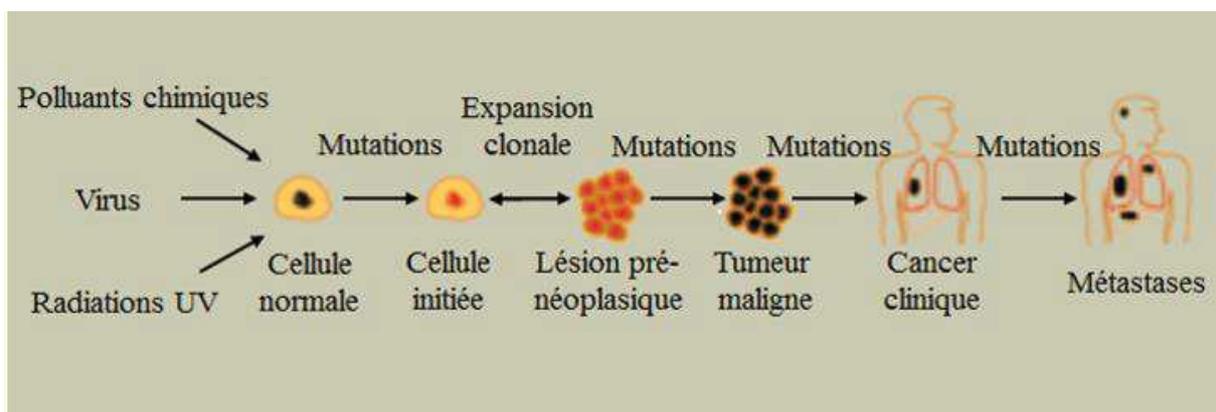


Figure 1 : Processus de cancérogenèse (d'après mécanisme du développement tumoral 2003-iarc)

Les altérations concernent principalement l'ADN qui est constamment soumis à des agressions d'origine endogènes (erreurs de réplication, dommages oxydatifs, etc...) ou exogènes surtout liées aux risques environnementaux (radiations UV, polluants chimiques, virus, bactéries,...). Ces agressions peuvent induire des mutations qui, si elles ne sont pas ou mal réparées, conduisent à l'activation d'oncogènes ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs à l'origine d'une perte progressive de la différenciation et d'une dérégulation de la prolifération cellulaire[14] [15]. Ainsi, les cellules altérées présentent une croissance incontrôlée et perdent leurs capacités d'interaction, leur permettant d'envahir les tissus environnants et disséminer par voie sanguine ou lymphatique, pour former des métastases sur les organes distants [16].

Cependant, il peut arriver qu'une mutation atteigne et dérégule les gènes du système de contrôle et de réparation de l'ADN. La mutation des gènes primordiaux qui comptent des gènes suppresseurs de tumeur, des oncogènes (proto-oncogènes à l'état normal) et des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, conduit à une instabilité génétique et phénotypique. Ainsi, la cellule acquiert un avantage sélectif lié à la persistance d'une altération génétique non réparée qui lui permettra de faire émerger un premier clone de cellules anormales (*Mécanisme du développement tumoral 2003-iarc*). La croissance tumorale qui en découle sera due, d'une part à l'incapacité des cellules tumorales à contrôler la division cellulaire par le phénomène d'apoptose et d'autre part à la formation d'un système vasculaire spécifique par le processus d'angiogenèse (*Mécanisme du développement tumoral 2003-iarc*).

1.1 Les chiffres du cancer

En 2015, le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine est estimé à 384 442 : 210 882 chez l'homme et 173 560 chez la femme. Le nombre de décès par cancer est estimé à 149 456 : 84 041 chez l'homme et 65 415 chez la femme. Le cancer du poumon reste le cancer le plus mortel chez l'homme avec 20 990 décès estimés devant le cancer colorectal et le cancer de la prostate. Chez la femme, le cancer le plus mortel est celui du sein avec 11 913 décès devant le cancer du poumon et le cancer colorectal (**Tableau 1**)[17]

Incidence et mortalité chez l'homme et la femme pour différents types de cancer en 2015		
Localisations	Incidence	Mortalité
	Effectif	Effectif
Prostate	53 913	8 713
Sein	54 062	11 913
Poumon	45 222	30 555
Colon-Rectum	43 068	17 833
Mélanome	14 325	1 773
Rein	13 282	4 493
Vessie	12 305	4 961
Pancréas	11 662	-
ORL	11 610	3 027
Thyroïde	10 100	358
Foie	9 628	-
Utérus	8 151	1 092
Estomac	6 585	4 362
Cerveau	5 427	3 232
Ovaire	4 575	3 132
Œsophage	4 550	3 319
Larynx	3 095	1 135
Col de l'utérus	2 797	2 179
Testicule	2 300	80
Tout cancers	384 442	149 456

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de l'incidence et la mortalité des cancers en 2015 [17]

L'évolution des cancers en France au cours des dernières années est très hétérogène : entre 1980 et 2005, chez l'homme le taux d'incidence des cancers, standardisé à la population mondiale a augmenté passant de 283,5 à 396,1 cas pour 100 000 hommes. Idem chez la femme dont le taux d'incidence est passé durant cette période de 176,4 à 251,2 cas pour 100 000 femmes. En revanche entre 2005 et 2012 le taux a diminué chez l'homme passant à 362,6 cas pour 100 000 hommes alors que chez la femme il a poursuivi une augmentation légère en passant à 252 cas pour 100 000 femmes. Les principaux cancers responsables de l'augmentation de l'incidence sont le cancer de la prostate pour l'homme et le cancer du sein pour la femme. En revanche durant la période 1980 à 2012, le taux de mortalité par cancer, tout âge et toutes localisations confondus a diminué chez l'homme (moins 38%) comme chez la femme (moins 27%) (**Tableau 2**).[17]

		Hommes	Femmes
Incidence	Mortalité	Localisations	Localisations
↘	↘	Lèvre-Bouche-Pharynx-Larynx	Estomac
		Œsophage	Col de l'utérus
		Estomac	Ovaire
		Vessie	Rein
		Poumon	Vessie
↘	→	Maladie de Hodgkin	
→	↘	Côlon-rectum	Utérus-Côlon Rectum
↗	→ ou ↘	Prostate	Sein
		Rein	Thyroïde
		SNC	Lèvre-Bouche-Pharynx-Larynx
		Lymphome Malin Non Hodgkien	Œsophage
		Testicules	Lymphome Malin Non Hodgkien
		Thyroïde	SNC
			Myélome multiple
	Mélanome cutané		
		Maladie de Hodgkin	
↗	↗	Mélanome cutané	Poumon
		Myélome multiple	Pancréas
		Pancréas	

Tableau 2 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer (1980-2012) [17]

2. Le cancer de la prostate

2.1 Physiologie de la prostate

La prostate est une petite glande de quelques centimètres produisant le liquide prostatique entrant dans la composition du sperme (**Fig. 2**).

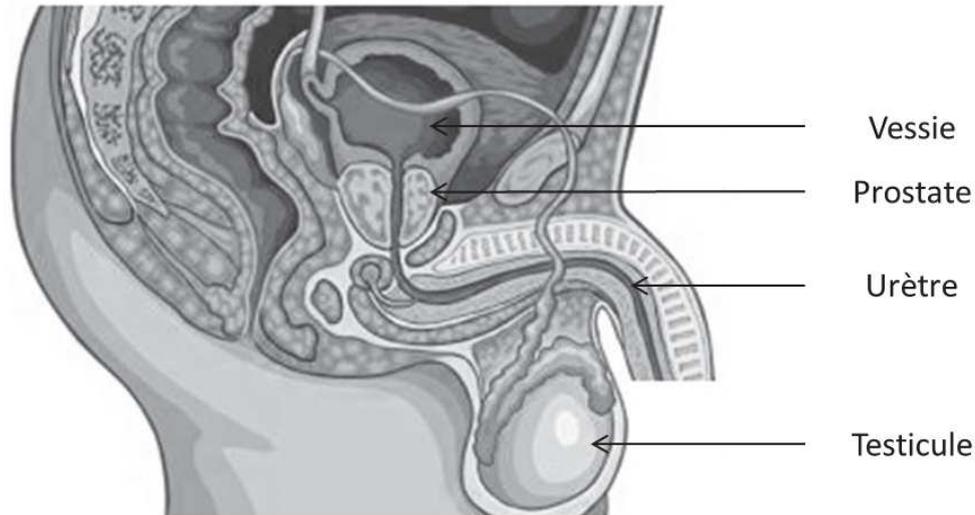


Figure 2 : Anatomie de l'appareil reproducteur de l'homme (d'après *Ligue contre le Cancer*)

Elle est entourée d'une capsule qui la sépare du reste des autres organes du pelvis et se divise en 3 zones :[18]

- Une zone périphérique dans laquelle survient la majorité des tumeurs malignes de la prostate (environs 70 %).
- Une zone de transition située au milieu de la prostate en avant des zones périphériques et centrales qui augmente en taille avec l'âge, causant ce qu'on appelle l'hypertrophie bénigne de la prostate qui est observée chez presque tous les hommes de plus de 70 ans. Elle est le siège de 15 à 20% des cancers de la prostate.
- Une zone centrale entourant les canaux éjaculateurs dans laquelle ne se développe que peu de cancers (environ 10-15%) [19].

2.2 Les pathologies de la prostate

La prostate peut être le siège de trois pathologies différentes qui peuvent néanmoins avoir des symptômes similaires, un diagnostic différentiel devra être réalisé avant toute décision thérapeutique (*HAS 2012*).

- La prostatite : c'est une infection ou une inflammation aigüe de la prostate qui peut devenir chronique et dont l'étiologie la plus fréquente est bactérienne. Cette infection est responsable de troubles génito-urinaires pouvant être gênants, voir invalidants et qui altèrent la qualité de vie (douleurs lors d'activité physique ou sexuelle et difficultés à rester assis). On estime qu'elle est à l'origine de 2 millions de consultations chaque année en France, tout âge confondu, avec une prédominance entre 30 et 50 ans. La prostatite n'augmente pas le risque de développer un cancer de la prostate (*HAS 2012*) [12].
- L'hypertrophie bénigne de la prostate (BPH) : c'est une affection qui se caractérise par une hypertrophie de la zone de transition se développant généralement à partir de 30 ans. C'est une affection à évolution lente qui comprime l'urètre et peut entraîner des troubles urinaires mais qui n'augmente pas le risque de développer un cancer de la prostate (*HAS 2012*) [12].
- Le cancer de la prostate : il s'agit dans 95 % des cas d'un adénocarcinome dont le développement est sous la dépendance des androgènes (*HAS 2012*) [12].

2.3 Epidémiologie du cancer de la prostate

En France, 53 913 nouveaux cas de cancer de prostate ont été diagnostiqués chez l'homme en 2015 et environ 8 893 hommes en seraient décédés (**Tableau 3**). L'incidence de ce cancer est très faible avant 50 ans, puis augmente nettement avec l'âge, près de 66 % des cancers de la prostate survenant après 65 ans [20]. En France, c'est le principal cancer chez l'homme devant le cancer du poumon et le cancer colorectal. Par contre, il ne représente que la 3^e cause de mortalité par cancer derrière le cancer du poumon et le cancer colorectal.

Incidence et mortalité chez l'homme pour les 3 principaux cancers en 2015		
Localisations	Incidence	Mortalité
	Effectif	Effectif
Prostate	53 913	8 893
Poumon	30 401	20 990
Colon-Rectum	23 535	9 337

Tableau 3 : Incidence et mortalité des trois principaux cancers chez l'homme [20].

2.4 Etiologies et mécanismes pathologiques du cancer de la prostate

De nombreux facteurs de risques ont été décrits pour le cancer de la prostate. Ils incluent l'âge, l'origine ethnique, les prédispositions génétiques familiales, ainsi qu'un certain nombre de facteurs liés au mode de vie comme l'alimentation, l'exposition à divers polluants (pesticides ou toxiques), ou l'activité sexuelle pouvant être à l'origine de MST de types virales (*Herpes simplex virus 2* et les Papillomavirus 16 et 18) ou bactériennes (*Nesseria Gonorrhoea*, *Trepanoma pallidum*, *Chlamydia Trachomatis*) [21].

Ces différents déterminants sont à l'origine de lésions précurseurs du cancer de la prostate, la *Proliferative Inflammatory Atrophy* (PIA), l'*Atypical Small Acinar Proliferation* (ASAP) et une lésion intermédiaire entre les 2 premières et le cancer, la *Prostatic Intraepithelial Neoplasia* (PIN). [22], [23].

Ces lésions vont subir de nombreuses altérations permettant leurs progressions vers le cancer de la prostate, soit directement, soit indirectement via le stade PIN [24].

-La progression du stade PIA au stade PIN est notamment caractérisée par une prolifération cellulaire anormale associée à une diminution de l'apoptose par surexpression de bcl-2 et à une dérégulation de la voie de signalisation du récepteur des androgènes (AR) [24].

Une diminution de l'activité *Glutathione S-transferase P1* (GSTP1) responsable de la protection de l'ADN face aux agressions des radicaux libres a également été notée lors de cette transition.[25], [26].

- L'évolution vers le stade cancéreux localisé est caractérisée par une dérégulation des voies de signalisation et de différenciation cellulaire. Cette dérégulation est liée à différents facteurs comme :

- La perte des gènes suppresseurs de tumeurs, notamment la *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN) qui entraîne l'activation de la voie *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI3K) ; voie dérégulée dans 30% des cancers de prostate primaires et 60% des cancers résistants à la castration [27]. L'activation aberrante de la voie PI3K/AKT/mTOR a été décrite comme l'une des voies majeures responsables de la progression du cancer de la prostate vers la forme résistante à la castration androgénique. En effet, il a été décrit que la perte de PTEN et l'activation de la voie PI3K, sont à l'origine d'une diminution de l'expression et de l'activité du récepteur androgénique [27]. De plus, la ré-expression de PTEN et l'inhibition de la PI3K restaurent l'activité du récepteur androgénique et entraîne une diminution de l'expression et l'activité d'EGR1 et c-JUN, deux facteurs de transcription communément sur-exprimés dans les formes résistantes à la castration et impliqués dans la prolifération tumorale androgéno-indépendante [28], [29]. L'altération de deux autres gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, comme RB (*Retinoblastoma protein*) ou dans le contrôle de la réparation de l'ADN comme TP53 sont également retrouvés mutés dans 25 à 45% des tumeurs de prostate [30]–[32].

- La découverte d'une fusion récurrente entre le gène *TMPRSS2* (*Transmembrane protease serine 2*) et les gènes codant des facteurs de transcription de la famille des ETS (E26.....), en particulier les gènes ERG, ETV1 et ETV4, a permis de réaliser une avancée majeure dans la compréhension du mécanisme oncogénique des cancers de prostate [33]. En effet, les fusions *TMPRSS2-ERG*, *ETV1* ou *ETV4* sont retrouvées dans plus de la moitié des échantillons tumoraux analysés, ce qui fait de ces cancers une catégorie bien identifiée du point de vue moléculaire. Ces remaniements sont d'ailleurs souvent associés à la perte PTEN ou à la surexpression d'AR.

- Plus récemment, des mutations récurrentes du gène *Speckle-type POZ protein* (SPOP) ont été identifiés dans 6 à 13% des cancers de la prostate localisés [34], [35]. SPOP code une protéine de reconnaissance du substrat de *E3-ubiquitin ligase*, et ses mutations sont associées à une dérégulation des voies de signalisation [36].

- Même si elles sont beaucoup plus rares, des mutations activatrices d'oncogènes, comme Ras ou Raf ont été retrouvées et sont probablement associées à l'activation la voie de signalisation des MAP Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). L'activation de cette voie de signalisation permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes [37].

La progression de la forme localisée à la forme métastatique a été principalement associée à la perte d'expression des *E-cadherin*, glycoprotéines transmembranaires responsables des interactions cellules-cellules [38]. Elle peut également être liée à l'augmentation d'expression de certains miRNA, comme le miR-75 impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire ou du miR-153 impliqué dans la répression de PTEN [39]–[42]. La surexpression du gène EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolg 2*) qui joue un rôle dans la régulation de l'état de la chromatine a également été décrite dans les formes métastatiques les plus agressives du cancer de la prostate [43]. EZH2 est capable d'activer AR indépendamment des androgènes ce qui en fait un bon candidat responsable de la prolifération des formes les plus avancées de la maladie [44].

La croissance des cellules prostatiques, qu'elles soient normales ou cancéreuses, dépend de la présence d'androgènes comme la testostérone (T) et son métabolite la dihydrotestostérone (DHT), qui se fixent au récepteur des androgènes. La fixation des ligands sur AR, stimule son activité de facteur de transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose [45]. Ce récepteur nucléaire, lorsqu'il est inactif, est localisé dans le cytoplasme couplé à des protéines chaperonnes appelées *Heat Shock Protein* (HSP) dont le rôle est d'empêcher la dégradation du récepteur. Une fois activé par un androgène, AR se dimérise et peut se transloquer dans le noyau et se fixer sur des sites spécifiques au niveau de l'ADN appelés *Androgen Responsive Element* (ARE) pour jouer son rôle de facteur de transcription [46].

Initialement, la plupart des cancers de prostate sont dépendants des androgènes. Cependant, au cours de l'évolution de la maladie ou du traitement, ils peuvent devenir androgéno-indépendants et sont alors appelés cancers résistants à la castration ou CRPC (*Castration Resistant Prostate Cancers*) [47]. Cette dénomination résulte de la résistance de la tumeur à l'hormonothérapie par l'activation de diverses autres voies de signalisations afin de maintenir actif le récepteur androgénique.

Des études ont montré que l'amplification d'AR est suffisante pour conférer une résistance des cellules à l'hormonothérapie. Certaines résistances peuvent être également liées à des mutations du récepteur, à l'expression de variants d'épissages dépourvus de domaine de liaison aux androgènes, ou à une sécrétion d'androgènes par les glandes surrénales ou par les cellules tumorales elles-mêmes, une dérégulation des co-facteurs d'AR, ou encore une altération de différentes voies de signalisation conduisant à la surexpression du récepteur aux androgènes[48]–[50]. Ces voies sont activées par des récepteurs de facteurs de croissance non-hormonaux (VEGF, EGF, FGF, IGF, TGF,...) ou des cytokines comme les interleukines, notamment IL-6. L'activation qui découle des voies MAPK, Akt et JAK est responsable de la phosphorylation d'AR essentielle à son activité transcriptionnelle sur ses différents gènes cibles [51], [52]. Ces différentes voies de signalisation permettent l'activation des voies de signalisation androgénique, y compris lorsque la production d'androgène est bloquée par castration centrale.

2.5 Diagnostic

Le cancer de la prostate est un cancer à développement lent et asymptomatique, c'est pourquoi il est rarement diagnostiqué avant 50 ans mais plus autour de 70 ans. Ce diagnostic tardif sur des personnes souvent âgés ayant une espérance de vie d'au moins 10 ans font qu'ils décèdent la plupart du temps avec et non à cause du cancer (en 2009, la survie nette à 10 ans était de 70 %) [53]. En revanche, dans les formes évoluées il peut être à l'origine de différents symptômes, comme des troubles urinaires et de l'érection. Outre la présence de symptômes spécifiques, le diagnostic d'un cancer de la prostate repose sur un certain nombre d'examen, notamment le toucher rectal évaluant une anomalie structurale de la glande prostatique (volume, forme, consistance) et la mesure du taux de PSA (*Prostate Specific Antigen*) sérique. A l'état basal, les concentrations de PSA retrouvées dans l'organisme sont inférieures à 4 ng/ml. Lorsque ce taux devient supérieur et surtout qu'il augmente au cours du temps (classiquement entre deux mesures réalisées à 3 mois d'intervalle), il peut signaler la présence d'une évolution cancéreuse. Cependant, il arrive que des taux de PSA élevés ne soient que transitoires, reflétant soit une réaction inflammatoire (prostatite), une hyperplasie bénigne (adénome de la prostate), ou une activité physique ou sexuelle récente [54], [55]. C'est pourquoi, le dosage systématique du PSA n'est pas recommandé. En cas de suspicion, d'autres examens sont réalisés, notamment une biopsie de la prostate.

Cette biopsie permet d'effectuer une analyse anatomopathologique de la tumeur et d'évaluer le caractère de différenciation des cellules tumorales selon le grade de Gleason. Initialement, il existait cinq grades allant d'un tissu bien différencié (grade 1) à un tissu très indifférencié (grade 5) (**Fig. 3**), le grade le plus élevé étant généralement associé à un cancer agressif et de mauvais pronostic.[56] Etant donné l'hétérogénéité des tumeurs de prostate, plusieurs grades sont souvent observés au sein d'un même échantillon, ce qui a conduit à utiliser plutôt le score de Gleason (somme des deux grades les plus représentés dans la tumeur) pour mieux caractériser la tumeur. Aujourd'hui, seuls les grades 3, 4, et 5 sont utilisés et deux grands groupes de tumeurs sont distingués, les tumeurs de bas grade avec un score de Gleason de 3 + 4 et les tumeurs de haut grade ayant un score supérieur à 4 + 3 (**Fig. 3**). Aujourd'hui, l'évaluation du grade est réalisée selon le score ISUP établi de manière consensuelle en 2014 par l'*International Society of Urological Pathology*. Ce système clarifie certains aspects morphologiques et donne une définition plus précise du grade 4 et recommande une classification en 5 grades ISUP (de 1 à 5) correspondants respectivement aux scores de Gleason ≤ 6 , 3+4=7, 4+3=7, 8, et 9-10 [57].

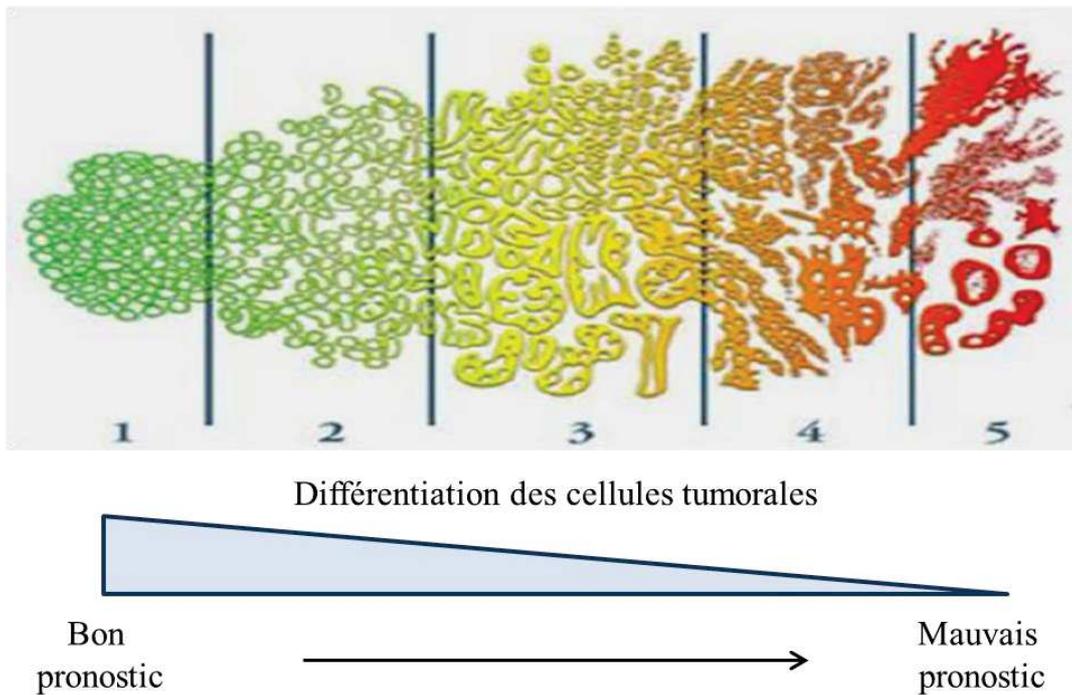


Figure 3 : Les grades de Gleason et degrés de différenciation de la tumeur [12], [56].

Si la biopsie révèle la présence de cellules cancéreuses, un bilan d'extension pourra être réalisé, pour évaluer l'étendu de la maladie chez les patients les plus à risque (degré d'envahissement local, ganglionnaire, présence de métastases à distance), et orienter la décision thérapeutique.

En dehors du score ISUP, la classification TNM est également utilisée pour apporter des précisions sur la taille de la tumeur, l'atteinte ou non ganglionnaire, ou la présence ou non de métastases. Cette classification a permis de déterminer 4 stades différents de cancer de la prostate (**Tableau 4**):

- le cancer de prostate localisé,
- le cancer localement avancé qui s'étend aux organes adjacents,
- le cancer de la prostate avec atteinte ganglionnaire pelvienne,
- le cancer métastatique (*HAS 2012*).

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

Tableau 4: La classification TNM pour les cancers de la prostate [12].

Cette classification est divisée en 2 catégories, la Ctnm qui s'appuie sur les données pré-thérapeutiques (biopsie, PSA,..) pour le choix du traitement et la Ptnm qui utilise des renseignements supplémentaires tels que l'histopathologie de la pièce opératoire, ou le geste chirurgical (HAS 2012).

Une autre classification dite d'Amico est également utilisée afin d'évaluer le risque de récurrence des tumeurs localisées à 10 ans après traitement local (**Tableau 5**).

	Faible risque (a)	Risque intermédiaire	Haut risque (b)
Stade clinique	< T2a	T2b	T2c – T3c
Score de Gleason	< 6	7	> 7
PSA sérique (ng/ml)	< 10	> 10 ou < 20	> 20

Tableau 5 : La classification d'Amico des cancers de la prostate_(HAS 2012).

- a. Un faible risque implique la totalité des critères
- b. Un seul critère présent suffit pour considérer comme élevé

2.6 Prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique est définie en accord avec le patient et tient compte des données cliniques (âge du patient, état général, pathologies associées, traitements existants, etc...) et des différentes classifications de la tumeur. De manière générale, les conduites thérapeutiques deviennent de plus en plus codifiées et sont sans cesse remises à jour en fonction des avancées thérapeutiques. Le **Tableau 6** détaille les stratégies de prise en charge définies par l'HAS en 2012 en fonction de ces différents paramètres.

Stade non Métastatique	
Tumeur localisée à faible risque*	<p>Traitement immédiat :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Prostatectomie (+/- curage ganglionnaire) -Ou Curiethérapie -Ou Radiothérapie externe <p>Traitement différé à discuter dans des situations particulières (**):</p> <p>« surveillance active » ou « abstention de surveillance clinique »</p>
Tumeur localisée à risque intermédiaire*	<p>Traitement immédiat :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Prostatectomie (curage ganglionnaire recommandé) - Ou radiothérapie externe **: <ul style="list-style-type: none"> - en monothérapie avec une augmentation de la dose (radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité guidée par imagerie) - ou en association à une hormonothérapie (< 6 mois), et sans augmentation de dose - Exceptionnellement, une curiethérapie peut être discutée <p>Traitement différé à discuter dans des situations particulières (**): « abstention de surveillance clinique »</p>
Tumeur localisée à haut risque*	<ul style="list-style-type: none"> -Radiothérapie externe (***) en association à une hormonothérapie prolongée (2-3 ans) -Ou prostatectomie totale (curage ganglionnaire recommandé)
Tumeur localement avancée (stade T3b-T4)	<ul style="list-style-type: none"> - Radiothérapie externe (***) en association à une hormonothérapie prolongée (2-3 ans)
Stade Métastatique	
Atteinte ganglionnaire (N+) ou à distance (M+)	<p>-Hormonothérapie :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une radiothérapie pelvi-prostatique complémentaire peut être discutée dans le sous-groupe des tumeurs N+ - Une chimiothérapie peut être proposée en cas de résistance à la castration

Tableau 6 : Recommandations thérapeutiques_(HAS 2012).

(*) Risque est apprécié selon la classification d'Amico ; (**) Tumeur asymptomatique ;

(***) En cas de radiothérapie, un curage ganglionnaire peut être discuté selon les facteurs pronostiques associés et l'impact thérapeutique attendu

2.6.1 Traitements différés et surveillance active

Le cancer de la prostate est un cancer à évolution lente, un traitement curatif n'est donc pas toujours nécessaire. Lors du diagnostic, si le patient est asymptomatique et que la tumeur a un faible risque évolutif, la discussion de différer le traitement peut être posée en fonction de l'espérance de vie et l'état général du patient, ainsi que les effets indésirables potentiels des traitements (*HAS 2012*). Si la décision de différer le traitement est prise, une surveillance active sera mise en place. Elle comporte un examen clinique, un dosage du PSA total tous les 6 mois et une biopsie à un an puis tous les 2-3 ans. Cela permettra de suivre l'évolution du cancer et initier le traitement au moment le plus adapté (*HAS 2012*).

2.6.2 Traitements curatifs

Le traitement à visée curative du cancer de la prostate permet en théorie d'éliminer toutes cellules cancéreuses de manière agressive. Cela peut être réalisé par prostatectomie qui est un acte chirurgical pouvant être effectué par voie ouverte ou laparoscopie. Elle est indiquée en cas de cancer de prostate localisé à risque élevé ou localement avancé. Cela reste un acte délicat qui permet d'enlever entièrement ou partiellement la prostate. Si elle est totale, le dosage PSA total doit être nul ou indétectable (*HAS 2012*). Une autre possibilité est la radiothérapie qui permet l'irradiation des cellules cancéreuses de prostate. Elle est utilisée en remplacement de la prostatectomie totale quand celle-ci est contre-indiquée, ou en association avec l'hormonothérapie dans le cancer de la prostate à haut risque et localement avancé (*HAS 2012*). La curiethérapie est une méthode alternative permettant une irradiation localisée continue et qui repose sur l'implantation de grains d'iode radioactif au sein même des foyers cancéreux. C'est une technique qui présente moins d'inconvénients pour le patient (une seule hospitalisation contre des dizaines pour la radiothérapie) et qui permet de sauvegarder les organes environnants (*HAS 2012*).

2.6.3 Traitements palliatifs.

L'hormonothérapie par déprivation androgénique est le traitement palliatif de référence dans le cancer de prostate avec atteinte ganglionnaire pelvienne et du cancer de la prostate métastatique. Elle peut aussi être associée à la radiothérapie externe dans le cadre de cancer de prostate localisée à haut risque ou localement avancé. La déprivation androgénique a pour but d'inhiber la production d'hormones circulantes (testostérone et dihydrotestostérone) produites au niveau testiculaire (*HAS 2012*). Elle peut être réalisée par castration physique, ce qui consiste à enlever les tissus des testicules qui sécrètent la testostérone. On parlera de pulpectomie lorsque seulement la pulpe des testicules est enlevée ou d'orchiectomie si tout le testicule est enlevé. Ce type de castration est néanmoins devenu rare. En revanche, la castration chimique est utilisée en routine. Elle peut être réalisée par des analogues de LH-RH ou oestrogènes de synthèse qui inhibent la sécrétion de testostérone au niveau hypothalamique (*HAS 2012*). Des inhibiteurs de la 5 α -réductase peuvent aussi être utilisés afin de bloquer la production de la forme active de la testostérone. Des anti-androgènes de type stéroïdiens ou non stéroïdiens ont également été utilisés afin de bloquer par compétition au niveau des sites de liaisons du récepteur aux androgènes, l'action activatrice de la testostérone sur les voies de signalisation hormonale des cellules tumorales (**Tableau 7**) (*HAS 2012*).

Cependant, à plus ou moins long terme, toutes les tumeurs de prostate deviendront résistantes à ces traitements, entraînant une reprise de la progression tumorale et du développement métastatique. A ce stade, le cancer est alors appelé cancer de prostate métastatique résistant à la castration ou mCRPC (*metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer*).

Classe	Médicament	Mécanisme d'action
Agonistes LH-RH	Leuproréline, Triptoréline, Goséréline, Buséréline	Inhibent la sécrétion par l'hypophyse de LH.
Antagonistes LH-RH	Abarélix, Dégalérix	Inhibent les récepteurs de la LH-RH.
Anti-Androgènes stéroïdiens	Cyprotérone, Mégestrol	Antagoniste du récepteur aux androgènes.
Anti-Androgènes non stéroïdiens	Flutamide, Nilutamide, Bicalutamide	Antagoniste du récepteur aux androgènes.
Inhibiteur 5- α -reductase	Finastéride, Benzoquinoline	Inhibent la conversion de la Testostérone en DHT.
Inhibiteur CYP17	Abiraterone	Inhibe la synthèse de Testostérone.

Tableau 7 : Les différentes hormonothérapie utilisées pour la déprivation androgénique [12].

2.7 Le cancer de la prostate résistant à la castration

La prise en charge des cancers de prostate résistants à la castration est actuellement en pleine évolution avec l'arrivée de nouvelles classes thérapeutiques.

Depuis 2004, le docétaxel est la molécule de chimiothérapie recommandée en première ligne du traitement des mCRPC en remplacement de la mitoxantrone qui fût la première chimiothérapie proposée à ce type de patients [58]. Néanmoins, comme pour les premières hormonothérapies, des mécanismes de résistance aux taxanes permettent aux cellules tumorales de résister à ces agents cytotoxiques, ce qui se traduit par une reprise de la progression tumorale.

Dans ce contexte, de nombreux essais cliniques ont été réalisés avec un grand nombre de molécules de classes thérapeutiques différentes (**Tableau 8**).

Agents anti-cancéreux	Cibles	Développement clinique dans le cancer de la prostate
Agents ciblant l'activité du récepteur androgénique		
Acétate d'abiratéronne	Enzyme CYP17	Approuvé en 2011*
Enzalutamide	Récepteur des Androgènes	Approuvé en 2012*
Ortéronel	Enzyme CYP17	Phase III
Taxanes		
Docétaxel	Tubuline	Approuvé en 2004*
Cabazitaxel	Tubuline	Approuvé en 2010*
Agents ciblant les métastases osseuses et leur environnement		
Dénosumab	RANK-L	Approuvé en 2010*
Alpharadin	Calcium	Approuvé en 2013*
Atrasentan	Antagoniste de l'endothéline A	Phase II
Zibotentan	Antagoniste de l'endothéline A	Phase III
Immunothérapies et Immunomodulateurs		
Sipuleucel-T	anti-PAP	Approuvé en 2010*
Trémélimumab	anti-CTLA-4	Phase II
Nivolumab	anti-PD-1	Phase II
Pembrolizumab	anti-PD-1	Phase II
Avélumab	anti-PDL-1	Phase II
Durvalumab	anti-PDL-1	Phase II
Cétuximab	HER1	Phase II
Atézolizumab	anti-PDL-1	Phase III
Thalidomide	cellules NK; IL-6; TNF α ; VEGF	Phase III
Lénalidomide	VEGF; bFGF; IL-8; TNF α	Phase III
Bévacizumab	VEGF	Phase III
Prostvac	anti-PSA	Phase III
Ipilimumab	anti-CTLA-4	Phase III
Aflibercept	VEGF	Phase III

Tableau 8a: Récapitulatif d'essais cliniques majeurs réalisés dans le cancer de la prostate (d'après [9] et *clinical trial.gov*).

Inhibiteurs de Kinases	Cibles	Développement clinique dans le cancer de la prostate
Inhibiteurs de l'angiogenèse		
Orantinib	VEGFR2; PDGFR	Phase I
Axitinib	VEGFR1,2,3	Phase II
Sorafénib	VEGFR2 et 3	Phase II
Cédiranib	VEGFR2	Phase II
Vatalanib	VEGFR2; c-KIT	Phase II
Sémamaxinib	VEGFR2	Phase II
Sunitinib	VEGFR1 et 2	Phase III
Pazopanib	VEGFR; PDGFR; c-KIT	Phase III
Inhibiteurs des récepteurs des facteurs de croissance		
Géfitinib	HER1	Phase II
Erlotinib	HER1	Phase II
Lapatinib	HER1 et 2	Phase II
Afatinib	HER1,2,3,4	Phase II
Imatinib	PDGFR; c-KIT	Phase II
Dasatinib	PDGFR; c-KIT	Phase III
Inhibiteurs des voies de signalisation situées en aval des récepteurs des facteurs de croissance		
Tramétinib	MEK	Phase II
LY3023414	PI3K + mTOR	Phase II
Pexidartinib	c-KIT; CSF-1R; Flet3	Phase II
Crizotinib	ALK; c-MET	Phase II
Buparlisib	PI3K	Phase II
MKM 2206	AKT	Phase II
Dabrafénib	BRAF	Phase II
Vémurafénib	BRAF	Phase II
Cabozantinib	c-MET; VEGFR2	Phase III
Inhibiteurs du cycle cellulaire		
SGI-1776	PIM	Phase I
Palbociclib	CDK4 et 6	Phase II
Alvocidib	CDK9	Phase II
Alisertinib	Aurora A	Phase II
Inhibiteurs de la réparation de l'ADN		
CC-115	DNA-PK + mTOR	Phase I
Olaparib	PARP	Phase III

Tableau 8b: Récapitulatif des essais cliniques réalisés avec les IKs dans le cancer de la prostate (d'après [9] et *clinical trial.gov*).

(*) : Date d'approbation par la FDA

Parmi ces multiples essais quelques molécules ont montrées un effet suffisamment significatif pour obtenir une autorisation de mise sur le marché par la FDA dans cette indication:

-L'acétate d'abiratéronne est une thérapie ciblée qui inhibe le cytochrome P450 (CYP17), enzyme clé du métabolisme des androgènes, oestrogènes et des glucocorticoïdes. Son inhibition entraîne une diminution du taux d'androgènes circulants dans le cancer de la prostate [59]. En 2011, la FDA approuve l'utilisation de l'acétate d'abiratéronne en association avec la prednisone dans le traitement des CRPC déjà traité par le docétaxel. Puis en 2013, l'acétate d'abiratéronne associé à la prednisone est approuvée en première ligne [60].

-L'enzalutamide est le premier représentant de la nouvelle génération des anti-androgènes. C'est un antagoniste pur du récepteur des androgènes qui inhibe ses fonctions de facteur de transcription [61]. Il reçoit l'approbation de la FDA en traitement post-chimiothérapeutique de CRPC après deux études de phase III (PREVAIL et AFFIRM), dont les résultats montrent une diminution de la progression tumorale, ainsi qu'une amélioration de la survie globale et de la qualité de vie [62], [63].

-Le cabazitaxel est un nouveau membre de la famille des taxanes qui a reçu en 2010 l'approbation de la FDA pour le traitement du CRPC résistant au docétaxel [57]. Le mécanisme d'action du cabazitaxel est globalement le même que celui du docétaxel mais diffère par sa faible affinité pour la glycoprotéine-P (P-gp) ou ABCB1, un transporteur de la famille ABC codé par le gène MDR1 (*Multi Drug Resistance*). La surexpression d'ABCB1 dans les cellules cancéreuses est responsable en grande partie de leurs résistances au docétaxel. Cette faible affinité du cabazitaxel pour ABCB1 a montré un effet significatif sur des lignées résistantes au docétaxel, mais aussi une amélioration de la survie globale de patients atteints d'un CRPC résistant au docétaxel[10].

-Le denosumab est un anticorps monoclonal humain qui inhibe l'activité des ostéoclastes en se liant sur RANK-L, protéine essentielle pour la formation, la fonction, et la survie des ostéoclastes. Il a reçu l'approbation de la FDA en 2010, pour le traitement des métastases osseuses pouvant être due à différentes tumeurs solides, dont le cancer de la prostate [65].

-Le spileucel-T est le premier vaccin approuvé dans le traitement des CPRC asymptomatiques ou faiblement symptomatiques. Son mécanisme d'action repose sur la ré-administration des cellules du système immunitaire du patient qui sont préalablement immunisées aux antigènes retrouvés sur les cellules tumorales [66], [67]. Néanmoins, il reste encore peu utilisé en grande partie du fait de son coût très élevé.

Parmi les autres classes thérapeutiques testées, peu d'améliorations notables de la survie ont été notées, y compris pour les inhibiteurs de tyrosine kinases malgré quelques réponses encourageantes et des résultats parfois spectaculaires dans d'autres tumeurs solides. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que les cibles de ces inhibiteurs sont présentes dans les cancers de prostate et qu'elles sont pour beaucoup dérégulées [24]. L'une des hypothèses que nous avançons est que l'absence d'efficacité des IKs dans ces essais soit liée à un problème d'ordre métabolique au niveau périphérique et/ou au niveau tumoral. En effet, une étude descriptive réalisée sur des tissus prostatiques cancéreux et sains a mis en évidence une expression significative de cytochromes et pompes à efflux, ainsi que le récepteur nucléaire PXR qui les contrôlent [68], suggérant que le cancer de la prostate serait métaboliquement compétent.

II. Le système de détoxification ADME

Le système ADME regroupe différentes étapes du devenir du médicament qui sont, l'absorption, la distribution, la métabolisation, et l'excrétion (**Fig. 4**).

1. Les étapes Absorption, Distribution, Métabolisation, Excretion

1.1 L'absorption

Cette étape représente le passage d'un composé dans la circulation sanguine générale après avoir franchi une barrière biologique et subit les effets de premier passage hépatique et intestinal. Plusieurs paramètres relatifs au médicament, comme sa galénique ou ses propriétés physico-chimiques (pK_A , solubilité, $\log(P)$, etc.) pourront influencer les différents mécanismes responsables de cette étape :

- la diffusion passive au travers des membranes cellulaires ;
- la diffusion facilitée grâce à des transporteurs membranaires de la famille des SLC ;
- le passage paracellulaire au niveau des jonctions serrées ;
- le transport actif [69].

Le paramètre pharmacocinétique qui lui est associé est la biodisponibilité.

1.2 La distribution

Cette étape correspond à la distribution du médicament dans l'ensemble de l'organisme par la circulation sanguine. La distribution au sein d'un organe sera spécifique de chaque médicament, en fonction de la vascularisation de l'organe et des propriétés physico-chimiques de la molécule. Les propriétés du médicament pourront lui conférer un tropisme particulier pour certains organes et influenceront sur son niveau de fixation aux protéines plasmatiques [69].

Le paramètre pharmacocinétique qui lui est associé est le volume de distribution.

1.3 La métabolisation

La majorité des xénobiotiques qui est absorbée par l'organisme subit une série d'étapes de détoxification, appelées réactions métaboliques. Ces réactions facilitent le plus souvent l'élimination de nombreux composés exogènes. Dans certains cas comme celui des pro-drogues, leur métabolisation rend les molécules actives et capables d'exercer un effet pharmacologique ou toxique. Les principales enzymes de métabolisation sont les enzymes de phase I, qui vont fonctionnaliser la molécule, puis les enzymes de phase II qui conjugueront les molécules fonctionnalisées avec des substrats endogènes (glutathion, acide glucuronique,...). Les principaux sites de biotransformation sont les hépatocytes qui contiennent la plus grande majorité d'enzymes de phase I et de phase II, puis l'épithélium intestinal, le poumon et le rein [69].

1.4 L'excrétion

Cette étape permettra d'éliminer la majorité des composés exogènes ou endogènes sous forme inchangée ou métabolisée par voie urinaire ou biliaire. Le site d'élimination dépendra des propriétés physico-chimiques des composés. Ils seront efflués hors des cellules par des transporteurs de la phase III, (i) pour rejoindre la circulation sanguine et être éliminés par la fonction rénale, (ii) pour rejoindre la bile, puis la lumière intestinale et être éliminés par voie fécale [69].

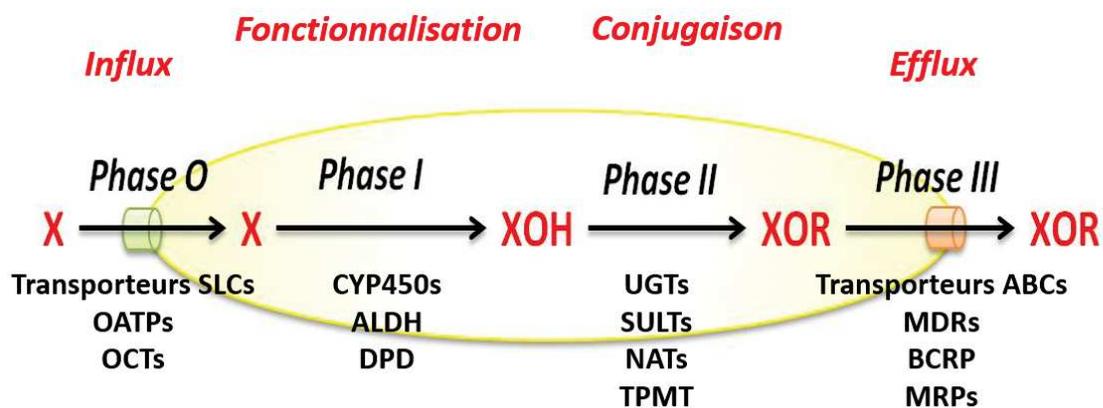


Figure 4 : Les différents déterminants du métabolisme et du transport présents dans la cellule.

2. Les déterminants moléculaires du système ADME

2.1 Les protéines d'influx (phase 0)

Les protéines de la phase 0 sont des transporteurs membranaires permettant une diffusion facilitée d'endobiotiques et de xénobiotiques vers l'intérieur de la cellule et dans le sens du gradient de concentration, il s'agit d'un mécanisme énergie-indépendant. La famille des gènes *SLC* sont une des plus grandes familles de transporteurs membranaires, qui codent pour deux classes de transporteurs différents selon la nature des composés transportés [70]:

- les OATP (*Organic Anion Transporting Peptides*), transporteurs d'anions organiques
- les OCT (*Organic Cation Transporters*), transporteurs de cations organiques

Ces transporteurs sont principalement localisés au niveau des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal, hépatiques, rénales, mais aussi au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Ils sont responsables du transport membranaire de nombreux composés endogènes comme les acides aminés, les sucres, les acides gras et les neurotransmetteurs, et aussi de la prise en charge de nombreux xénobiotiques comme la plupart des médicaments [71].

2.2 Les enzymes de fonctionnalisation (phase I)

Les enzymes de phase I permettent la fonctionnalisation et la polarisation des molécules par des réactions d'oxydoréduction et d'hydrolyse. Les enzymes de phase I principalement étudiées sont les Cytochromes P450 (CYP450) car ils interviennent dans la détoxification de plus de 75% des médicaments [72]. La classification des cytochromes P450 se définit par le numéro de famille puis par sous famille et par isoforme. Pour chaque isoforme, différents allèles sont définis en fonction de la présence de polymorphismes sur la séquence d'ADN [69].

Il existe 3 familles de cytochrome P450 impliquées dans la métabolisation des médicaments:

-La famille 1 qui regroupe les sous familles 1A et 1B et qui est impliqué dans la métabolisation de nombreux agent anti-cancéreux comme le CYP1A1 avec l'erlotinib [73],

-La famille 2 qui représente le plus grand nombre de cytochromes, et qui sont impliqués dans un tiers des réactions de phase I,

-Enfin la famille 3 qui ne représente qu'une seule sous-famille et 3 isoformes. Cependant, elle présente le cytochrome le plus abondant dans le foie et l'intestin et le plus

impliqué dans les réactions de phase I, le CYP3A4. Les 2 autres isoformes sont le CYP3A5 qui est plus exprimé chez les africains (55%) que chez les caucasiens (10-20%), et le CYP3A7 [74].

Généralement une même réaction de métabolisation n'est pas due à un seul CYP450 mais à la résultante de l'activation de différents CYP450, car leur spécificité pour les substrats n'est pas absolue : c'est la redondance des voies métaboliques [75].

D'autres enzymes de phase I ont également été décrites comme ayant un rôle dans la métabolisation des médicaments :

- les hydrolases (carboxylestérase, époxyde hydrolase),
- les oxydoréductases, comme l'ALDH dont l'isoforme 1A détoxifie l'ifosfamide, le métabolite actif du cyclophosphamide [76],
- la cytidine déaminase (CDA) et la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), qui présentent un intérêt particulier pour les chimiothérapies 5-Fluoro-Uracile (5FU), gemcitabine et cytarabine[77], [78].

2.3 Les enzymes de conjugaison (phase II)

Après la phase I, les molécules polaires ou devenues polaires permettront aux enzymes de la phase II qui sont des transférases, d'y conjuguer des substrats endogènes (glutathion, acide glucuronique) ou des groupements chimiques spécifiques (sulfate, méthyle, acétyle) [79].

On trouve parmi ces enzymes de conjugaison :

- La famille des méthyltransférases comme la catéchol O-méthyltransférase (COMT) ou la Thiopurine méthyltransférase (TPMT),
- la famille des glutathion-S-transférases (GST), contient 5 sous familles, α , μ , π , θ , ζ , dont 3 polymorphismes (GST π -1, GST θ -1, GST μ -1) ont été décrits comme inactivant l'enzyme [73],
- la famille des N-acétyltransférases (NAT),
- la famille des sulfotranférases (SULT),
- Enfin, la famille des UDP-glucuronyltransférases (UGT) qui est impliquée dans la majorité des réactions de conjugaison des médicaments. Les UGT sont divisées en quatre sous familles :

-la famille 1A (UGT1A) qui comprend 9 isoformes (UGT1A1 à UGT1A10) toutes issues de l'épissage alternatif du même gène à part l'*UGT1A2* qui est un pseudogène [80].

-la famille 2 (UGT2A et UGT2B) glucuronide les composés aromatiques polycycliques et de stéroïdes [80];

-la famille 3 (UGT3) et la famille 8 (UGT8) dont le rôle est encore inconnu [80].

2.4 Les protéines d'efflux (phase III)

Les protéines d'efflux sont regroupées dans la super-famille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) qui sont des protéines transmembranaires permettant d'expulser hors de la cellule de nombreux xénobiotiques et endobiotiques contre le gradient de concentration, selon un mécanisme énergie-dépendant. A ce jour, la famille des ABC transporteurs humains contient 49 membres qui ont été classés en 7 sous familles de A à G selon une analyse phylogénétique [81]. Ces transporteurs sont exprimés dans de nombreux tissus sains où ils ont un rôle dans les phénomènes de réabsorption et d'excrétion biliaire et rénale. Ils sont également retrouvés surexprimés dans les tumeurs où ils sont responsables de résistance intrinsèque ou acquise aux cytotoxiques [82]. Les membres les plus importants de cette famille sont ABCB1/Pgp, ABCC1/MRP1 et ABCG2/BCRP qui sont majoritairement responsables de la résistance pléiotropique (*multi-drug resistance*). Leur localisation dans l'organisme est assez différente, en effet ABCB1 se situe majoritairement au pôle apical de la membrane des entérocytes de l'intestin et des hépatocytes, au niveau proximal des tubules rénales et dans les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique et la barrière testiculaire. Sa large poche peu spécifique lui permet d'interagir avec plus de 200 composés différents comme des anti-cancéreux, des antibiotiques, des inhibiteurs de protéases, des neuroleptiques ou encore des peptides ou lipides toxiques [83]–[85], pouvant être classés comme des substrats ou modulateurs de la P-gp [86]. Les substrats sont des composés directement transportés par la P-gp comme les anthracyclines, ou les vinca-alcaloïdes [87], alors que les modulateurs de la P-gp sont des composés qui se lient à celle-ci et bloquent son activité comme le vérapamil et la cyclosporine. [88], [89]. ABCG2 est localisé de la même manière que la P-gp au niveau apical des membranes épithéliales et endothéliales du petit intestin, du cerveau, du foie et de la prostate, jouant lui aussi un rôle important dans la protection de l'organisme, en effluant de nombreux substrats chargés positivement et négativement, comme les antiviraux, les inhibiteurs des HMG-Coa reductase, les toxines, les

anticancéreux, etc... [90]. En revanche, ABCC1 étant plutôt localisé au niveau baso-latéral des cellules polarisées, son action est souvent associée à ABCB1 lui permettant l'efflux de composés chargés négativement comme la calcéine, des antibiotiques, des composés glucuronidés ou sulfatés, etc... [91].

3. Variabilité intra/inter individuelle du système de détoxification

Les sources de variabilité inter ou intra-individuelle du système ADME peuvent être d'origine environnementale, physiologique ou génétique.

Les xénobiotiques environnementaux peuvent directement influencer le système ADME en induisant ou en inhibant certaines enzymes de ce système soit directement soit indirectement par l'activation des récepteurs PXR, CAR ou AhR, et être à l'origine d'interactions médicamenteuses. Ils peuvent également entrer en compétition avec les différentes enzymes de phase 0, I, II, ou III. Par exemple, l'alcool et le tabac sont connus pour être des substances inductrices du cytochrome CYP1A1 [92] et le millepertuis dont le principe actif est l'hyperforine est un puissant inducteur de PXR, en plus de ses propriétés anti-dépressives [93].

L'état physiopathologique du patient est aussi une source importante de variabilité du système ADME. L'activité de ce système devient mature à partir de l'âge de 3 ans et diminue au cours de la vie de l'individu, ce qui explique que les doses d'un médicament administrées à un enfant soient différentes de celles d'un adulte ou d'une personne âgée. La grossesse impacte également sur le système ADME, en augmentant son activité, ce qui nécessite d'adapter les posologies [94]. Certains états physiopathologiques comme l'insuffisance hépatique ou rénale peuvent être à l'origine d'une diminution de la métabolisation et de l'élimination d'un médicament, et nécessitent également une adaptation de doses pour éviter l'apparition d'évènements indésirables.

4. Chimiorésistance et système de détoxification

Malgré les progrès de la médecine dans le développement de nouvelles molécules anticancéreuses, plus de 90% des patients ayant des cancers métastatiques sont en échec thérapeutique à plus ou moins long terme à cause de résistances aux traitements, dont les mécanismes sont multiples et dépendent souvent du mode d'action du médicament administré [1].

Ces mécanismes sont classés en trois grandes catégories : (i) les mécanismes en amont de la cible, liés au transport et/ou au métabolisme du médicament (ii) les mécanismes impliquant la cible du médicament elle-même (altérations qualitative et/ou quantitatives de la cible) et (iii) les mécanismes en aval de la cible qui incluent tous les processus liés à la signalisation cellulaire induite par l'inhibition de la cible, ces deux dernières catégories de mécanismes ne seront pas détaillées ici et ont fait l'objet de nombreuses revues [95].

L'un des premiers obstacles à surmonter pour qu'un médicament anticancéreux puisse toucher sa cible est d'être transporté depuis son site d'absorption jusqu'aux cellules tumorales et d'y pénétrer à des concentrations suffisantes pour exercer son effet thérapeutique. Il faut également que ce médicament soit sous forme active au moment de toucher sa cible et ne soit pas métabolisé trop tôt en sa forme inactive. C'est dans ce contexte que les enzymes du système ADME ont largement été impliquées dans la résistance à de multiples agents cytotoxiques utilisés en cancérologie, dans la mesure où beaucoup de ces agents sont des substrats des enzymes de phase I, II ou III comme le montre le **Tableau 9** [2], [96]–[98]. Toute altération de l'expression et/ou de l'activité de ces enzymes peut donc influencer la réponse tumorale à ces agents, ce qui a largement été décrit pour les pompes d'efflux comme ABCB1, ABCC1 ou ABCG2 dont la surexpression est associée à une diminution de la concentration intracellulaire des médicaments [99], mais beaucoup moins pour les enzymes impliquées dans l'inactivation des médicaments par le système de détoxification [100]. Or ces enzymes pourraient avoir un rôle essentiel dans l'activité antitumorale et dans la toxicité de la plupart des agents anticancéreux (**Tableau 9**).

Enzymes de Phase I	Agents cytotoxiques substrats
CYP1A1	Tamoxifène; Torémifène; Flutamide ; Imatinib
CYP1A2	Tamoxifène; Torémifène; Flutamide
CYP1B1	Tegafur; Docétaxel
CYP2B6	Cyclophosphamide; Ifosfamide; Tamoxifène
CYP2C8	Cyclophosphamide; Ifosfamide; Tegafur; Paclitaxel
CYP2C9	Tamoxifène; Torémifène; Imatinib; Cyclophosphamide; Ifosfamide
CYP2C19	Cyclophosphamide; Ifosfamide; Thalidomide
CYP3A4/5	Paclitaxel; docétaxel; étoposide; ténoposide, irinotécan; Topotécan; Géfitinib; Imatinib; Erlotinib;...
Enzymes de Phase I non CYP450	
DPD	FU
Enzymes de Phase II	
UGTs	Irinotécan; Topotécan; Doxorubicine ; Sorafenib
GST	Chlorambucil; Méphalan; Ifosfamide; Cyclophosphamide
Transporteurs de Phase III	
P-gp	Doxorubicine; Daunorubicine; Paclitaxel; Docétaxel; Vincristine; Vinblastine; Etoposide; Tenoposide
MRP1	Doxorubicine; Epirubicine; Etoposide; Vincristine; Méthotrexate; Camptothécine; chlorambucile
MRP2	Anthracycline; vinca-alcaloïde; Etoposide; Méthotrexate; Camptothécine; cisplatine
MRP3	Etoposide; Ténoposide; Méthotrexate
BCRP	Doxorubicine; Daunorubicine; Mitoxantrone; Epirubicine; Topotécan; Irinotécan; Méthotrexate; Flavopéridol

Tableau 9 : Exemples d'agents cytotoxiques substrats des principaux acteurs du système ADME [73].

4.1 Enzymes de la phase I

De nombreuses enzymes de la phase I sont responsables de la métabolisation d'anticancéreux, notamment les cytochromes P450 qui comportent différentes familles. La famille CYP1 contient notamment CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 qui ont été largement étudiés en raison de leurs niveaux d'expression dans de nombreux cancers et de leurs capacités à métaboliser de nombreux médicaments et pro-carcinogènes [98], [101]–[103]. Le CYP1A1 a été impliqué dans la métabolisation des anti-oestrogènes, comme le tamoxifène et le torémifène en 4OH-tamoxifène, un métabolite plus puissant que les molécules mères [104]. Le CYP1B1 est connu pour son expression qui augmente lors de la tumorigénération des tissus, et pour sa responsabilité dans la métabolisation de nombreux pro-carcinogènes comme les benzopyrènes ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques [96], [105]–[106]. Sa surexpression dans des lignées ovariennes de hamsters chinois est associée à une diminution de la sensibilité de ces cellules au docétaxel, sensibilité qui peut être restaurée par un traitement avec un inhibiteur du CYP1B1, l'alpha-naphthaflavone [107].

Les CYP2 est une large famille, comprenant différentes sous familles, 2A, 2B, 2C, 2D et 2E [73]. Cependant, dans le contexte du métabolisme intra-tumoral, la majorité des études se sont surtout focalisées sur les sous familles, 2B, 2C et 2D. Dans la sous famille, CYP2B, le CYP2B6 responsable de la 4-hydroxylation du cyclophosphamide en ifosfamide, est probablement le plus étudié au niveau tumoral [108]. La sous famille 2C est responsable de la métabolisation d'environ 20% des traitements utilisés, incluant de nombreux cytotoxiques. Le CYP2C8 est notamment décrit comme métabolisant le paclitaxel en 6-alpha-hydroxy paclitaxel. Le CYP2C9 et 2C19 sont responsables, dans une moindre mesure que le CYP2B6, de la métabolisation du cyclophosphamide en ifosfamide [73]. Enfin, la sous famille CYP2D est représentée principalement par le CYP2D6, car il est responsable de la métabolisation du tamoxifène en sa molécule active, l'endoxifène. Les dernières études se sont surtout focalisées sur l'identification de polymorphismes pouvant moduler l'expression ou l'activité du CYP2D6, ayant pour conséquence une variation de l'efficacité thérapeutique [109]. L'évaluation de l'activité de l'enzyme chez les patients avant de les traiter par le tamoxifène est de plus en plus discuté [110]–[111].

La famille des CYP3 est représentée principalement par le CYP3A4 qui est probablement le plus étudié car il métabolise environ 55% des médicaments utilisés [96], [112]. Ce cytochrome pourrait être utilisé comme un marqueur de réponse clinique à certains agents cytotoxiques comme les taxanes qu'ils inactivent [113]. En effet, une étude réalisée sur

23 patients atteints du cancer du sein, a pu démontrer une meilleure réponse du docétaxel chez les patients ayant des niveaux d'expression faibles d'ARN du CYP3A4 [114]. Une autre étude réalisée sur des échantillons microsomaux de cancer colorectal a montré que l'expression et l'activité du CYP3A4 sont responsables d'une diminution de la concentration en paclitaxel, via sa métabolisation en un métabolite inactif, le 3-hydroxy paclitaxel. Les auteurs en ont conclu que l'inactivation du paclitaxel par le CYP3A4 pourrait être un marqueur de résistance tumorale [101].

La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) est une autre protéine faisant partie des enzymes de la phase I. C'est une enzyme clé du catabolisme du 5-fluoro uracile (5-FU), molécule de référence utilisée dans les chimiothérapies de cancers gastro-intestinaux, de la tête, du cou et du sein. Dans ces cancers, le niveau d'expression et l'activité de la DPD sont des marqueurs de résistance à cet antimétabolite [116]–[118]. En mesurant le niveau d'expression de DPD, de thymidylate synthase (TS) et thymidine phosphorylase (TP) chez 33 patients atteints d'un cancer colorectal et traités par 5-FU, une étude a démontré que le niveau d'expression de la DPD (mais aussi de TS et TP) était corrélé à la réponse à ce traitement et les patients ayant un faible niveau d'expression présentaient une survie significativement plus longue [119]. Depuis, cette étude de 2000, les connaissances sur la DPD se sont grandement enrichies, notamment sur les causes génétiques pouvant moduler son activité. L'identification de plusieurs variants alléliques (notamment le DPYD*2A) responsables de l'inactivation de ce gène, ont été corrélés à de fortes toxicités avec le 5-FU [120]. Cependant, « *l'European Society for Medical Oncology* »(ESMO) ne recommande qu'une recherche optionnelle du déficit en DPD, plutôt que systématique.

4.2 Enzymes de la phase II

Parmi les différentes enzymes de la phase II, les deux plus étudiées dans le métabolisme intra-tumoral sont les glutathion-S-transférases (GST) et les UDP-glucuronyltransférases. Les autres sont aussi responsables de résistances intra-tumorales, mais dans une moindre mesure [95]. La famille la plus représentative de la phase II est probablement celle des UGTs qui jouent un rôle majeur dans la métabolisation du SN38, métabolite actif de l'irinotécan. L'irinotécan fait partie des traitements de première et seconde ligne du cancer colorectal, il est métabolisé par les carboxyl-estérases pour donner le SN38 qui est glucurono conjugué par l'UGT1A1, pour ensuite être éliminé par voie biliaire [121]. Parmi les nombreuses études réalisées, deux études ont suggéré que la résistance à l'irinotécan pouvait être liée à une surexpression et une augmentation de l'activité des UGT1A1 et UGT1A9 [122], [123]. La première étude réalisée sur des tissus de cancers colorectaux, a observée une surexpression des UGT1A9 et UGT1A1 dans les tissus tumoraux par rapport à la muqueuse colique saine, avec une glucuronidation plus importante du SN38 [122]. La deuxième réalisée dans des lignées cellulaires cancéreuses de poumon résistantes à l'irinotécan (PC-7/CPT-11), démontre que la glucuronidation du SN38 est corrélée à une plus forte activité et expression (ARNm et protéines) des UGT1A1 et UGT1A9 dans la lignée résistante par rapport à la lignée contrôle.

Les membres de la famille des glutathion-S-transférases ont été décrits comme étant sur-exprimés dans de nombreux cancers solides comme ceux des ovaires, des poumons et de l'estomac. Ils sont responsables de la conjugaison de nombreux agents alkylant comme le chlorambucil, le cyclophosphamide et le melphalan, ce qui entraînent leur élimination par voie biliaire [73]. D'autre part, ces GST notamment GST π et μ , sont aussi capables de réguler négativement la voie *Mitogen-Activated-protein* (MAPK) via leurs fixations sur la *c-Jun-N-terminal kinase 1* (JNK). De cette façon, elles sont capables d'induire une résistance à d'autres cytotoxiques nécessitant cette voie pour induire l'apoptose (antimétabolites, le cisplatine, inhibiteurs de topoisomérase I et II) [124].

4.3 Transporteurs de la phase III

Les transporteurs de la phase III regroupent l'ensemble des transporteurs dont le rôle dans la résistance à de multiples classes d'agents anticancéreux est connu depuis longtemps (95). Il s'agit principalement des transporteurs de la famille des *ATP Binding Cassette* (ABC) responsables de l'efflux de nombreux cytotoxiques avec leurs principaux membres, la *glycoprotéine-P* (P-gp) ou ABCB1, la « *breast cancer resistance protein* » (BRCP/MXR) ou ABCG2, la « *Multidrug Resistante associated protein 1* » (MRP1) ou ABCC1 [125]. Dans le cadre de ce manuscrit, nous ne parlerons que de l'implication de ces transporteurs dans les phénomènes de résistance relatifs au cancer de la prostate.

ABCB1 est certainement la pompe d'efflux qui a été le plus étudiée [126]–[128]. Elle a été retrouvée surexprimée dans différents types de tumeurs solides ou hématologiques (106) et elle est responsable de l'efflux de diverses familles de molécules de chimiothérapies comme les anthracyclines, les vinca-alcaloïdes, ou les podophylotoxines (90-105). Dans le cancer de la prostate, de nombreuses études ont démontré qu'elle représentait un des marqueurs de résistance majeur au docétaxel [129]. Dans l'étude de *O'Neill et al de 2011*, il a été généré 3 lignées résistantes au docétaxel provenant de la DU145, 22RV1 et PC3 et ils ont montré que la résistance au docétaxel de la DU145 et 22RV1 était principalement due à une augmentation d'ABCB1. Les cellules pouvaient être re-sensibilisées par l'utilisation d'élacridar, un inhibiteur de l'expression d'ABCB1. En revanche, pour la PC3, la résistance au docétaxel était principalement liée à une augmentation de la sénescence, de l'autophagie et de NF-κB [130]. Une autre étude de *Zhu et al de 2013*, a également démontré qu'ABCB1 était responsable de la résistance d'une autre lignée au docétaxel (TaxR) [131, p. 1]. Enfin dans une dernière étude de *Zhu et al de 2015*, il a été démontré sur des DU145 et C4-2B sur-exprimant ABCB1, que la résistance au docétaxel pouvait être contournée par l'utilisation de bicalutamide et d'enzalutamide. En effet, ils ont mis en évidence que le bicalutamide serait un inhibiteur de l'expression et de l'activité d'ABCB1, alors que l'enzalutamide serait un inhibiteur de l'activité d'ABCB1 [132]. Dernièrement, de nombreux essais cliniques de phase I ou II commencent à investiguer la possibilité d'associer un inhibiteur d'ABCB1 (zosuquidar ou le R101933) avec le docétaxel, néanmoins les résultats obtenus sont mitigés [133], [134]. A ce jour, la seule véritable stratégie thérapeutique approuvée pour contourner la résistance au docétaxel, est l'utilisation du cabazitaxel qui est décrit comme ayant moins d'affinité pour ABCB1 [10]. Cependant, une récente étude de *P.Lombard et al de 2017*, se basant sur les modèles de résistance au docétaxel précédemment décrits dans les autres études (TaxR et

DU145R), a démontré que l'augmentation de l'expression d'ABCB1 pouvait aussi entraîner une résistance au cabazitaxel. Cette résistance pouvant être contournée de nouveau, par l'utilisation de bicalutamide et d'enzalutamide comme inhibiteur d'ABCB1 [135]. Ces résultats suggèrent que l'utilisation des chimiothérapies en combinaison avec les anti-androgènes pourrait améliorer l'efficacité thérapeutique de ces molécules.

ABCG2 est également exprimée dans divers types de tumeurs notamment dans les carcinomes colorectaux, gastriques, ovariens, mammaires, prostatiques et dans les cancers du poumon et les mélanomes. Elle est responsable de l'efflux de nombreux agents cytotoxiques, comme la mitoxantrone, mais aussi les camptothécines, les podophyllotoxines et les anthracyclines [90]. Dans le cancer de la prostate, le rôle d'ABCG2 comme marqueur de résistance aux traitements reste encore très peu décrit. Une étude de Xie et al de 2007, a corrélé la résistance d'une lignée de cancer de prostate au docétaxel (CWR-R1) à une augmentation d'ABCG2 [136]. Une autre étude de *Colabufo et al de 2008*, a démontré que la résistance des lignées PC3 et LnCap au bicalutamide était principalement due à l'expression des pompes à efflux ABCB1, ABCC1 et ABCG2, et que ces lignées pouvaient être re-sensibilisées par l'utilisation d'un inhibiteur de ces pompes (MC18) [137]. Dernièrement de nombreuses études de pharmacogénétique se sont aussi intéressées aux polymorphismes des gènes codant pour ABCB1 et ABCG2 et de leur conséquence sur la réponse tumorale au docétaxel et au bicalutamide [138], [139]. En dehors des agents cytotoxiques, il a également été démontré qu'un certain nombre de thérapies ciblées comme les inhibiteurs de kinases, seraient aussi des substrats de forte affinité des pompes ABCB1 et ABCG2. Cette partie sera détaillée dans le chapitre consacré aux inhibiteurs de kinases.

ABCC1 est également exprimée dans différents types de tumeurs solides, notamment dans celles du poumon, du sein et de la prostate, où elle est responsable de résistance à divers thérapeutiques. Elle est responsable de l'efflux d'un grand nombre de molécules, dont des agents cytotoxiques comme les antimétabolites, les vinca-alkaloïdes, les anti-androgènes, les anthracyclines et des composés glucurono-conjugués [91]. Dans le cancer du poumon a ou non à petites cellules, son expression est un puissant indicateur d'une réponse faible aux chimiothérapies et d'une faible survie globale [140], [141]. Dans le cancer de la prostate, deux études *in vitro* ont démontré que l'expression de MRP1 était responsable de la chimiorésistance des lignées de cancer de prostate (PC3 et DU145) à la doxorubicine et au flutamide [142, p. 1], [143].

III. Les récepteurs nucléaires

1. La superfamille des récepteurs nucléaires (RNs)

La superfamille des récepteurs nucléaires regroupe différents facteurs de transcription qui peuvent être activés par des ligands d'origine endogène ou exogène. Les ligands d'origine endogène sont de petites molécules lipophiles telles que des hormones, les acides biliaires, et vitamines. Les ligands d'origine exogène sont d'origine environnementale ou médicamenteuse. Une fois les récepteurs nucléaires activés par ces ligands, ils pourront se fixer sur les régions promotrices d'un très grand nombre de gènes impliqués dans la plupart des fonctions cellulaires et moduler leur transcription [69].

2. Classification et Structure générale des RNs

La superfamille des récepteurs nucléaires est amplement représentée chez les métazoaires du règne animal. Chez l'homme, elle représente l'un des plus grands groupes de facteurs de transcription avec 49 membres identifiés [144]. Le premier membre de cette famille à avoir été cloné est le récepteur des glucocorticoïdes en 1985 [145]. La forte homologie de séquence des DBD de ces récepteurs a permis l'identification de nouveaux gènes (par exemple, le récepteur de l'acide rétinoïque RAR α) [146]. Cette technique de criblage a permis de mettre en place une stratégie dite d'« endocrinologie inverse », qui repose sur la découverte d'ADNc codant pour un récepteur avant la découverte de ses ligands et de sa fonction [147]. Ainsi, plusieurs récepteurs nucléaires sans ligands connus furent identifiés et baptisés « récepteurs nucléaires ». Il existe 3 classes de récepteurs nucléaires: les récepteurs endocriniens présentant un ligand hormonal de forte affinité, les récepteurs orphelins « adoptés », ayant un ligand de faible affinité et identifié après la découverte du récepteur, et les récepteurs nucléaires orphelins dont aucun ligand naturel n'a encore été identifié (**Fig. 5**)[69], [144].

Les 3 classes de récepteur nucléaire présentent une organisation commune avec 4 domaines spécifiques [148]:

- le domaine A/B également appelé «Domaine N-terminal régulateur», est le plus variable entre les différents récepteurs nucléaires, celui-ci contient une séquence «**AF-1**»

(*Activation Function 1*). Cette séquence lui permet d'avoir une activité constitutive qui est généralement très faible ;

- le domaine C ou « **domaine de liaison à l'ADN** » (aussi appelé **DBD** pour *DNA Binding Domain*) est, quant à lui, très conservé. Ce domaine possède deux motifs en doigt de zinc qui sont capables de reconnaître des séquences spécifiques appelées **éléments de réponse aux hormones (HRE)** au niveau de l'ADN de ses gènes cibles ;

- le domaine D est une « région charnière » caractérisé par sa flexibilité, elle favorise le repliement du récepteur et la liaison des dimères sur leurs éléments de réponse ;

- le domaine E représente le «**domaine de liaison du ligand**» (**LBD**). Sa structure secondaire forme une cavité appelée « *Ligand Binding Pocket* » (**LBP**), de volume variable en fonction du récepteur nucléaire, permettant la liaison au ligand. Le domaine E est également constitué d'un site de dimérisation, permettant le recrutement de co-activateurs et de co-répresseurs, et d'un domaine responsable de la transactivation ligand-dépendante situé à son extrémité C-terminale (domaine **AF-2** pour *Activation Function 2*) [69].

Il existe sept classes de récepteurs nucléaires qui ont été caractérisés via une classification phylogénique basée sur l'homologie de séquence des domaines C, D, et E. En 1999, cette classification a permis d'établir une nomenclature alphanumérique. Celle-ci se définit en premier lieu par un chiffre qui correspond à la sous-famille du récepteur (numérotées de 0 à 6), suivi d'une lettre qui correspond au groupe auquel appartient le récepteur. Enfin, le dernier chiffre identifie le récepteur [69], [144].

NR0 : Récepteurs nucléaires « atypiques » (un groupe, B et 2 RNs : DAX-1 et SHP)

NR1 : Récepteurs nucléaires dédiés aux hormones thyroïdiennes (10 groupes (A-I), 19 RN)

NR2 : Récepteurs nucléaires X Rétinoïques (RXR) (5 groupes, de A à F, 12 RN)

NR3 : Récepteurs nucléaires dédiés aux hormones stéroïdiennes (3 groupes (A-C), 9 RN)

NR4 : Récepteurs nucléaires dédiés aux facteurs de croissance des nerfs (1 groupe, 3 RNs)

NR5 : Récepteurs nucléaires dédiés aux facteurs stéroïdogéniques (1 groupe, 2 RNs)

NR6 : Récepteurs nucléaires dédiés aux facteurs nucléaires des cellules germinales (1 groupe, 1 RN)

	Récepteurs endocriniens	Récepteurs orphelins « adoptés »	Récepteurs orphelins
Ligand	Hormones stéroïdiennes Haute affinité	Lipides alimentaires, xénobiotiques Faible affinité	Inconnus
	ER α, β PR AR GR MR	RXR α, β, γ PPAR α, β, γ LXR α, β FXR PXR/SXR CAR	SF-1 LRH-1 DAX-1 SHP TLX PNR
	RAR α, β, γ TR α, β VDR EcR	HNF-4 α ROR α, β, γ	NGFI-N α, β, γ RVR α, β, γ GCNF TR-2,4 HNF-4 β, γ COUP-TF α, β, γ
	ERR α, β, γ		

Figure 5 : Classification des récepteurs nucléaires en fonction de leur capacité à fixer un ligand [149], [150].

3. PXR et CAR

Les xénorécepteurs CAR codé par le gène *NR1I3* et PXR codé par le gène *NR1I2* font partie de la sous-famille des récepteurs nucléaires appartenant aux hormones thyroïdiennes et au groupe des homologues du récepteur de la vitamine D (NR1I) [69], [144].

Pregnane X Receptor (PXR) fût découvert chez le Xénope et désigné *Benzoate X Receptor* (BXR) pour sa reconnaissance des substrats benzoates [151]. Il a ensuite été identifié chez la souris [152], puis son homologue humain a été cloné en 1998 par trois équipes qui lui ont donné différents noms : *Pregnane X Receptor* (PXR) par l'équipe de Lehmann, *Pregnane Activated Receptor* (PAR) par Bertilsson *et al*, et *Steroid Xenobiotic Receptor* (SXR) par Blumberg *et al* [153], [154]. C'est également l'équipe de Lehmann qui a mis en évidence que l'activation de PXR par la rifampicine ou la dexaméthasone permettait d'induire l'expression du gène *CYP3A4* et qu'il existait un site de fixation de PXR dans la région promotrice de ce gène, faisant de ce cytochrome une cible transcriptionnelle majeure de ce récepteur nucléaire [155].

CAR (*Constitutively Activated Receptor*), fut découvert chez la souris. Le clonage de son homologue humain date de 1994 [156]. Sa fonction fut identifiée peu après par l'équipe de Negishi en démontrant qu'un traitement par le phénobarbital entraînait son hétérodimérisation avec RXR et sa translocation dans le noyau, lui permettant de se fixer dans le promoteur du gène *CYP2B10 murin*[157].

La répartition de PXR et CAR dans l'organisme est variable. Ils sont tous deux exprimés dans le foie et l'intestin, organes majeurs de détoxification. PXR est exprimé plus spécifiquement dans l'estomac, le coeur, la moelle osseuse et le colon et CAR à un niveau plus faible dans le rein et les glandes surrénales. Néanmoins, des variations du niveau d'expression des xénorécepteurs peuvent être observés selon le contexte génétique, l'environnement et la physiopathologie du patient [158].

Dans le cadre de ce manuscrit, nous ne développerons que PXR et nous n'introduirons CAR que dans la partie traitant des gènes cibles des récepteurs nucléaires.

3.1 Structure de PXR

Le gène *NR1I2* codant pour PXR est situé sur le chromosome 3 en région 3q12/13.3, il comporte 10 exons dont deux exons 1 alternatifs (1A et 1B) et s'étend sur environ 35 kb [159]. De nombreuses isoformes de PXR ont été identifiées mais la plus représentative est PXR.1, dite « forme canonique » et qui est exprimée dans le foie. PXR.1 sera transcrite à partir de l'exon 1A et traduite à partir de l'exon 2 pour donner une protéine de 434 acides aminés [159]. La structure protéique de PXR présente de fortes similitudes avec celle des autres récepteurs nucléaires, à une exception près sur le domaine A/B de l'isoforme PXR.1 qui ne présente pas de domaine AF-1 responsable de l'activité constitutive. En revanche, l'isoforme PXR.2 semble être la seule à posséder le domaine AF-1 [69], [159].

La capacité de PXR à lier un grand nombre de ligands de structures et de tailles très différentes a été révélée par une étude de sa structure cristallographique en absence ou en présence de ligands [159]. En effet, il a été mis en évidence que la poche de liaison est plus flexible et son volume plus important, du fait de la présence de 5 feuilletts β anti-parallèles alors que ceux des autres récepteurs nucléaires n'en comptent que 2 ou 3. Cette caractéristique permet à la poche de s'adapter à des molécules de taille très variables (200 à 800 Daltons). Enfin, la spécificité de liaison des substrats dans cette poche est essentiellement due à la présence de nombreux résidus polaires [159].

Le DBD de PXR varie peu entre les différentes espèces. Sa structure est représentée par deux motifs en doigt de zinc codés par une séquence d'environ 70 acides aminés qui lui permettront de se fixer aux séquences HRE, et d'une extension C-terminale. Il sera impliqué dans les phénomènes d'hétérodimérisation de PXR avec RXR et de la liaison sur les séquences spécifiques de l'ADN [160].

3.2 Mécanisme d'activation transcriptionnelle de PXR

A l'heure actuelle la totalité du mécanisme d'activation de PXR n'a pas encore été élucidée. La localisation cytosolique ou nucléaire de PXR reste également un questionnement du fait qu'elle n'est pas toujours la même en fonction de l'organe [161].

La fixation du xénorécepteur sur les séquences spécifiques contrôlant l'expression de leurs gènes cibles sont schématisées sur la **figure 6** [162]. En absence de ligands, le xénorécepteur est retrouvé lié à des co-répresseurs tels que SMRT et/ou NcoR, qui inhibent son activité [163]. La liaison d'un ligand au xénorécepteur permet son activation et sa translocation nucléaire, ainsi que son hétérodimérisation avec RXR pour adopter une conformation « active ». Il s'en suit sa libération de SMRT et/ou NcoR, et le recrutement de plusieurs protéines ; des co-activateurs tels que « *Glucocorticoid Receptor Interacting Protein* » (GRIP) ou « *Steroid Receptor Coactivator 1* » (SRC-1), des cofacteurs comme des « *Histone Acetyl Transferase* » (HAT) ou des « *Histone Methyltransferase* » (HMT), et enfin des kinases. Ces modifications permettent une décondensation de la chromatine, permettant ainsi de faciliter l'accès de l'ARN polymérase II à la « *TATA box* », en amont du site d'initiation [69]. Lors de son activation, le récepteur nucléaire se lie aussi au complexe « *Vitamin D Receptor Interacting Protein - Thyroid Hormone Receptor Associated Protein* » (DRIP-TRAP), lui permettant d'initier la transcription du gène cible [158].

Les hétérodimères PXR-RXR ou CAR-RXR se lient sur l'ADN *via* leur DBD au niveau des « *Hormone Responsive Element* » (HRE) localisées dans les régions promotrices des gènes cibles [164]. Elles sont constituées de séquences consensus [AG(G/T)TCA] organisées en « *Direct Repeat* » (DR), en « *Everted Repeat* » (ER), et en « *Inverted Repeat* » (IR), qui sont espacées de 0 à 8 bases [165]. L'hétérodimère PXR-RXR se lie spécifiquement sur les séquences de type DR-3, DR-4, DR-5, ER-6 et ER-8. Cependant, les DBD de PXR et CAR sont assez similaires et une fois hétérodimérisés avec RXR, cela permet aux 2 xénorécepteurs de se lier sur certains HRE communs (DR-4, DR-3 et ER-6) de leurs gènes cibles [166], [167]. L'étude de Goodwin *et al* est la première à avoir décrit que l'induction de la transcription du CYP3A4 était dépendante de deux éléments, l'un appartenant à la région proximale du promoteur du gène (motif ER6), l'autre à la région distale (motif DR3) [168].

jour, le *CYP4F12* reste le seul gène présentant la particularité d'avoir ces deux sites de liaison de PXR en aval de sa région codante [171]. La régulation du *CYP1A1* et *CYP1A2* par CAR est une des mieux décrites dans la littérature [172], [173]. L'étude de *Yoshinari et al de 2010* a identifié le site de liaison de CAR sur *CYP1A1* et *CYP1A2*, par immunoprécipitation de la chromatine. Ils ont mis en évidence que CAR se fixait sur un motif ER8 dans une région très conservée, proche du promoteur des gènes *CYP1A1* et *CYP1A2*. Ils ont ensuite confirmé dans des modèles d'hépatocytes humains sur-exprimant hCAR, l'augmentation d'expression ARNm de ces deux gènes [173].

En revanche, comme le montre la **figure 7**, la majorité des gènes du métabolisme et du transport sont des cibles communes aux 2 xénorécepteurs. PXR et CAR ne contribuent pas de manière équivalente à la régulation de ces gènes du métabolisme et du transport, probablement du fait qu'ils ne se fixent pas aux sequences HRE avec la même affinité. Ce phénomène est assez bien illustré pour la régulation de *CYP2B6* et *CYP3A4*. Alors que PXR se lie fortement aux motifs DR4, DR3, ou ER6 dans les promoteurs des deux cytochromes, CAR se lie faiblement au motif ER6 du promoteur de *CYP3A4* et fortement au motif DR4 du *CYP2B6* permettant d'expliquer la sélectivité de CAR pour ce dernier [166], [167]. Cette co-régulation ne se limite pas aux enzymes de phase I. Notamment pour l'*UGT1A1*, qui a été la première enzyme de glucuronidation, décrite comme régulée par CAR [174], [175].

D'autres études ont ensuite démontré que l'*UGT1A1* était aussi régulée par PXR [170]. Il en est de même pour certains transporteurs de la phase III comme notamment *ABCB1* et *ABCC2*. Il a été décrit dans des tissus sains de foie et de colon, ainsi que dans des cellules de cancer colorectal (LS174), que l'activation transcriptionnelle d'*ABCB1* était régulée par PXR et CAR, *via* la reconnaissance du motif DR4 présent dans le promoteur du gène *ABCB1* [176], [177]. En revanche, la régulation transcriptionnelle d'*ABCC2* a été décrite dans des cellules primaires d'hépatocytes et d'intestin comme étant liée à PXR et CAR, *via* la reconnaissance du motif ER8 en amont du promoteur du gène *ABCC2* [178].

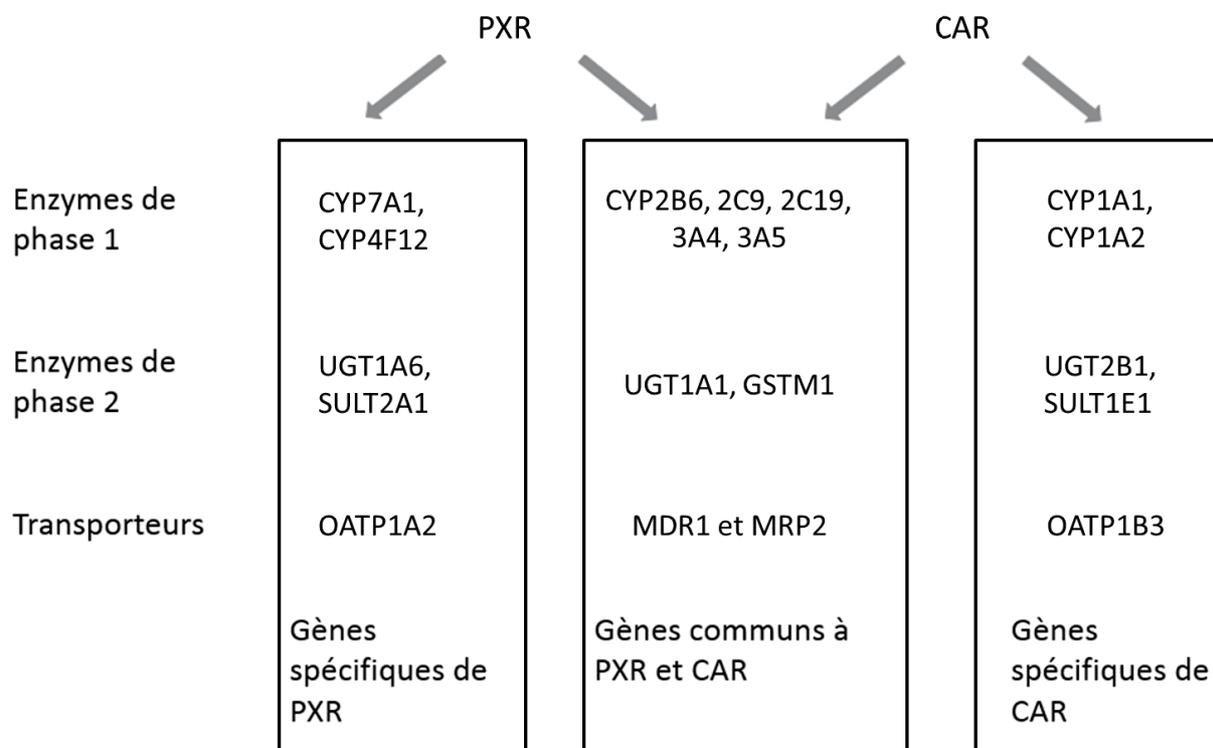


Figure 7: Exemple de gènes du système ADME cibles de PXR et CAR (d'après [158]).

3.4 Ligands de l'activité de PXR et CAR

PXR est capable de reconnaître des ligands d'origine endogène ou exogène de nature et de structure très différentes avec une faible affinité de l'ordre du micromolaire [179], ce qui justifie son rôle dans la détoxification et la protection de l'organisme contre les agressions chimiques extérieures [180]. De plus, les molécules ayant un effet ligand sur PXR, peuvent influencer leur propre métabolisme ou celui de drogues co-administrées, et ainsi avoir des conséquences majeures sur la réponse thérapeutique. Cette partie est précisément un des objectifs que nous avons voulu développer dans ce projet.

3.4.1 Les agonistes des xénorécepteurs

De nombreuses molécules endogènes sont capables d'activer PXR comme l'acide litholique [181]. Lorsqu'elles atteignent des concentrations élevées (lors de prise de compléments alimentaires), les hormones stéroïdiennes telles que l'oestradiol, la progestérone, la corticostérone, la déhydroépiandrostérone (DHEA) mais aussi certaines vitamines telles que le β -carotène (précurseur de la vitamine A), les tocotriénols (de la famille de la vitamine E) et la vitamine K2 sont des ligands activateurs de PXR [182]–[185].

De nombreux xénobiotiques issus de plantes comme le curcuma, le ginkgo biloba, le thym, l'ail, le guggul ou des polyphénols sont des agonistes de PXR [186]. L'hyperforine qui est le principe actif du millepertuis utilisé pour ses propriétés antidépressives, est le plus puissant agoniste de PXR (nM) [187]. Enfin, de nombreux médicaments ont été décrits comme agonistes de PXR, entraînant l'activation du système de détoxification. L'activation de ce système peut expliquer certaines interactions médicamenteuses, le médicament A agoniste de PXR pouvant influencer le métabolisme d'un médicament B associé, comme le montre la **figure 8**. Les traitements les plus concernés par ces interactions médicamenteuses sont : des antibiotiques tels que la rifampicine et les macrolides, les inhibiteurs de la protéase du VIH, les hypocholestérolémiants tels que le gemfibrozil, des anticancéreux comme le paclitaxel ou des inhibiteurs de Kinases, des corticoïdes de synthèse (dexaméthasone), et des antiépileptiques (phénytoïne, carbamazépine) [188]–[190].

3.4.2 Antagonistes de PXR

Les principales molécules antagonistes de PXR sont résumées dans la **Tableau 10**. Le premier antagoniste de PXR à avoir été décrit est l'ET-743, un alkylant du petit sillon [191]. Cette étude réalisée sur des cellules CV-1 transfectées par PXR, a démontré que de faibles concentrations d'ET-743 diminuaient l'activité transcriptionnelle du *CYP3A4* et *ABCB1* via l'inactivation de PXR. Depuis, plusieurs autres molécules sont entrées dans cette catégorie (**Tableau 10**) comme notamment le sulforaphane retrouvé dans les brocolis, qui est le premier composé naturel identifié comme antagoniste de PXR [192], ou encore le coumestrol, un phytoestrogène. Cependant, l'antagoniste le plus décrit dans la littérature est le kétoconazole. Depuis l'étude *Takeshita de 2002* qui a décrit dans des lignées HepG2, l'activité antagoniste du kétoconazole sur PXR [193], son mécanisme de liaison et son activité antagoniste sur PXR ont été quasiment élucidés [194]. Une étude clinique visant à évaluer les effets de différents agonistes et antagonistes de PXR, a démontré que les concentrations utilisées en clinique (environ 10 μ M) ne sont pas assez élevées pour antagoniser PXR chez l'Homme [195]. En ce sens, une équipe a développé un analogue du kétoconazole (FLB-12) qui présente les mêmes capacités antagonistes sur l'activation de PXR; mais à des concentrations plus faibles [196]. Une première étude de *Venkatesh et al de 2011*, a démontré que l'utilisation du FLB-12 dans des lignées de cancer de colon (LS174T), entraînait une diminution de la résistance au SN38, via l'inactivation de PXR [197].

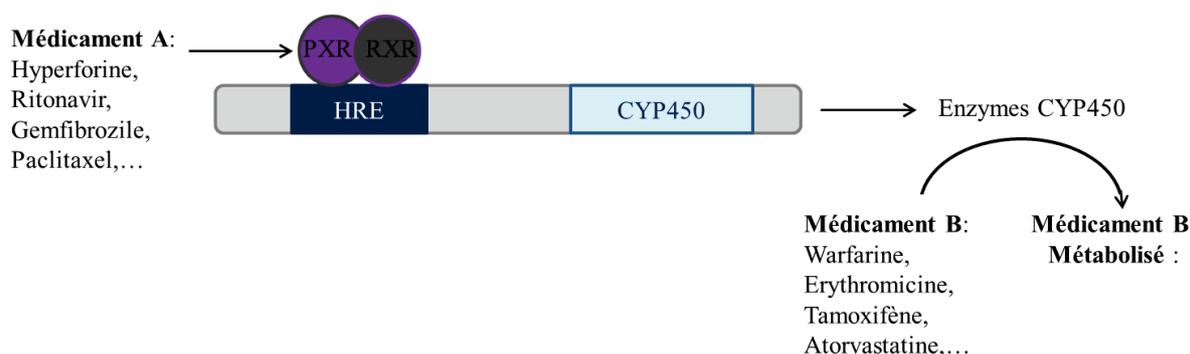


Figure 8: Rôle de PXR dans l'interaction entre 2 médicaments_(d'après [189]).

Composés	Activité pharmacologique	Références
ET-743	Antinéoplasique	<i>Synold et al</i> ; Nat Med. 2001;7:584–590
Kétoconazole	Antifongique	<i>Ekins et al</i> ; Mol Pharmacol. 2007 Sep; 72(3):592-603.
FLB-12	analogue du Kétoconazole	<i>Das et al</i> ; Bioorg Med Chem Lett. 2008;18:3974–3977
Sulforaphane	Isothiocyanate	<i>Zhou et al</i> ; Mol Pharmacol. 2007;71:220–229.
A792611	Inhibiteur de protéase	<i>Healan-Greenberg et al</i> ; Drug Metab Dispos. 2008;36:500–507
Coumestrol	Agoniste des récepteurs aux oestrogènes	<i>Wang et al</i> ; Mol Endocrinol. 2008;22:838–857
Camptothécine	Inhibiteur de Topoisomérase I	<i>Chen et al</i> ; J Pharmacol Exp Ther. 2010;334:999–1008
Sésamin	lignane	<i>Lim et al</i> ; Evid Based Complement Alternat Med. 2012:242810.
Flucoxanthine	caroténoïde	<i>Liu et al</i> ; Mar Drugs. 2012;10:242–257
Metformine	antidiabétique	<i>Krausova et al</i> ; Biochem Pharmacol. 2011;82:1771–1180

Tableau 10 : Liste des antagonistes connus de PXR [198], [199].

3.5 Rôle de PXR dans le métabolisme des endobiotiques

En dehors de ses fonctions de détoxification des xénobiotiques, les concentrations de nombreux endobiotiques tels que le cholestérol, les acides biliaires, les glucocorticoïdes, et le glucose sont régulées par PXR, afin d'éviter une accumulation trop importante de ces molécules qui peut être toxique. L'activation de PXR est responsable d'une hypercholestérolémie associée à une augmentation des protéines du foie impliquées dans le métabolisme et le transport du cholestérol telles que CD36, ApoA-IV et CYP39A1 [200]. Enfin des études précliniques ont mis en évidence que le traitement à long terme par des agonistes connus de PXR, tels que la rifampicine ou la carbamazépine, est à l'origine d'une élévation du taux de cholestérol et d'une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires [201], [202].

Les acides biliaires jouent un rôle majeur dans la biotransformation du cholestérol. Ils sont produits dans le foie par les cytochromes responsables de l'oxydation du cholestérol dont l'accumulation induit des cholestases. Des études ont démontré que PXR peut diminuer la biosynthèse de la bile en régulant négativement le CYP7A1, enzyme clé de la production d'acide biliaire [181], [203]. De plus, PXR régule la biotransformation des acides biliaires en modulant l'expression de CYP3A et de SULT2A ainsi que divers transporteurs d'efflux [181], [204], [205].

L'activation de PXR entraîne une augmentation du niveau de corticostérone et d'aldostérone plasmatique par activation des enzymes stéroïdiennes comme CYP11 et la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase [206]. PXR a également un rôle dans le contrôle du taux de glucose plasmatique en modulant les 3 étapes de néoglucogénèse, de glycogénolyse, et de glycogénèse via la régulation d'enzymes telles que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose 6 phosphatase (G6Pase) [207], [208].

3.6 Régulation de PXR

3.6.1 Régulation transcriptionnelle

Les différents mécanismes de régulation de PXR sont schématisés dans la **figure 9**. *NR1I2* présente plusieurs sites de liaison consensus pour des facteurs de transcription au niveau de son promoteur. Les plus représentatifs sont HNF1 [209], HNF3 [210] et AhR [211], mais aussi des récepteurs nucléaires tels que HNF4 α (*NR2A1*), PPAR α (*NR1C1*) [212], [213].

La première étude montrant une régulation épigénétique du gène PXR date de 2005. Cette étude a mis en évidence que l'hyperméthylation du promoteur de PXR était associée à un faible niveau d'expression du gène dans des lignées cancéreuses et dans les tumeurs primaires de neuroblastomes. Cette hyperméthylation était corrélée à une plus grande agressivité de ces tumeurs et l'utilisation d'un agent déméthylant comme la 5-aza-déoxycytidine, permettait de diminuer la prolifération cellulaire, via l'augmentation de l'expression de PXR [214]. Les auteurs en ont conclu que la méthylation de *NR1I2* pourrait servir de marqueur diagnostique et pronostic dans ce cancer. Une autre étude réalisée dans des lignées de cancer de colon (Caco-2, HT29, HCT116, SW48, LS180, LoVo) a démontré que l'expression d'ARNm de *NR1I2* était corrélée au niveau de méthylation du gène. L'expression de *NR1I2* étant plus forte dans les lignées hypométhylées (LS180, LoVo) que dans les lignées hyperméthylées (Caco-2, HT29, HCT116, SW48) et l'utilisation de 5-aza-déoxycytidine permettait d'augmenter l'expression de *NR1I2* [215]. Il est de plus en plus décrit que les lignées et le cancer de la prostate sont hyperméthylées, entraînant l'extinction de nombreux gènes de la réparation à l'ADN, du métabolisme et suppresseurs de tumeurs [216]. L'ensemble de ces résultats suggérant l'intérêt de cibler ses altérations épigénétiques dans le cadre d'essais cliniques. A ce jour, aucune étude n'a investigué, l'influence de la méthylation sur l'expression de PXR dans les lignées et le cancer de la prostate. C'est une des approches que nous avons voulu développer dans le cadre de ce projet.

Il a également été démontré des modifications post-transcriptionnelles via certains miRNA comme le *miRNA 148a*. Cette étude réalisée dans 25 échantillons de foie, a montré que l'expression du *miRNA 148a* est capable de moduler l'expression de PXR. Sa surexpression est à l'origine d'une diminution de l'expression de PXR et du taux d'ARNm de CYP3A4 [217]. Le miRNA 148a a aussi été décrit comme étant exprimé à différents niveaux dans les lignées de cancer de prostate (PC3, DU145, LnCAP). Dans la lignée PC3, où il est faiblement exprimé ; sa sur-expression entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et une

diminution de la résistance au paclitaxel via l'inhibition de l'expression de « *mitogen- and stress-activated kinase 1* » (MSK-1)[218]. Ces résultats suggèrent que la régulation de PXR par le *miRNA 148a* pourrait aussi influencer la sensibilité des lignées de cancer de prostate à certains cytotoxiques.

3.6.2 Régulation post-traductionnelle

Plusieurs mécanismes de régulation post-transcriptionnels de PXR ont été décrits. La phosphorylation de ce xénorécepteur se traduit presque toujours par une inhibition de son activité [219]. Les « *Proteine Kinase A et C* » (PKA et PKC) sont responsables de la phosphorylation de PXR. La PKC réprimerait l'activité de PXR en renforçant son interaction avec le corépresseur NCoR et en inhibant l'interaction avec le coactivateur SRC-1 [220].

PXR est également ubiquitinylé, ce qui permet sa dégradation par le protéasome [221], [222]. La liaison de PXR avec un ligand permet d'augmenter la demie-vie de PXR, par suppression de l'interaction entre PXR et un suppresseur de gal1 (SUG1), composant du complexe 26S du protéasome [220]. PXR est également décrit comme étant sumoylé et acétylé, ce qui a des répercussions sur son activité transcriptionnelle et sur ses interactions avec l'ADN ou d'autres protéines [223], [224].

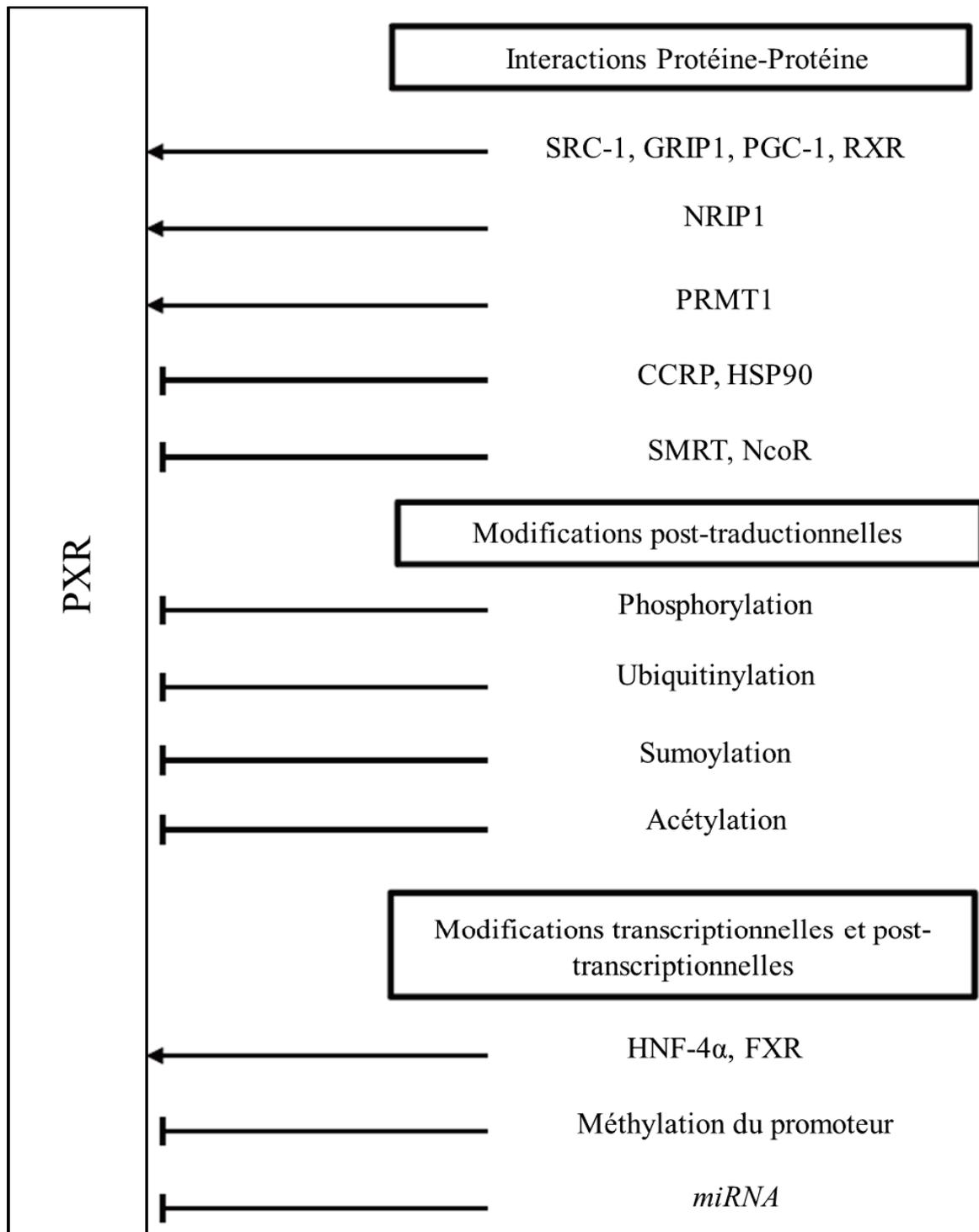


Figure 9: Les différents facteurs responsables de la modulation de l'activité et de l'expression PXR (d'après [158]).

3.7 PXR et chimiorésistance

L'expression de PXR est de plus en plus décrite dans de nombreux cancers solides, comme celui du sein, du colon, de la prostate, des ovaires, de l'endomètre et des cervicales. Il a ensuite été décrit comme exprimé dans les cancers hématologiques, gastriques, de la tête et du cou, du pancréas, du foie et dans les ostéosarcomes [225]. Dans la majorité des cas, il est sur-exprimé dans les tissus cancéreux par rapport aux sains, et son expression dans les lignées est associée à la prolifération des cellules tumorales via l'altération de nombreux gènes, comme le montre la **figure 10**. Seul le cancer du col utérin présente une plus faible expression de PXR par rapport au tissu sain et sa sur-expression dans les lignées CaSki et HeLa est associée à une diminution de la prolifération cellulaire, via l'arrêt du cycle en phase G2/M [226]. Dans le cancer du colon, il a été récemment mis en évidence que PXR serait faiblement exprimé et que sa sur-expression dans les lignées HT29 serait responsable d'une diminution de la prolifération cellulaire, via l'arrêt du cycle en phase G0/G1 [227]. Ces résultats sont en contradiction avec des travaux ultérieurs qui ont démontré dans des lignées LS174T que la sur-expression de PXR serait en faveur d'une stimulation de la prolifération cellulaire [228]. Par ailleurs, l'expression de PXR a aussi été rapportée comme étant responsable de la chimiorésistance à de nombreuses chimiothérapies [225]. Par exemple, dans le cancer du sein, de nombreuses études utilisant les lignées MDA-MB231 et MCF-7, ont démontré que la sur-expression de PXR entraînait une résistance aux docétaxel, au tamoxifène, au paclitaxel et à la vinblastine, par le biais de l'augmentation d'expression du CYP3A4, ABCB1 et ABCG2 [229], [230]. Dans le cancer du colon, une étude réalisée dans notre équipe sur des LS180 sur-exprimant PXR, a démontré que PXR était responsable de la résistance des cellules cancéreuses au SN38, via l'activation de l'UGT1A1 [231]. Une autre étude utilisant les mêmes lignées, a mis en évidence que le SN38 était capable d'activer PXR, entraînant une augmentation de la résistance des LS180 à l'irinotécan [232].

Dernièrement, plusieurs publications ont étudié l'effet ligand sur PXR des agents cytotoxiques et thérapies ciblées. Parmi elles, deux études de *Stephan Harmsen de 2008 et 2009* ont montré sur des LS180 sur-exprimant PXR que plusieurs chimiothérapies (l'ifosfamide, le flutamide, le tamoxifène, la vincristine, la vinblastine, le docétaxel et le paclitaxel) pouvaient être des ligands agonistes de PXR via l'activation de la luciférase, gène rapporteur sous le contrôle, selon l'étude, du promoteur du *CYP3A4* ou d'*ABCB1* [233], [234]. De manière intéressante, il a été démontré que plusieurs chimiothérapies sont capables d'augmenter l'expression ARNm et protéique d'*ABCB1* ; en revanche seul le paclitaxel est

également capable d'induire l'expression protéique du CYP3A4, faisant de lui, un potentiel ligand de PXR. Enfin, une dernière étude de *Stephan Harmsen de 2012* utilisant les mêmes lignées LS180 sur-exprimant PXR et transfectées par le plasmide contenant la luciférase sous le contrôle du gène *ABCB1*, s'est intéressée à l'effet ligand des IKs sur PXR. Ils ont montré que l'erlotinib, le nilotinib, le géfitinib, le sorafénib et le vandétanib seraient des agonistes de PXR, par le biais de l'activation de la luciférase et l'augmentation de l'expression d'*ABCB1* [190].

Dans le cadre du cancer de la prostate, seule l'étude de *Chen et al de 2007* a investigué la corrélation de l'expression de PXR à la résistance des lignées de cancer de prostate (PC3) au paclitaxel et à la vinblastine [6]. D'autres travaux ont ensuite décrits PXR comme marqueur de bon ou mauvais pronostic, ou encore comme nouvelle cible thérapeutique. L'étude de *Zhang et al de 2010*, a notamment démontré *in vivo* que l'activation de PXR et de ses gènes cibles, notamment CYP3A4 et SULT2A1, réduisait significativement la taille et le poids de la tumeur chez la souris [8]. L'étude de *Fujimura et al de 2009* a, quant à elle démontré une corrélation entre une expression élevée du CYP3A4 au niveau tumoral et un meilleur pronostic vital chez les patients [7]. Cependant, aucune étude n'a encore adressé la question de la corrélation entre l'expression de PXR au niveau tumoral et la réponse aux inhibiteurs de kinases testés dans cette indication.

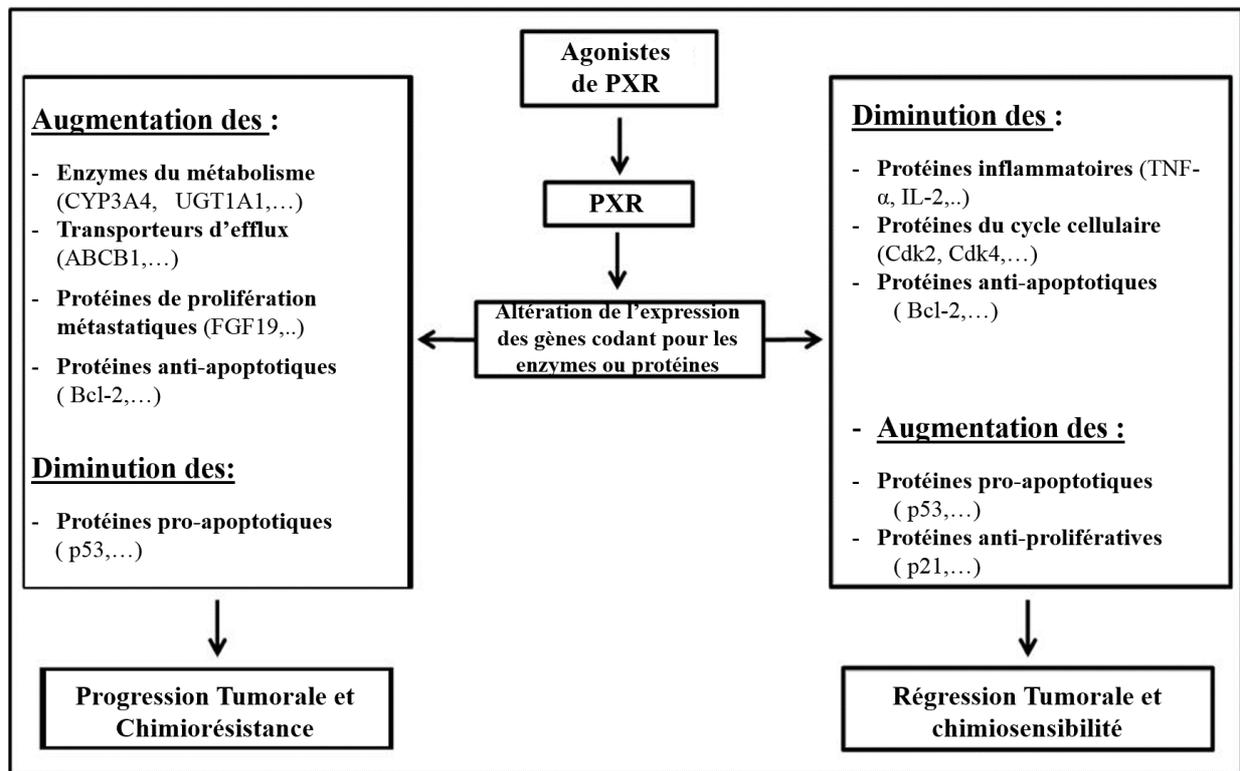


Figure 10 : Schéma résumant les conséquences de l'activation de PXR dans les lignées cancéreuses (d'après [225]).

IV. Les Inhibiteurs de Kinases

Depuis des années les chimiothérapies conventionnelles représentent les principaux agents utilisés dans le traitement de nombreux cancers. L'effet anti-tumoral de la plupart de ces agents cytotoxiques est obtenu soit par une interaction directe avec l'ADN, soit par l'inhibition de facteurs clés impliqués dans sa réplication ou sa transcription ou dans la division cellulaire. Même si ces chimiothérapies sont toujours utilisées en routine, elles ciblent à la fois les cellules saines et les cellules tumorales, avec pour conséquence l'apparition de nombreux effets toxiques comme l'alopecie, des diarrhées ou vomissements, mais aussi des myélosuppressions et cytopénies pouvant aller jusqu'au décès du patient [235].

1. Les protéines Kinases

Durant les 15 dernières années, les progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire et la connaissance du cancer ont permis de mettre en évidence une « nouvelle » catégorie de cibles thérapeutiques, les protéines kinases (PK). Ces petites protéines jouent un rôle clé dans la transduction du signal pour la plupart des fonctions cellulaires [236]. Comme leur nom l'indique, ces kinases phosphorylent leurs cibles sur des résidus tyrosines, sérines ou thréonines ce qui a pour conséquence de moduler leur activité [237]. Depuis la découverte de la première protéine kinase en 1968, la PKA [238], de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de ces enzymes dans diverses cascades de signalisation comme les voies des MAP kinases, JAK-Stat, ou PI3K-Akt-mTOR [239]. De multiples études ont également rapportées la présence de mutations de ces kinases associées à leur dérégulation dans diverses pathologies incluant les maladies inflammatoires, certains désordres métaboliques et immunologiques, et les cancers [240]. Pour beaucoup, ces mutations sont activatrices et permettent une stimulation de la voie de signalisation concernée, indépendamment des stimuli extérieurs. Le groupe des « *Tyrosine Kinase Like* » regroupe la famille des tyrosines kinases et des sérines-thréonines kinases. Ce groupe contient 90 membres dont 58 sont des récepteurs de tyrosine kinase et 32 sont des tyrosines kinases intra-cellulaires. La famille des sérines-thréonines kinases comprendrait 12 récepteurs [241]. Dans le but de bloquer l'activité aberrante de ces protéines kinases responsables du développement de nombreux cancers, de nouvelles « thérapies ciblées » ont été développées, les inhibiteurs de kinases.

2. Pharmacodynamie des Inhibiteurs de Kinases

Les Inhibiteurs de Kinases (IK) sont des petites molécules de bas poids moléculaire qui diffusent à travers la membrane cellulaire et interagissent au niveau des sites de liaison de l'ATP [242]. L'interaction compétitive de l'IK au niveau du site de fixation de l'ATP conduit à une inhibition réversible ou irréversible de l'activité enzymatique de la kinase et de la voie de signalisation qu'elle gouverne [243].

Depuis l'approbation par la FDA en 2001 de l'imatinib comme première thérapie ciblée inhibant l'activité de la protéine chimère Bcr-Abl, qui est impliquée dans le développement des leucémies myéloïdes chroniques, 30 IKs ont été approuvés dans divers cancers en première ou en seconde ligne de traitement, et plus de 130 sont en cours d'évaluation [240]. Parmi les IKs approuvés, 24 sont des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) (inhibiteurs des récepteurs à tyrosine kinases en majorité), 2 sont des inhibiteurs de sérine-thréonine kinase (STK) et 2 sont des inhibiteurs de lipide kinase (**Tableau 11**).

Malgré l'engouement initial pour ces thérapies ciblées lié au succès incontestable de l'imatinib, l'efficacité de ces inhibiteurs est très variable en fonction du type de cancer. Dans la majorité des leucémies, ils sont devenus les traitements de référence. En revanche, dans les tumeurs solides, leur efficacité est moindre avec seulement une amélioration modérée de la survie des patients. Une des principales raisons de cette perte d'efficacité est encore une fois le développement de mécanismes de résistance [244]. Pour beaucoup ces mécanismes incluent des mutations de la kinase cible ne permettant plus à l'inhibiteur de jouer son rôle de compétiteur vis-à-vis de l'ATP. Parmi les multiples exemples documentés nous pouvons citer celui de la mutation Thr790M de l'EGFR qui entraîne une résistance du cancer du poumon non à petites cellules à l'erlotinib et au géfitinib, ou les mutations T315I et E255K de Bcr-Abl à l'origine de la résistance des leucémies myéloïdes chroniques à l'imatinib [245], [246]. Un autre exemple très documenté est celui des mutations Q61 de NRAS ou C121S de MEK [247] apparaissant chez les patients atteints de mélanomes traités par le vémurafénib, un inhibiteur de la forme BRAF mutée V600E [248]. Ces mutations ont pour conséquence de contourner l'inhibition de BRAF en activant directement MEK.

Dans le but de contourner ces résistances, des IKs de seconde génération ont été développés comme l'afatinib pour la mutation de l'EGFR, le dasatinib, bosutinib et nilotinib pour les mutations de Bcr-Abl [249]. De manière peu surprenante, de nouvelles mutations ont été sélectionnées pour s'adapter à cette deuxième génération d'IKs comme la mutation Thr315Ile dans le cas de Bcr-Abl, justifiant le développement d'une troisième génération de

composés tels que le ponatinib pour la mutation Bcr-Abl ou l'osimertinib pour la mutation Thr790M de l'EGFR [250].

En ce qui concerne la résistance au vémurafénib, les mécanismes de contournement de BRAF par activation de la voie au niveau de MEK ont conduit à développer des stratégies d'associations entre inhibiteurs de BRAF et de MEK comme les associations du vémurafénib avec le cobimétinib ou du dabrafénib avec le tramétinib approuvées dans le traitement du mélanome [251]. Paradoxalement, le développement de ces combinaisons, même s'il repose sur des bases mécanistiques rationnelles, a été réalisé sans nécessairement tenir compte des effets réciproques de ces inhibiteurs en termes de métabolisation. C'est précisément ce que nous avons voulu aborder dans ce travail de Thèse en évaluant l'effet du métabolisme au sens large sur l'efficacité des inhibiteurs de kinases.

Inhibiteurs de Kinase	Cibles thérapeutiques	Indications thérapeutiques
Inhibiteurs de sérine thréonine Kinases		
Vémurafenib (<i>Zelboraf</i>)	B-RAF	Mélanome avec mutation V600E
Dabrafenib (<i>Tafinlar</i>)	B-RAF	Mélanome avec mutation V600E/K
Palbociclib (<i>Ibrance</i>)	CDK 4 et 6	Cancer du sein positif pour les récepteurs hormonaux et négatif pour HER2
Inhibiteurs de lipide Kinases		
Idésalib (<i>Zydelig</i>)	phosphatidylinositol 3-kinase p110delta	Leucémie lymphoïde chronique; Lymphome folliculaire
Inhibiteurs de MEK		
Cobimetinib (<i>Cotellic</i>)	MEK	Mélanome associé avec le Vémurafenib
Trametinib (<i>Mekinist</i>)	MEK	Mélanome associé avec le Dabrafenib
Inhibiteurs réversibles des Tyrosines Kinases cytoplasmiques		
Imatinib (<i>Gleevec</i>)	BCR-ABL; c-KIT; PDGFR	Leucémies myéloïdes chronique et lymphoïdes aigüe avec chromosome Philiadelphie positive (Ph+); Syndrome myéلودysplasique-myéloprolifératif avec réarrangement du PDGFR; Tumeurs stromales gastro-intestinales; Syndrome hyperéosinophiliques
Nilotinib (<i>Tasigna</i>)	BCR-ABL	Leucémie myéloïde chronique (Ph+)
Ponatinib (<i>Iclusig</i>)	BCR-ABL	Leucémie myéloïde chronique (Ph+)
Bosutinib (<i>Bosulif</i>)	BCR-ABL; Src	Leucémie myéloïde chronique (Ph+)
Dasatinib (<i>Sprycel</i>)	BCR-ABL; Src	Leucémies myéloïdes chronique et lymphoïdes aigüe avec chromosome Philiadelphie positive (Ph+)
Ruxolitinib (<i>Jakavi</i>)	JAK1 et 2	Myélofibrose
Inhibiteurs réversibles des récepteurs des Tyrosines Kinases		
Géfitinib (<i>Iressa</i>)	EGFR (HER1)	Cancers bronchiques non à petites cellules
Erlotinib (<i>Tarceva</i>)	EGFR (HER1)	Cancers bronchiques non à petites cellules; Cancer du pancréas en association avec la gemcitabine
Lapatinib (<i>Tyverb</i>)	EGFR (HER1 et 2)	Cancer du sein HER2 (+)
Vandétanib (<i>Caprelsa</i>)	VEGFR; EGFR	Carcinome médullaire de la thyroïde
Sorafénib (<i>Nexavar</i>)	VEGFR; PDGFR; RAF; MEK; ERK	Carcinome Hépatocellulaire
Sunitinib (<i>Sutent</i>)	FLT3; PDGFR; VEGFR; c-KIT	Carcinome Rénal; Tumeurs stromales gastro-intestinales résistant à l'imatinib; Tumeurs neuroendocrines du pancréas
Axitinib (<i>Inlyta</i>)	VEGFR 1,2,3 ; PDGFR; c-KIT	Carcinome Rénal avancé
Nintédanib (<i>Ofev</i>)	PDGFR; FGFR, VEGFR	Fibrose pulmonaire idiopathique
Régorafénib (<i>Stivarga</i>)	VEGFR2; TIE2	Cancer colorectal métastatique; Tumeurs stromales gastro-intestinales avancées
Pazopanib (<i>Votrient</i>)	VEGFR 1,2,3	Carcinome Rénal
Lenvatinib (<i>Lenvima</i>)	VEGFR; PDGFR; c-KIT; FGFR	Carcinome thyroïdien différencié
Crizotinib (<i>Xalkori</i>)	ALK; HGFR; c-MET	Cancers bronchiques non à petites cellules; Lymphomes anaplasiques (ALK+)
Céritinib (<i>Zykadia</i>)	ALK; c-MET	Cancer bronchique non à petites cellules
Alectinib (<i>Alecensa</i>)	ALK; RET	Cancer bronchique non à petites cellules
Cabozantinib (<i>Cometriq</i>)	c-MET; VEGFR2	Cancer médullaire de la thyroïde
Inhibiteurs irréversibles des Tyrosines Kinases		
Afatinib (<i>Gilotrif</i>)	EGFR (HER1-4)	Cancer bronchique non à petites cellules
Ibrutinib (<i>Imbruvica</i>)	Tyrosine Kinase de Bruton	Lymphome des cellules du manteau
Osimertinib (<i>Tagrisso</i>)	EGFR (Mutation T790M)	Cancer bronchique non à petites cellules

Tableau 11 : Classification des inhibiteurs de kinases majoritairement utilisés en cancérologie.(d'après [3], [240], [249]).

3. Pharmacocinétique des Inhibiteurs de Kinases

La plupart des inhibiteurs de kinases utilisés en clinique sont de petites molécules lipophiles à longue demi-vie qui sont généralement administrées quotidiennement par voie orale, ce qui est plus confortable pour le patient mais pose de réels problèmes d'observance. De nombreuses études de compliance réalisées sur les IKs comme l'imatinib ont montré que l'une des principales causes à l'échappement thérapeutique de certains patients est le manque d'observance [252], [253]. A cela s'ajoute l'effet de la prise alimentaire qui peut directement modifier la biodisponibilité de certains de ces inhibiteurs. C'est notamment le cas de l'imatinib, dont la prise en considération de l'alimentation est désormais utilisé dans le suivi thérapeutique personnalisé de cette molécule [3].

Une fois dans le compartiment sanguin, les IKs ont un grand volume de distribution et sont très fortement liées aux protéines plasmatiques (albumine ou AGP), ne laissant qu'une petite fraction libre active. Ainsi, un patient présentant une hypoalbuminémie associée à une dénutrition ou une protéinurie peut être confronté à une modification de l'efficacité des IKs. Dans le cas du sunitinib et du sorafenib, un faible index de masse corporelle et la sarcopénie sont d'ailleurs des marqueurs pour définir la dose limite non toxique à administrer [254], [255].

La majorité des IKs sont métabolisés dans le foie, principalement par les enzymes de phase I. Certains variants du CYP3A4 ou de l'UGT1A9 sont respectivement à l'origine de toxicités au sunitinib, ou au sorafenib [256], [257]. Les différents transporteurs d'influx ou d'efflux ont également un rôle majeur à jouer dans la pharmacocinétique des IKs, dans la mesure où ils ne prennent pas nécessairement en charge de manière identique les différents métabolites actifs et inactifs de chaque inhibiteur [3].

L'ensemble de ces paramètres expliquent donc pourquoi une assez grande variabilité inter-individuelle de réponse aux IKs, mais aussi de profil de toxicité est observée en clinique pour la même dose d'inhibiteur administrée. Il a été décrit des variations de concentrations à l'équilibre du géfitinib d'environ 20 fois chez des patients atteints d'un cancer du poumon et traités par une dose unique de 250 mg [258]. Du fait de cette large variabilité pharmacocinétique des IKs, il est de plus en plus recommandé de réaliser un dosage sanguin en cours de traitement, afin d'améliorer leur efficacité et limiter leurs toxicités [259].

4. Les IKs substrats et inhibiteurs des transporteurs ABC au niveau tumoral

En dehors de la variabilité inter-individuelle de la réponse aux IKs liée au contexte génétique de chaque patient, la réponse tumorale aux thérapies ciblées est également conditionnée par d'autres déterminants moléculaires du métabolisme et du transport au niveau intratumoral (transporteurs ABC et cytochromes P450) [260]. L'un des principaux obstacles au succès des IKs sont les pompes à efflux responsables de « Multi-Drug Resistance », dont la majorité des IKs sont des substrats. Un grand nombre d'études ayant utilisé des lignées de leucémies Bcr-Abl positives (K562, CCRFCM,...) ont corrélé la résistance de l'imatinib avec la surexpression d'ABCB1 [261], [262]. ABCG2 en association avec ABCB1, a également été démontré comme impliqué dans la résistance des lignées leucémiques (K562) à l'imatinib, au nilotinib et au dasatinib [263]. Cette association des deux pompes dans la résistance des lignées tumorales, a aussi été décrit pour de nombreux IK substrats des deux transporteurs, comme les agents ciblant l'EGFR, le géfitinib, l'erlotinib et le lapatinib [264]. Dernièrement, il a été démontré que certains IKs (l'imatinib, le dasatinib, le géfitinib, l'erlotinib, le lapatinib,...) en plus d'être des substrats des pompes à efflux ABCB1 et ABCG2, seraient aussi des inhibiteurs de l'activité de ces transporteurs lorsqu'ils sont utilisés à de fortes concentrations (**Tableau 12**) [264]. A ce jour, certains IKs sont testés en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles sur la base que ces agents anticancéreux ayant deux mécanismes d'action différents, leur association pourrait améliorer la survie du patient, comme la combinaison lapatinib-capécitabine dans le cancer du sein [265]. Cependant, depuis la découverte de la particularité inhibitrice des IKs sur les pompes à efflux, de nouvelles associations entre les IKs et les chimiothérapies commencent à être étudiées dans le but d'utiliser ces propriétés particulières pour contourner les chimiorésistances acquises liées aux transporteurs ABC. L'étude de *Yanase et al* a démontré que l'utilisation du géfitinib permet l'accumulation du topotécan dans les lignées K562 surexprimant ABCG2 et une amélioration de la survie des souris transfectées par les lignées P388 surexprimant ABCG2 traitées par l'irinotécan [266]. D'autres études ont aussi démontré l'effet sensibilisant de l'association erlotinib avec la vincristine ou le paclitaxel dans des cellules cancéreuses surexprimant ABCB1 (KB-C2), ou encore son effet re-sensibilisant dans des cellules surexprimant ABCG2 (HEK293) devenues résistantes à la mitoxantrone ou au SN38 [267].

Ce type de stratégie est également utilisé pour des associations d'IKs. Deux études ont par exemple démontré que le nilotinib ou l'imatinib utilisés à des concentrations où ils inhibent ABCB1, permettait d'augmenter respectivement la concentration intracellulaire de dasatinib et de nilotinib dans des cellules leucémiques [268], [269]. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que ce type d'associations peut également conduire à augmenter le risque d'effets toxiques, notamment par inhibition des pompes à efflux au niveau gastro-intestinal [264]. Par ailleurs, il a été décrit une augmentation de l'expression d'ABCB1 et d'ABCG2 lors d'un traitement prolongé à l'imatinib, ayant pour conséquence une diminution des concentrations intracellulaires de médicament [270]. Il est probable que cette augmentation de l'expression d'ABCB1 et d'ABCG2 soit lié, au moins en partie, à l'activation du récepteur nucléaire PXR comme nous essaierons de le discuter plus loin sur la base de nos résultats expérimentaux.

Inhibiteurs de Kinase	ABCB1		ABCG2	
	Substrats	Inhibiteurs	Substrats	Inhibiteurs
Afatinib	++	++	++	++
Imatinib	+++	+++	+++	+++
Géfitinib	+++	ND	+++	+++
Erlotinib	+++	+++	+++	+++
Sorafenib		ND	+++	ND
Dasatinib	+++	+	+++	++
Sunitinib	+++	+++	+++	+++
Lapatinib	+++	+++	+++	+++
Nilotinib	+	+++	+++	+++
Crizotinib	+++	+++		
Vandétanib		ND	+++	+++
Vémurafenib	+++	+	+++	+++
Axitinib	+++	+++	+	+++
Bosutinib		+++		+++
Pazopanib	++	ND	+++	ND
Ponatinib	+++	++	+++	+++
Dabrafenib	+++	ND	+++	ND
Canertinib	ND	+++	+++	+++
Cédiranib	+++	+++	+++	
Danuseritinib	ND	ND	+++	ND

Tableau 12 : Profil des inhibiteurs de kinases vis-à-vis des ABC transporteurs ABCB1 et ABCG2. (d'après [3], [264], [271]).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, beaucoup de ces inhibiteurs de kinases ont été testés en clinique dans le cancer de la prostate résistant à la castration et, hormis quelques réponses, ont donné des résultats décevants sans que les raisons de ces échecs n'aient été étudiées en détails. L'hypothèse que nous avons voulu tester est que l'absence de réponse aux inhibiteurs de kinases soit liée, au moins en partie, à des problèmes de métabolisme et à une dérégulation de facteurs clés impliqués dans ses différentes phases. Mon travail de Thèse a donc consisté à étudier le rôle de PXR et de ses gènes cibles dans la réponse cellulaire à un panel d'inhibiteurs de kinases dans des modèles de lignées cellulaires de cancers de la prostate et à rechercher une éventuelle corrélation entre l'expression de ces gènes et la résistance à ces agents. Nous nous sommes intéressés également à la possibilité que les inhibiteurs de kinases puissent activer eux-mêmes PXR et leur propre métabolisme ou celui de médicaments qui sont co-administrés. Etant donné que ces inhibiteurs sont rarement utilisés seuls, ce travail vise également à apporter un rationnel biologique pour prédire les associations les plus efficaces entre inhibiteur de kinases ou entre un inhibiteur de kinase et les hormonothérapies ou les chimiothérapies utilisées dans le traitement du cancer de la prostate.

OBJECTIFS

1. Sélectionner des gènes du métabolisme et des IKs par une approche *in silico*.
2. Evaluer le niveau d'expression de PXR et de ses gènes cibles dans les lignées et le cancer de prostate.
3. Evaluer l'effet de l'expression et de l'activité de PXR sur la sensibilité de différentes lignées de cancer de prostate sauvages, ou sur-exprimant PXR.
4. Investiguer l'effet ligand agoniste de divers IKs sur PXR.
5. Identifier des combinaisons synergiques ou antagonistes sur la base de l'effet agoniste des IKs sur PXR.

B MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Sélection de gènes du métabolisme et du transport corrélés aux IKs.

Le premier objectif de notre travail était d'établir une liste de gènes du métabolisme pouvant avoir un rôle à jouer dans la réponse aux inhibiteurs de kinases et une liste d'inhibiteurs de kinases déjà utilisés dans le traitement d'un certain nombre de cancers, ou ayant fait l'objet d'essais cliniques dans le cancer de la prostate de stade avancés. Nous avons pour cela croisé deux sources de données : (i) le site PharmGKB accessible à l'adresse (<https://www.pharmgkb.org/>) qui regroupe un très grand nombre d'informations cliniques relatives aux dosages de multiples médicaments, aux relations gènes-médicaments, ou relatives à leurs métabolismes, (ii) les données de la littérature ayant traités aux essais cliniques avec les inhibiteurs de kinases dans le cancer de la prostate qu'ils soient terminés ou en cours. Ces essais sont répertoriés dans une base de données dédiée (<https://clinicaltrials.gov/>), où une recherche par médicament et/ou localisation tumorale est possible.

1. Sélection des inhibiteurs de kinases testés ou en cours d'évaluation clinique dans le cancer de la prostate

Cette sélection a principalement été réalisée à partir de données de la bibliographie ayant rapporté les résultats d'essais cliniques qui ont testés des inhibiteurs de kinases dans le cancer de la prostate, ces essais ayant d'ailleurs souvent donné des résultats décevants. Nous avons également interrogé la base de données *clinicaltrials.gov/* pour répertorier les essais en cours avec les inhibiteurs de kinases et nous avons sélectionné un panel de 12 IKs (**Tableau 13**). Les molécules retenues sont Erlotinib, Géfitinib, Lapatinib, Vémurafénib, Cobimétinib, Dabrafénib, Tramétinib, Afatinib, Dasatinib, Pazopanib, Sorafénib, Imatinib (**Tableau 14**).

IK	Cibles	Phase	Résultat	Référence
Erlotinib	EGFR	II	Modéré	NCT00272038
Géfitinib			Pas de résultat	NCT00265070
Afatinib*	EGFR	II	Recrutement	NCT02465060
Lapatinib	HER2, EGFR, ERbB	II	Négatif	NCT00246753
Imatinib	PDGFR, BCR-Abl,Kit RSCF,DDR1-2,CSF-1R	II	Négatif	NCT00251225
Dasatinib	Abl, Src, c-Kit, SRC, EPH, PDGFR	III	Négatif	NCT00744497
Pazopanib	VEGFR1, 2, 3	III	Recrutement	NCT02044354
Sorafenib	RAF-1, B-RAF, VEGFR	II	Modéré	NCT00090545
Dabrafénib*	BRAF V600E	II	Recrutement	NCT02465060
Vémurafénib	BRAF V600E	Inconnu	Inconnu	NCT02208583
Tramétinib	MEK	II	Pas encore ouvert	NCT02881242
Cobimétinib	MEK			

Tableau 13 Tableau récapitulatif des derniers essais cliniques utilisant les IKs dans le cancer de la prostate (*clinicaltrials.gov*).

* : 2 essais « basket », incluant le dabrafénib, l'afatinib.

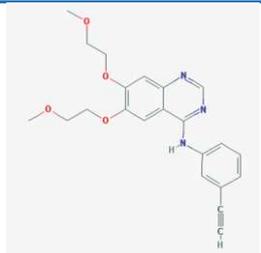
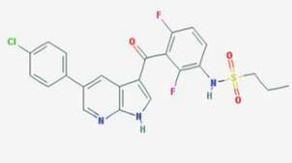
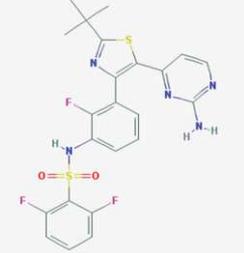
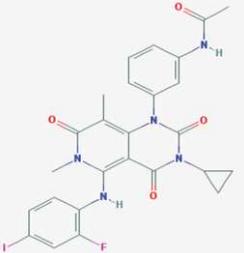
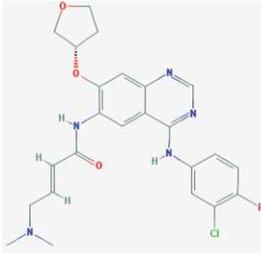
Dénomination	Formules Chimiques	Structure en 2 dimensions	Action Pharmacologique
Erlotinib	C22H23N3O4		Anti-EGFR (ErbB1)
Vémurafenib	C23H18ClF2N3O3S		Anti- BRAF (V600E)
Cobimetinib	C21H21F3IN3O2		Anti- MEK 1
Dabrafenib	C23H20F3N5O2S2		Anti- BRAF (V600E)
Tramétinib	C26H23FIN5O4		Anti- MEK 1 et 2
Afatinib	C24H25ClFN5O3		Anti-EGFR (ErbB1,2,4)

Tableau 14 : Structure chimique et mode d'action des principaux IKs sélectionnés (Pubchem).

2. Sélection des gènes du système ADME via le site PharmGKB

Nous avons utilisé le site PharmGKB, pour la sélection de différents gènes responsables de la métabolisation et du transport de la plupart des IKs. En effet, les IKs présentent des voies métaboliques complexes avec des métabolites actifs ou inactifs dont la prise en charge par les transporteurs d'influx et d'efflux peut être différente d'une molécule à l'autre, comme le montre la **figure 11** avec l'erlotinib et le pazoapanib. L'analyse de ces données nous a permis de sélectionner 26 gènes du métabolisme et du transport auxquels nous avons associé les gènes *NR1I2* et *NR1I3* codant pour les xénorécepteurs qui régulent l'expression de la plupart d'entre eux (**Tableau 15**).

Enzymes de phase 0	Enzymes de phase 1	Enzymes de phase 2	Enzymes de phase 3	Xénorécepteurs
SLC01B1	CYP3A4	UGT1A9	ABCB1	NR1I2
SLC01B3	CYP3A5	UGT1A1	ABCC1	NR1I3
SLC01A2	CYP2C19	FMO 3	ABCC2	
SLC22A1	CYP2C8		ABCC4	
SLC22A2	CYP2D6		ABCG2	
SLC22A4	CYP2A6			
SLC22A5	CYP1A2			
	CYP2B6			
	CYP2C9			
	CYP2E1			
	CYP1B1			
	CYP1A1			

Tableau 15 : Gènes du métabolisme et du transport des IKs sélectionnés grâce au site PharmGKB.

II. Expression de PXR dans des coupes de tumeurs de prostate

Cette partie du travail a été réalisée dans le service d'anatomo-pathologie au CHU de Tours par le Pr Gaëlle Fromont-Hankard.

1. Patients et Méthodes

L'analyse a été effectuée à partir de pièces opératoires provenant de 3 cohortes de patients :

- la première contient les échantillons tumoraux de 449 patients présentant un cancer de la prostate cliniquement localisé (CLC), et traités par prostatectomie radicale. Les échantillons utilisés proviennent des pièces de prostatectomie radicale.

- la deuxième contient les échantillons tumoraux de 48 patients présentant un cancer de la prostate avancé et résistant à la castration (CRPC). Les échantillons utilisés proviennent de matériel de résection effectuée pour obstruction urinaire.

- La troisième contient les échantillons tumoraux de 15 patients présentant un cancer de la prostate métastatique. Les échantillons utilisés proviennent des prélèvements effectués sur les sites métastatiques, soit ganglionnaires, soit osseux.

2. *Tissue MicroArray* (TMA)

La technique de TMA permet d'analyser sur une seule lame, l'expression d'une protéine sur un grand nombre d'échantillons de tissus inclus en paraffine, aussi appelés « blocs ».

Les zones d'intérêt ont été repérées au préalable par lecture des lames originelles colorées en Hématoxyline Eosine Safran (HES). Le plan de disposition des carottes sur les blocs de TMA a été réalisé grâce à un logiciel (TMA designer 2). Le bloc de TMA, contenant les 338 carottes de tissu tumoral étudiées, a été construit à l'aide de l'appareil dédié semi-automatique : le Manual Tissue Arrayer MTA Booster, Version 1.01, Alphélys, France. Pour chaque tumeur, trois carottes cylindriques de 0,6 mm de diamètre ont été prélevées dans les zones tumorales repérées sur le bloc de paraffine donneur et transférées vers le bloc de paraffine vierge receveur. Après une étape de déparaffinage et de déshydratation, une coloration HES sur des coupes étagées a été réalisée en premier lieu, pour contrôler la qualité et la morphologie des échantillons.

3. Immunohistochimie

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur des coupes de 5 μm des blocs de TMA. Les lames ont été déparaffinées, puis réhydratées et chauffées dans une solution tampon à pH = 6 pour l'anticorps anti-PXR (G11) et 8,4 pour le Ki67, afin de démasquer les sites antigéniques. Ensuite, la peroxidase endogène a été bloquée avec du peroxyde d'hydrogène 3% et l'anticorps anti-PXR (G11) ou le Ki67 ont été incubés. Les lames ont ensuite été révélées selon la méthode de la streptavidine-biotine-peroxydase (kit Dako LSAB), puis contre colorées à l'hématoxyline. Les contrôles négatifs ont été réalisés en omettant l'anticorps primaire ou en incubant un anticorps non pertinent. L'analyse statistique des comparaisons entre groupes de l'expression qualitative (négative ou positive) de PXR a été réalisée par des tests de χ^2 . Ki67 a été évalué de façon quantitative en comptant le pourcentage de cellules marquées dans les carcinomes de tissu prostatique. Les comparaisons entre groupes ont été réalisées par le test non paramétrique de Mann et Withney.

III. Approche *In Vitro*

1. Les lignées cancéreuses de prostate

La lignée PC3 est une lignée d'adénocarcinome de prostate établie à partir d'une métastase osseuse chez un patient atteint d'un cancer de prostate de grade IV [272]. Cette lignée n'exprime pas le récepteur des androgènes.

La lignée DU145 est une lignée d'adénocarcinome de prostate établie à partir d'une métastase cérébrale d'un patient atteint d'un cancer de la prostate [273]. Cette lignée aussi, n'exprime pas le récepteur des androgènes.

La lignée LnCaP, *Lymph Node Cancer Prostate*, fut établie à partir d'un ganglion lymphatique sous-claviculaire de patient atteint d'un cancer de la prostate résistant à la déprivation androgénique. Cette lignée exprime un récepteur des androgènes muté dans son domaine LBD (T878A) [274]. La lignée LnCaP est sensible aux androgènes, aux antiandrogènes mais aussi aux estrogènes et à la progestérone [275].

La lignée 22RV1 est une lignée d'adénocarcinome de prostate établie (Sramkoski RM, et al), par xéno greffes successives de cellules tumorales humaines CWR22 dans la souris *nude*. Cette lignée exprime un récepteur des androgènes muté (H874Y). Elle présente également la particularité d'exprimer le variant d'épissage du récepteur des androgènes AR-V7 responsable de résistances cliniques aux hormonothérapies [276].

2. Conditions de culture

La lignée DU145 est cultivée dans du milieu DMEM (Gibco) contenant du GlutaMax et supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal. Les lignées LnCaP et 22RV1 sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 contenant du GlutaMax et supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF).

Toutes les lignées sont maintenues en culture dans des flasques de 75cm² dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère saturée en humidité (90%) et contenant 5% de CO₂. Lorsqu'elles arrivent à sub-confluence, les cellules sont lavées par du DPBS (Fischer) et sont détachées de leur support par incubation avec de la trypsine-EDTA (Fischer) avant d'être remise en suspension dans du milieu neuf, pour être repiquées dans une nouvelle flasque.

Pour les lignées androgéno-dépendantes, les tests de cytotoxicité et d'induction de l'activité de PXR sont réalisés avec du milieu contenant 5% de sérum de veau déstéroïdé

auquel il est ajouté 0,1nM de méthyltrienolone (R1881), un stéroïde-androgène-anabolisant de synthèse. La déstéroïdation est réalisée par incubation de 500 mL de sérum avec 5 g de charbon activé (*activated charcoal norit sigma Aldrich 97876 1kg*) et 0,5g de Dextran (*sigma Aldrich D8821-100g*) pendant 30min au bain-marie à 56°C sous agitation. Le milieu est centrifugé à 7000 rpm pendant 40 min à 4°C. Le surnageant est de nouveau incubé avec un mélange charbon-dextran dans les mêmes conditions et le mélange est centrifugé 2h à 7000 rpm et à 4°C. Le surnageant est ensuite filtré sur un filtre 0,45 µM puis sur un filtre de 0,22 µM, et est aliquoté et conservé à 4°C.

3. Extraction ARN et *Reverse Transcription*

3.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est effectuée à l'aide du kit *Quick RNA Miniprep* (Zymo-Research) selon les recommandations du fournisseur. 1,5million de cellules sont ensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm². Le lendemain les cellules sont lavées avec du PBS, détachées avec un grattoir dans 10 mL de PBS froid, et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot cellulaire est ensuite lysé avec le tampon Tampon de lyse des ARN (300 µL si moins de 5 x 10⁶ cellules ou 600 µL si plus de 5 x 10⁶ cellules). Le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 1 minute et le surnageant est déposé sur une colonne *Spin away Filter* qui est à son tour centrifugée à 10 000 g pendant 1 minute. Un volume d'éthanol absolu est ajouté à l'éluat et le mélange est déposé sur une colonne Zymo-Spin IIIICG et centrifugé 30 secondes à 12.000 g. La colonne est rincée avec 400µL d'un tampon de rinçage et par centrifugation de 30 secondes à 12.000 g. Ensuite, 100 µL du mix de DNase I (10 µL RNase-free DNase I, 10 µL de 10X d'un tampon de réaction, 80 µL d'un tampon de rinçage) est déposé sur la colonne et incubé à 37°C pendant 15 minutes. La colonne est ensuite centrifugée 30 secondes à 12.000 g et rincée trois fois avec 400 µL de tampon de rinçage. La dernière centrifugation est de 2 minutes à 12.000 g. Les ARN totaux sont ensuite élués par 20-30µl d'eau *DNA/Rnase-free* par centrifugation de la colonne à 12.000 g pendant 30 secondes. Leur concentration est mesurée par une lecture de l'absorbance à 260 nm avec le *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific), sachant que 1 DO à 260 nm = 44 ng/µL d'ARN. Les ARNs sont conservés à -80°C.

3.2. Reverse Transcription

La transcription inverse des ARN totaux est réalisée à l'aide d'amorces (*Random primers*) et d'une enzyme à activité ADN polymérase ARN-dépendante, la *Moloney-Murine Leukemia Virus-Reverse transcriptase* (M-MLV-RT). Les ARN totaux (1µg) sont dénaturés pendant 10 minutes à 70°C. On ajoute à ces ARN le mélange réactionnel détaillé dans le **Tableau 16** pour un volume final de 20 µL.

Le mélange est pré-incubé à 23°C pendant 10 minutes afin de permettre l'hybridation des amorces. Puis, la transcription inverse se fait à 42°C pendant 45 minutes. Enfin, l'enzyme est inactivée en chauffant à 99°C pendant 3 minutes pour stopper la réaction.

L'ensemble de ces réactions est réalisé sur *Thermocycler Biometra Tpersonnal*. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

Mélange de RT	
Réactifs	Volume par échantillon (µL)
Tampon (5X)	4
Amorces (3 µg/µL)	0,4
dNTP (10mM)	4,5
DTT (0.1 M)	2,5
MgCl₂ (25 mM)	1,5
M-MLV-RT (200 U/µL)	0,5
H₂O	Qsp 20

Tableau 16 : Mélange réactionnel utilisé pour la *Reverse Transcription*.

4 PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Nous avons défini les couples d'amorces spécifiques de chacun de nos gènes d'intérêts à l'aide du logiciel *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Nous avons paramétré ce logiciel afin qu'il nous sélectionne des amorces ayant une taille d'environ 20 paires de bases, une température d'hybridation entre 60-65°C et un pourcentage en GC en moyenne de 50%. Les amorces ont été synthétisées par Eurofins (**Tableau 17**). Elles sont reçues lyophilisées et sont re-suspendues à une concentration stock de 100 µM et conservées à -20 °C. Elles sont ensuite aliquotées et utilisées à une concentration finale de 10 µM.

Nom de l'Oligo	Séquence (5'→3')	Tm [°C]	Taux de GC	Echelle de Synthèse
NR1I2 F	GGCATGAAGAAGGAGATGA (19)	54,5	47,40%	0.01 µmol
NR1I2 R	TGGGAGAAGGTAGTGTCAAA (20)	55,3	45%	0.01 µmol
NR1I3 F	TCATCCATCACCAGCCCTTG (20)	59,4	55%	0.01 µmol
NR1I3 R	GAGGCCCGCAGAGGAAGTTT (20)	61,4	60%	0.01 µmol
CYP3A4 F	TATTCTGTCTTCACAAACCG (20)	53,2	40%	0.01 µmol
CYP3A4 R	TTTCTCACCAACACATCTCC (20)	55,3	45%	0.01 µmol
CYP3A5 F	TGACCCAAAGTACTGGACAG (20)	57,3	50%	0.01 µmol
CYP3A5 R	TGAAGAAGTCCTTGCGTGTC (20)	57,3	50%	0.01 µmol
CYP2C9 F	CCTTGCTGCTGTCTCTCAT (20)	57,3	50%	0.01 µmol
CYP2C9 R	GCTTCCTTCACTGCTTCATA (20)	55,3	45%	0.01 µmol
ABCB1 F	GGTGCTGGTTGCTGCTTACA (20)	59,4	55%	0.01 µmol
ABCB1 R	TGGCCAAAATCACAAGGGT (19)	54,5	47,40%	0.01 µmol
ABCG2 F	TGCAACATGTACTGGCGAAGA (21)	57,9	47,60%	0.01 µmol
ABCG2 R	TCTTCCACAAGCCCCAGG (18)	58,2	61,10%	0.01 µmol
SLC01A2 F	CACCCTGAAGAGCAACATGG (20)	59,4	55%	0.01 µmol
SLC01A2R	TTGCCAACAGAAACATCTTCAAC (23)	57,1	39,10%	0.01 µmol
UGT1A1 F	AAATCCACTATCCCAGGAAT (20)	53,2	40%	0.01 µmol
UGT1A1 R	AGTATCGTGTGTTTCGCAAG (20)	55,3	45%	0.01 µmol
UGT1A9 F	GAGGAACATTTATTATGCCACCG (23)	58,9	43,50%	0.01 µmol
UGT1A9 R	GCAACAACCAAATTGATGTGTG (22)	56,5	40,90%	0.01 µmol
ABCC2 F	CTGCCTCTTCAGAATCTTAG (20)	55,3	45%	0.01 µmol
ABCC2 R	ATAACCCAAGTTGCAGGCT (19)	54,5	47,40%	0.01 µmol
CYP1A2 F	GCACAACAAGGGACACAACG (20)	59,4	55%	0.01 µmol
CYP1A2 R	ACAGCTCTGGGTCATGGTT (19)	56,7	52,60%	0.01 µmol
CYP1A1 F	CCAACCCTTCCCTGAATGCC (20)	61,4	60%	0.01 µmol
CYP1A1 R	CGGATGTGGCCCTTCTCAAA (20)	59,4	55%	0.01 µmol
CYP1B1 F	GAACGTACCGGCCACTATCA (20)	59,4	55%	0.01 µmol
CYP1B1 R	TCAGGATACCTGGTGAAGAGGA (22)	60,3	50%	0.01 µmol
CYP2D6 F	GCGACCAGAGATGGGTGA (18)	58,2	61,10%	0.01 µmol
CYP2D6 R	GGTGATGAGTGTCGTTCCCTTAG (23)	62,4	52,20%	0.01 µmol
SLC22A2 F	CAGCCTGGACACCAACAGGA (20)	61,4	60%	0.01 µmol
SLC22A2 R	AGGCAGAGCTTACGGCCAAA (20)	59,4	55%	0.01 µmol
SLC22A4 F	ATGTCTTTGCTGCTATGGATGC (22)	58,4	45,50%	0.01 µmol
SLC22A4 R	CAGTTCAGGTAGGCATCTCCA (21)	59,8	52,40%	0.01 µmol
CYP2E1 F	CTCCCTGGCTCCAGCTTTAC (20)	61,4	60%	0.01 µmol
CYP2E1 R	CCAGAGATTGATGGTGCTCCT (21)	59,8	52,40%	0.01 µmol
GAPDH F	AATTGAGCCCGCAGCCTCCC (20)	63,5	65%	0.01 µmol
GAPDH R	CCAGGCGCCCAATACGACCA (20)	63,5	65%	0.01 µmol
HPRT F	CTGACCTGCTGGATTACA (18)	53,7	50%	0.01 µmol
HPRT R	GCGACCTTGACCATCTTT (18)	53,7	50%	0.01 µmol
Actine F	AGCACGGCATCGTCACCAACT (21)	61,8	57,10%	0.01 µmol
Actine R	TGGCTGGGGTGTGTAAGGTCT (21)	61,8	57,10%	0.01 µmol

Tableau 17 : Séquence des amorces de qPCR.

4.1 Protocole de PCR quantitative

Nous avons quantifié l'expression de NR1H2 et des différents gènes du métabolisme et du transport par PCR quantitative en temps réel avec l'appareil LightCycler 480 de chez Roche en plaques 96 puits en utilisant comme réactif de PCR, le fluorophore SYBRGreen (*Roche Diagnostics*). La composition du mélange réactionnel pour chaque tube est détaillée ci-après.

Mélange réactionnel	1 Tube (µL)
H2O	6
MasterMix 2X	10
Primer F (10µM)	1
Primer R (10µM)	1
ADNc	2
Total	20

Tableau 18 : Mélange réactionnel utilisé pour la PCR quantitative.

Le protocole d'amplification par PCR quantitative est décrit ci-dessous.

Activation de la <i>Taq polymerase</i>		
10 min à 95°C		
Amplification		
Dénaturation des brins d'ADN	15 sec à 95°C	} 50 Cycles
Hybridation des <i>Primers</i>	15 sec à 60°C	
Elongation	15 sec à 72°C	
Courbe de Fusion		
De 50°C à 95°C en 2 min		
Refroidissement		
15°C		

Tableau 19 : Protocole d'amplification par qPCR.

L'HPRT et la GAPDH ont été utilisés comme gènes de ménage pour chacune des expériences. La quantification de l'expression des gènes d'intérêt a été réalisée par le calcul du $\Delta\Delta Ct$ avec les deux gènes de ménage.

$\Delta Ct = Ct$ du gène d'intérêt – Ct du gène de ménage permet de normaliser l'expression du gène d'intérêt par rapport au gène de ménage au sein d'un échantillon.

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ échantillon 1 – ΔCt échantillon 2, permet de calculer la variation entre 2 échantillons. La détermination de la variation du nombre de copies du gène d'intérêt entre deux échantillons est égale à $2^{-\Delta\Delta Ct}$

A noter que des ARN de la lignée hépatique HepaRG nous ont été fournis par le Dr Gerbal-Chaloin de l'IRB de Montpellier, pour être utilisé comme « calibrateur » de la réaction de qPCR. Les résultats présentés dans cette thèse, ont été obtenus à partir de 3 expériences biologiques différentes. Seuls les résultats présentant la déméthylation par la 5-aza-2-déoxycytidine ont été obtenus à partir de deux expériences différentes.

5 Extraction des protéines et Western Blotting

5.1 Extraction et dosage protéique

L'ensemble des étapes d'extraction des protéines est réalisé à 4°C. Les cellules en phase de croissance sont lavées, détachées par grattage dans 2 mL de PBS froid et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes. Les culots cellulaires sont lysés par l'ajout de tampon RIPA, à raison de 100 µL de tampon pour 1 million de cellules et le lysat est incubé 10 minutes dans la glace. Les tubes sont centrifugés à 14 000 g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant contenant les protéines est récupéré et aliquoté pour être conservé à - 80°C.

Le dosage des protéines est réalisé en plaques 96-puits par le test colorimétrique BCA (*Bicinchoninic Acid Assay*) » selon le protocole du fournisseur. 25 µL de chaque échantillon sont mélangés à 200 µL d'un mélange des réactifs A et B (1 volume du réactif A pour 50 volume du réactif B) et incubés à 37°C pendant 30 min. L'absorbance est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 560 nm. Une gamme de dilutions de BSA (*Bovin Serum Albumin*) est utilisée pour calibration.

5.2 Western Blot

Le Western blotting est réalisé avec 20µg de protéines sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE à 10% composé d'un gel de séparation et d'un gel de concentration qui permet de concentrer les protéines avant la pénétration dans le *running gel*. Leurs compositions sont détaillées ci-dessous.

-gel de Séparation à 10 %

- 4,8 mL H₂O
- 2,5 mL d'acrylamide 40 %
- 2,5 mL Tris 1M, pH 8,8
- 100 µL de SDS 10 %
- 100 µL d'APS
- 8 µL de Temed

-gel de concentration à 5 %:

- 3,6 mL H₂O
- 625 µL de Tris 1M, pH 6,8
- 630 µL d'acrylamide 40 %
- 50 µL de SDS 10 %
- 50 µL d'APS
- 5 µL de Temed

Un volume de tampon de charge Laemli 4X (*Biorad*) est ajouté aux échantillons et le mélange est incubé 5 minutes à 95°C avant d'être déposé sur le gel. La migration est réalisée dans des cuves Biorad dans du tampon de migration et à voltage constant de 110 Volts jusqu'à pénétration des échantillons dans le gel de séparation, puis le voltage est monté à 180 Volts. Le gel est ensuite déposé sur une membrane de nitrocellulose et l'électrotransfert des protéines sur la membrane est réalisé à ampérage constant de 60 mA pendant 1h en condition semi-sec à l'aide de l'appareil de transfert Biorad. Une vérification visuelle de l'homogénéité du transfert est effectuée par incubation de la membrane dans une solution de rouge Ponceau pendant 10 minutes suivie de plusieurs lavages à l'eau. La membrane est ensuite rincée dans du PBS Tween 0,1 % avant d'être saturée par une incubation d'1h dans le même tampon en présence de lait à 5% sous agitation.

L'anticorps primaire est ensuite ajouté à la concentration recommandée par le fournisseur et la membrane incubée toute la nuit à 4°C sous agitation. Nous avons utilisé les anticorps primaires suivants :

Anticorps anti-PXR G-11 (Santacruz, ref : sc-48403) : dilution au 1/250^e ;

Anticorps anti-CYP3A4 HL3 (Santacruz, ref : sc-53850) : dilution au 1/250^e ;

Anticors anti-GAPDH (14c10) (Cell Signaling) : dilution au 1/2000^e ;

Les membranes sont lavées 3 fois au PBS Tween 0,1 % et incubées dans le même tampon en présence de 5% de lait et de l'anticorps secondaire (anti-lapin ou anti-souris couplés à la peroxydase HRP) à une dilution au 1/5000^e pendant 45 min à température ambiante. Les membranes sont de nouveau rincées 3 fois avec du tampon PBS Tween 0,1 % et recouvertes de révélateur ECL (*Enhanced ChimiLuminescent ; RevelBlot Plus ou RevelBlot Intense (Ozyme)*) 5 min à l'obscurité avant d'analyser la luminescence à l'aide de la GBox (Syngene).

Chaque membrane peut éventuellement être réutilisée. Dans ce cas, une déshybridation est réalisée par incubation dans un tampon de déshybridation (100 mM Glycine, pH 2,8 ; IGEPAL ; 10% SDS) pendant 15 minutes et lavée 3 fois au PBS Tween 0,1%. Les résultats présentés dans cette thèse, ont été obtenus à partir de 3 expériences biologiques différentes.

6 Tests de cytotoxicité à la sulforhodamine B

La sulforhodamine B est un dérivé qui lie les acides aminés basiques des protéines et donne une coloration rouge dont l'absorbance peut être mesurée et est proportionnelle au nombre de cellules. Le principe de ce test est présenté **figure 12**. Les cellules sontensemencées dans les puits de plaques 96-puits à raison de 4000 cellules pour les lignées 22RV1 et LnCAP, 3000 cellules pour les 22RV1-hPXR et 22RV1-pcDNA, DU145 et PC3 dans un volume de 100 μ L de milieu. Le lendemain, les cellules sont traitées par des concentrations croissantes de médicament par ajout de 100 μ L de la dilution 2X du composé (ou 100 μ L de milieu seul pour le contrôle). 72h après, le milieu est éliminé et les cellules sont fixées par une incubation d'au moins 1h à 4°C avec de 200 μ L de TCA 10 % préparé dans du PBS 1X. Après élimination du TCA, les cellules sont lavées 3 fois avec 200 μ L d'eau distillée et la plaque est séchée. Les cellules sont ensuite incubées avec 50 μ L de Sulforhodamine B (0,4% dans l'acide acétique 1%) pendant 30 mn à l'abri de la lumière, puis lavées 3 fois avec 200 μ L d'acide acétique 1%. Après séchage des puits, 100 μ L de Tris Base 10 mM sont ajoutés et les plaques sont agitées pendant 5 minutes. L'absorbance à 560 nm est ensuite mesurée grâce à un lecteur de plaque (Pherastar). Ces tests ont été réalisés seuls ou en associations dans du milieu contenant 5% de sérum déstéroïdé et 0,1 nM de R1881 pour les lignées androgéno-dépendantes ou du milieu supplémenté par 10% de SVF.

Pour les tests d'associations, les composés sont ajoutés à raison de 50 μ L d'une solution 4X de chaque composé. L'effet antagoniste ou synergique de ces combinaisons a été étudié grâce à l'utilisation d'une méthodologie développée par le Dr D. Tosi au sein du groupe. Cette approche appelée « matrices de synergie » permet, grâce à un algorithme spécifiquement dédié, d'identifier pour les combinaisons de 2 (ou plusieurs) molécules, si un effet est synergique, additif, ou antagoniste (**Fig. 13**). Cette approche est une variante de la méthode de Lehár [277] utilisant l'équation de Bliss pour estimer l'effet additif de deux composés à partir de leurs courbes dose-réponse obtenues seules. En comparant les deux matrices (observée vs estimée) il est ainsi possible d'obtenir une évaluation point-par-point de l'effet synergique (différence >0), additif (différence nulle), ou antagoniste (différence <0) (**Fig. 13**). Les résultats présentés dans cette thèse, ont été obtenus à partir de 3 expériences biologiques différentes.

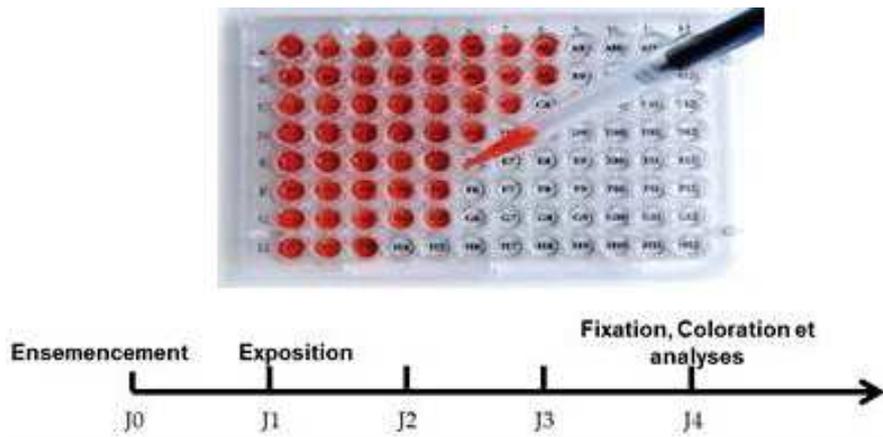


Figure 12 : Principe du test de cytotoxicité à la sulforhodamine B.

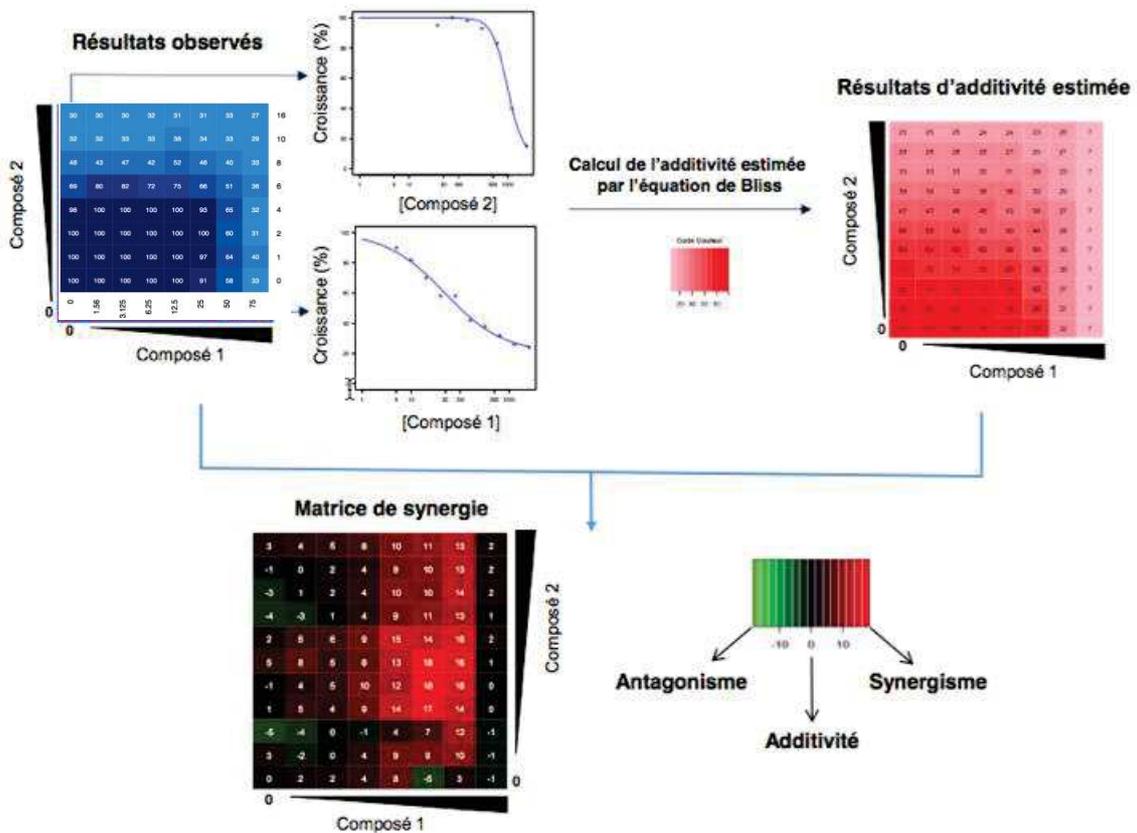


Figure 13 : Représentation schématique de l'approche de « matrices de synergie » utilisée pour la détermination des effets synergiques, additifs ou antagonistes d'une combinaison de différentes concentrations de deux composés. Cette approche utilise une variante de la méthode de Lehár dans laquelle une estimation de l'effet additif des deux composés (matrice rouge à droite) est déterminée selon l'équation de Bliss à partir des résultats du test à la sulforhodamine B (matrice bleue à gauche) pour les deux composés utilisés seuls (encadrés rouges). La différence entre ces deux matrices permet de déterminer des zones de synergies (rouge) d'antagonisme (vert) ou d'additivité (noir).

7 Etablissement de modèles de sur-expression stable de hPXR

Des modèles de cancer de prostate exprimant de manière stable PXR humain ont été obtenus par transfection du plasmide pcDNA3-hPXR1 (fourni par le Dr JM Pascussi, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier) dans lequel l'expression de PXR est sous contrôle du promoteur CMV. Le plasmide pcDNA3 vide a également été utilisé pour établir des lignées isogéniques contrôles. Dans ces lignées ont été transfectées dans un deuxième temps le plasmide rapporteur CYP3A4-LUC dans lequel l'expression de la luciférase est sous contrôle d'une séquence liant PXR présente dans la région promotrice du gène CYP3A4. Ce plasmide nous a été fourni par le Dr P. Balaguer de notre Institut.

Les transfections sont réalisées avec de la lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) sur 1 million de cellulesensemencées dans une boîte de Pétri de 100 cm². Les cellules sont lavées au PBS et 1 mL d'Optimem est ajouté. Un mix réactionnel est ensuite préparé en mélangeant une solution A (150 µL d'Optimem + 15 µL de Lipofectamine 2000) à une solution B (150 µL d'Optimem + 2,5 ng de plasmide) et en incubant ce mélange 10 minutes à température ambiante. Ce mélange est ensuite ajouté goutte à goutte dans chaque boîte de culture et les cellules sont incubées pendant 5 heures à 37°C. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu neuf et les cellules incubées à 37°C pendant 48h supplémentaires.

Une sélection de clones surexprimant PXR ou contenant le plasmide vide a ensuite été réalisée par traitement avec un agent de sélection approprié (la généticine) à des concentrations qui inhibent la prolifération de 60% des cellules non transfectées. Nous avons donc déterminé les concentrations de généticine nécessaires pour chaque lignée de cancer de prostate :

- 300 µg/mL pour la lignée 22RV1 ;
- 50 µg/mL pour la lignée PC3 ;
- 500 µg/mL pour la lignée DU145 ;
- 250 µg/mL pour la lignée LnCap ;

L'antibiotique est incubé pendant 5 jours au bout dequels une population de cellules résistantes à l'antibiotique émerge. Ces cellules surexpriment en théorie PXR mais le récepteur nucléaire n'est pas nécessairement fonctionnel. Dans ce but une deuxième transfection des cellules surexprimant PXR ou transfectées par le vecteur vide ont été transfectées selon le même protocole par le plasmide CYP3A4-LUC et sélectionnées cette fois par l'hygromycine B avec des concentrations différentes en fonction des cellules :

- 5 µg/mL pour les cellules 22RV1 ;

- 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les cellules LNCap ;

- 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les cellules PC3 ;

Cette seconde transfection permet aux cellules de devenir bioluminescentes quand elles sont en présence d'un ligand agoniste de PXR comme le SR12813 (**Fig. 14**). Le SR12813 est une molécule hypocholestérolémiante, qui à ce jour, est le plus puissant agoniste du PXR humain.

Afin d'obtenir des clones stables de surexpression de PXR à partir de chacune des populations sélectionnées, un faible nombre de cellules ont étéensemencées (100, 250, 500 et 1000 cellules) dans des boîtes de Pétri de 100 cm^2 . Les clones émergents de ces cultures ont ensuite été incubés avec de la luciférine (300 μL de luciférine à 10 mg/mL dans 10 mL de milieu) à l'obscurité et ont été observés avec une caméra détectant la bioluminescence. Les clones positifs une fois repertoriés ont ensuite été détachés par grattage et amplifiés par repiquages successifs dans des plaques 24-puits et 12 puits jusqu'à ce qu'ils puissent être cultivés en flasques.

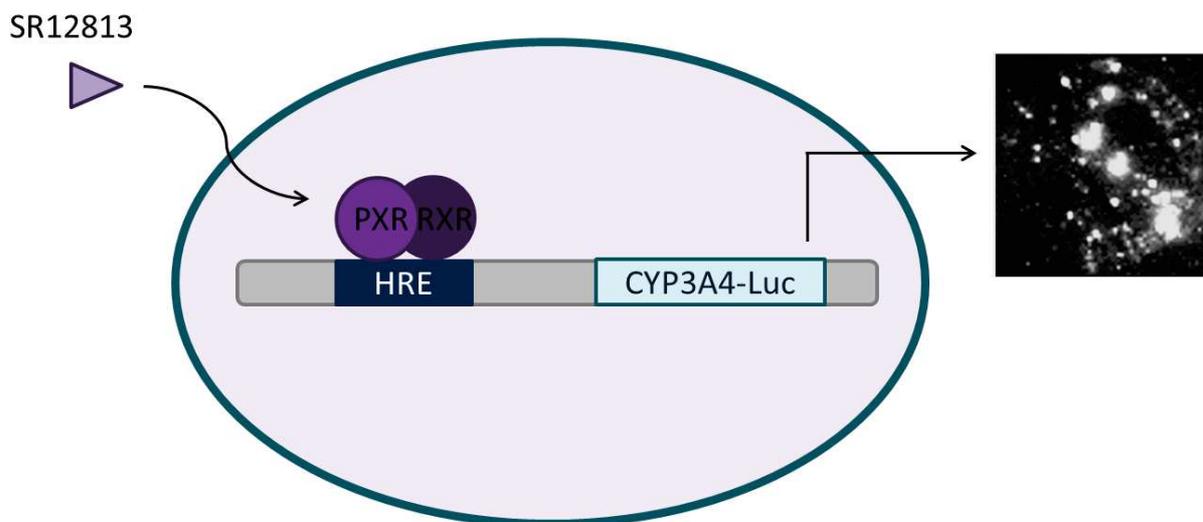


Figure 14 : Principe de la bioluminescence avec un gène rapporteur (d'après [181]).

7.1 Mesure de l'expression et de l'activité de PXR dans les clones stables

L'expression de PXR dans les clones sélectionnés a été vérifiée au niveau ARN messager par RT-qPCR, et au niveau protéique par Western blotting et immunofluorescence. Pour l'immunofluorescence, les cellules 22RV1hPXR et pcDNA sont ensemencées à 8000 cellules par puits de plaque 96-puits. Après avoir adhérees les cellules sont fixées par 100 μ L de paraformaldéhyde à 4% (30 min à température ambiante) puis lavées 2 fois au PBS 1X. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec 100 μ L de Triton à 0,2% pendant 10 minutes et lavées au PBS 1X contenant 1 mg/mL de BSA. Une saturation est réalisée en incubant les cellules avec 100 μ L de PBS 1X contenant 10 mg/mL de BSA pendant 20 minutes puis les cellules sont lavées au PBS 1X contenant 1 mg/mL de BSA. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps anti-PXR (G11) dilué au 1/200^e (50 μ L) pendant 1 heure à température ambiante et sont lavées au PBS 1X contenant 1 mg/mL de BSA. L'anticorps secondaire anti-souris Alexa Fluor-488 dilué au 1/400^e est ensuite ajouté pendant 30 minutes à température ambiante et les cellules sont de nouveau lavées au PBS 1X contenant 1 mg/mL de BSA. Les noyaux sont marqués en parallèle par un marquage au DAPI (1 μ g/mL dans du PBS 1X) pendant 30 minutes à 37°C. La plaque est ensuite lue à l'aide du Celigo®. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Mme COMBES.E de l'IRCM.

La mesure de l'activité de PXR dans chacun de nos clones a également été effectuée par luminométrie en utilisant un luminomètre (Perkin Elmer). Cette partie a été réalisée en collaboration avec A. Boulahtouf et M. Grimaldi de la plateforme de criblage en cancérologie de l'Institut.

8 Evaluation de l'effet ligand des inhibiteurs de kinases sur PXR

En collaboration avec la Plateforme de Criblage en Cancérologie (PCC) du Dr P. Balaguer, nous avons évalué l'effet ligand sur PXR de chacun des 12 IKs que nous avons sélectionné par l'approche *in silico*. Nous avons utilisé différents modèles de lignées cancéreuses : cancer du foie (lignée HepG2), cancer du colon (lignée LS174T), cancer du col de l'utérus (lignée HeLa) et cancer de la prostate (lignée 22RV1) qui surexpriment PXR et qui expriment aussi le gène rapporteur, la luciférase sous le contrôle du promoteur du CYP3A4. La technique de luminométrie nous a permis de réaliser un criblage rapide d'un nombre restreint d'inhibiteurs de kinases en comparant leur activité agoniste de PXR à celle du composé de référence SR12813.

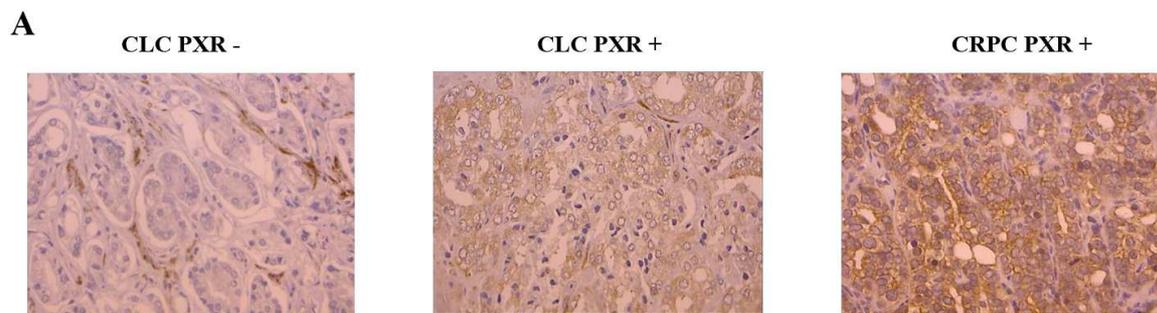
C RÉSULTATS

1. Mesure de l'expression de PXR dans les tumeurs de prostate

A ce jour, très peu d'études ont été publiées sur le rôle potentiel des gènes du métabolisme en terme pronostic ou prédictif dans le cancer de la prostate. Une première étude avait rapportée un lien entre l'expression de PXR et la chimiorésistance au taxol et à la vinblastine dans des lignées de cancer de la prostate (PC3). Il avait aussi analysé par immunohistochimie le niveau d'expression de PXR dans des tissus tumoraux de prostate chez 124 patients avec différents scores de Gleason, montrant une immunoréactivité significativement plus élevée pour des scores de Gleason 6 ou des grades II par rapport aux tissus normaux, ce marquage étant curieusement plus faible pour les scores de Gleason plus élevés [6]. Cette étude montrait également un marquage cytoplasmique de PXR avec quelques marquages nucléaires suggérant l'activation de PXR [6]. Une autre étude plus récente réalisée chez 107 patients a également observé par immunohistochimie un marquage cytoplasmique du CYP3A4 moins important dans les tissus tumoraux que dans l'épithélium bénin [278]. Les auteurs montrent que l'immunomarquage du CYP3A4 est inversement corrélé au score de Gleason et qu'il est corrélé à un bon pronostic de la maladie [278]. Ces résultats plutôt contradictoires nous ont conduits, en collaboration avec le groupe du Pr G. Fromont au CHU de Tours, à analyser de nouveau par immunohistochimie l'expression de PXR et de CYP3A4 dans des échantillons tumoraux de patients atteints de cancer de prostate. Ce travail repose sur l'analyse de deux séries de TMA regroupant les tissus tumoraux de 449 patients avec un cancer de prostate cliniquement localisé, 48 cas de CRPC, et 15 cas de métastases osseuses ou ganglionnaires. Des immunomarquages de PXR, CYP3A4 et Ki67 qui est un marqueur de la prolifération cellulaire ont été réalisés. Le marquage avec l'anticorps anti-CYP3A4 n'a malheureusement pas permis d'obtenir de signal et doit être reconsidéré en utilisant un autre anticorps. Les résultats obtenus pour PXR sont présentés **figure 15**.

Ils montrent tout d'abord un marquage cytoplasmique de PXR dans les cellules tumorales, ce qui est en accord avec les résultats de Chen et al. [6]. Un marquage positif est observé les fibres musculaires lisses (ce qui sert de témoin positif), et aucun marquage n'est observé dans les cellules épithéliales normales. De manière intéressante, l'expression de PXR est plus fréquente dans les stades résistants à la castration et les stades métastatiques par rapport aux stades cliniquement localisés (CLC) : respectivement 52% et 60% vs 35,8% ($p=0,018$), (**Fig. 15A**), indiquant que PXR pourrait être un marqueur pronostic de l'évolution de la maladie vers les stades les plus avancés. Dans les stades cliniquement localisés, 161 tumeurs sur les 449 analysées montrent un immunomarquage de PXR (**Fig. 15B**). Une analyse

plus fine de ce groupe de tumeurs a permis de montrer qu'il existe une corrélation positive de l'expression de PXR avec le stade TNM (31,7% des pT2 vs 45,5% des pT3, $p=0,007$), avec le score ISUP (22,6% pour les scores ISUP 1 vs 56,5% pour les scores ISUP 4-5, $p=0,0005$). Il existe également une association positive de l'immunomarquage de PXR avec le statut de prolifération cellulaire déterminé par le marquage de Ki67 (mann whitney $p=0,003$). Même s'ils n'intègrent pas encore les données d'expression du CYP3A4 et que le nombre d'échantillons pour les stades CRPC et métastatiques est encore assez faible, ces résultats confirment qu'au niveau clinique, PXR est exprimé dans les tissus tumoraux de patients atteints de cancer de la prostate, et que cette expression est plus fréquente dans les stades avancés de la maladie. Ils confortent donc l'hypothèse que PXR peut avoir un rôle non négligeable dans la résistance du cancer de la prostate aux hormonothérapies et aux chimiothérapies utilisées dans cette indication, et qu'il peut également être responsable, du moins en partie, des résultats décevants de certains essais cliniques ayant évalué l'efficacité des inhibiteurs de kinases, dont on sait par ailleurs qu'ils sont métabolisés majoritairement par le *CYP3A4*, gène cible de PXR. C'est donc sur cette base que nous avons étudié les effets de la modulation de l'expression de PXR sur la sensibilité des lignées de cancer de prostate à un panel d'inhibiteurs de kinases qui sont utilisés en clinique ou en cours d'essai dans le cancer de la prostate.



B

Nombre d'échantillons	PXR -	PXR +
CLC	288	161
CRPC	23	25
Métastases	6	9

C

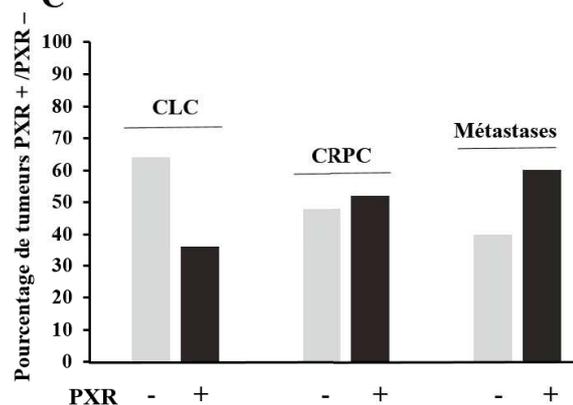


Figure 15 : Expression de PXR selon les différents stades du cancer de la prostate mesurée par immunohistochimie. (A) Exemple d'immunomarquage dans des échantillons de tumeurs de prostate cliniquement localisés (CLC) ou résistants à la castration (CRPC), (B et C). Répartition du nombre de tumeurs PXR + et PXR - en fonction du stade tumoral.

2. Mesure de l'expression des gènes du métabolisme et du transport dans les lignées de cancer de la prostate

Nous avons tout d'abord voulu évaluer le niveau d'expression des gènes du métabolisme sélectionnés dans 4 modèles de lignées cancéreuses de prostate : les deux lignées androgéno-indépendantes DU145, PC3 et les deux lignées androgéno-dépendantes 22RV1 et LNCap.

Dans la mesure où le métabolisme de la majorité des xénobiotiques est hépatique, nous avons utilisé la lignée HepaRG comme calibrateur pour étudier l'expression de ces gènes par la technique de RT-qPCR [279]. Les résultats présentés dans la **figure 16** montrent le niveau d'expression de 18 gènes du métabolisme normalisé par rapport au niveau d'expression du gène hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT), et rapporté à l'expression de ces mêmes gènes dans la lignée HepaRG. Les résultats montrent que ces gènes sont exprimés à différents niveaux en fonction de la lignée, et presque toujours sous-exprimés par rapport à la lignée HepaRG, rares étant ceux dont l'expression n'est pas détectable (**Fig. 16**). Quelques gènes qui sont connus pour jouer un rôle dans le métabolisme de nombreux inhibiteurs de kinases sont particulièrement exprimés dans les 4 lignées analysées tels que *CYP2D6*, *CYP1A1* et *CYP1A2* (**Fig. 16**). C'est également le cas du gène *CYP1B1* déjà décrit comme étant surexprimé dans de nombreux tissus tumoraux dont celui de la prostate [280, p. 1]. En revanche, les résultats montrent que le niveau d'ARN messager des deux xénorécepteurs *NR1I2* et *NR1I3* qui contrôlent l'expression d'un grand nombre de gènes du métabolisme et du transport, est relativement faible par rapport à la lignée HepaRG (voir non détecté pour *NR1I2* dans la lignée DU145) (**Fig. 16**).

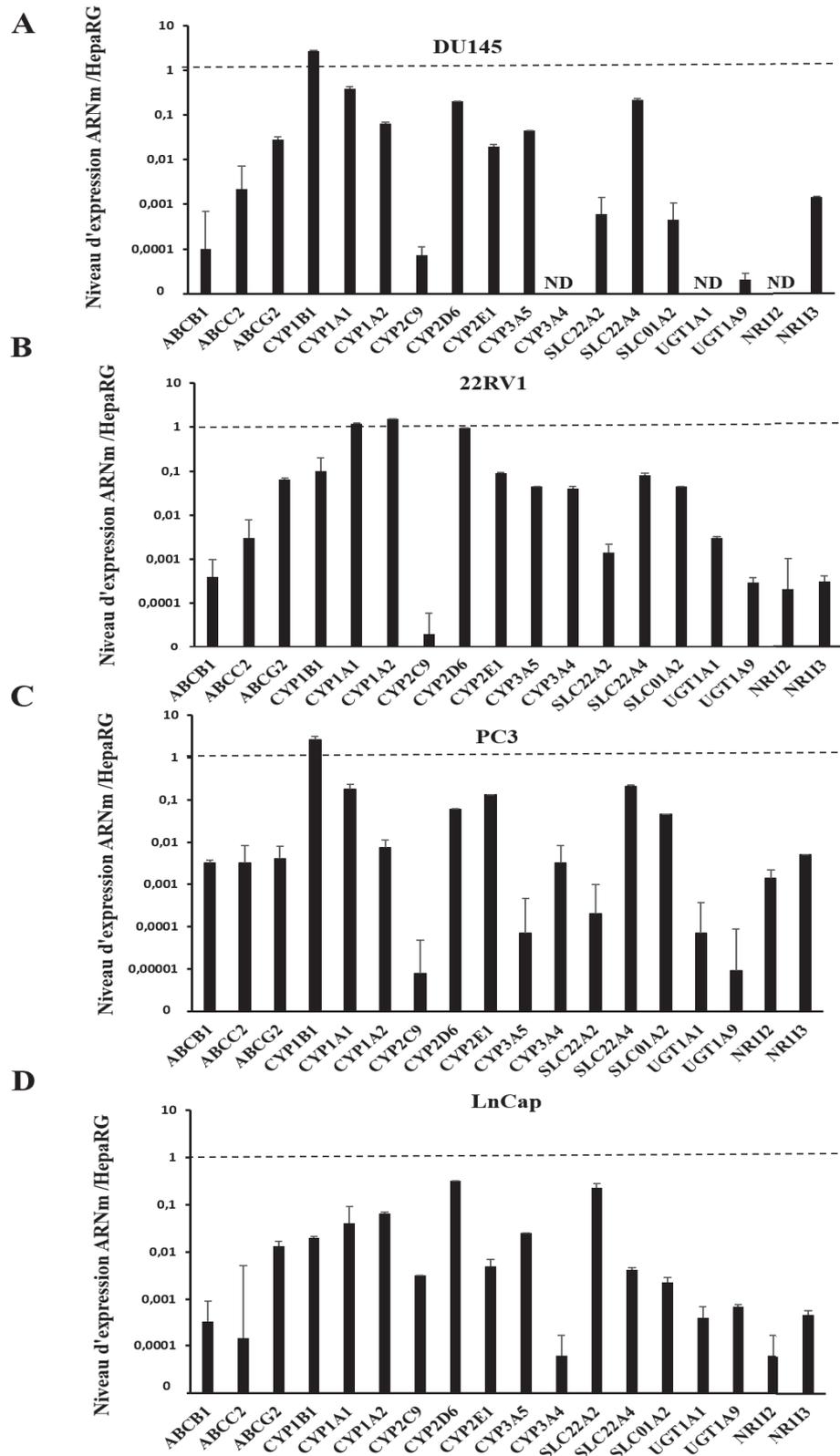


Figure 16: Niveaux d'expression de 16 gènes du métabolisme et du transport et des 2 xénorécepteurs NR1I2 et NR1I3 dans les lignées de cancer de la prostate DU145 (A), PC3 (B), 22RV1 (C) et LNCap (D). L'expression de chaque gène est normalisée par rapport à l'expression du gène HPRT et rapportée à l'expression de ces mêmes gènes dans la lignée contrôle hépatique HepaRG.

3. Effet de la 5-aza-2-déoxycytidine sur l'expression des gènes du métabolisme

Pour tenter d'identifier si le faible niveau d'expression de *NR1I2* et de ses gènes cibles pouvait être lié à une hyperméthylation de leurs promoteurs, nous avons étudié l'effet de l'agent déméthylant 5-aza-2-déoxycytidine sur l'expression de *NR1I2* et deux de ses gènes cibles les plus représentatifs, *CYP3A4* et *ABCB1*. Les résultats, bien que préliminaires, montrent que l'utilisation de la 5-aza-2-déoxycytidine induit une augmentation de l'expression du gène *NR1I2* dans les lignées 22RV1 et LnCap (**Fig. 17**). De manière intéressante, le traitement des cellules par la 5-aza-2-déoxycytidine entraîne également une augmentation de l'expression des gènes *CYP3A4* et *ABCB1* (**Fig. 17**), suggérant que le promoteur de ces gènes pourrait également être hyperméthylé au niveau basal dans ces deux lignées ou plus probablement que la ré-expression du gène *NR1I2* par déméthylation de son promoteur en est le responsable.

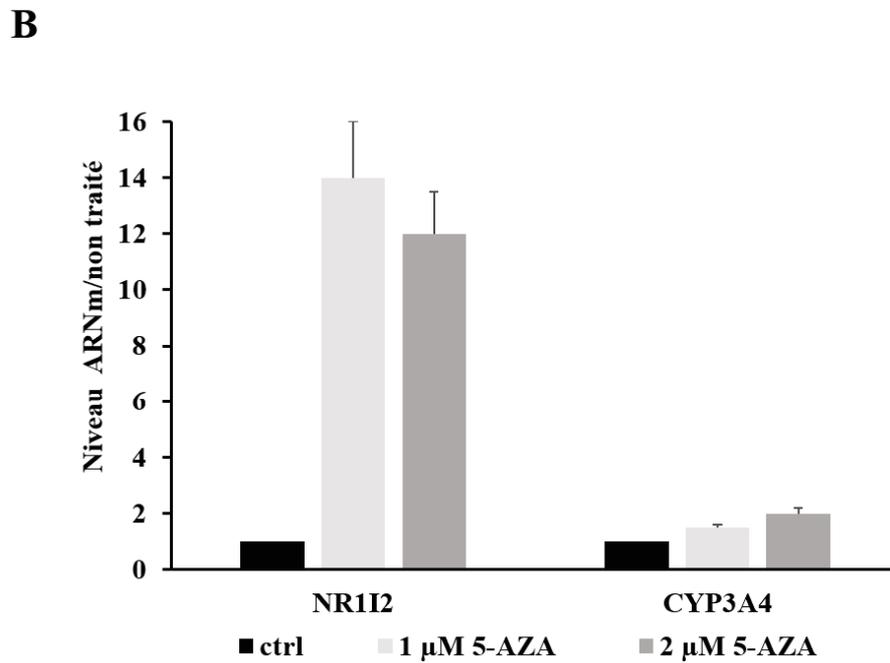
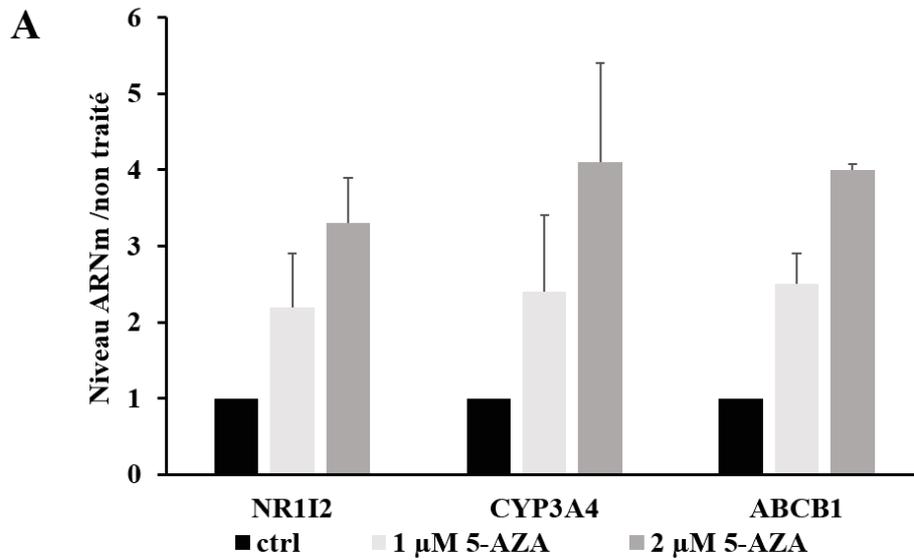


Figure 17 : Niveau d'expression des ARNm de NR1I2 et de ses gènes cibles après traitement par 1 ou 2 μ M de 5 aza-2-déoxycytidine (5-AZA) pendant 36h dans la lignée 22RV1 (A) et 48h dans la lignée LnCap (B). L'expression de chaque gène est normalisée par rapport à l'expression du gène HPRT.

4. Evaluation de la fonctionnalité de PXR dans les lignées de cancer de la prostate

En dépit de cette faible expression basale de *NR1I2* dans nos lignées de cancer de la prostate, nous avons souhaité évaluer si la protéine PXR était fonctionnelle et si son activation par un agoniste de référence, le SR12813, pouvait entraîner une augmentation de l'expression de ses gènes cibles. Nous avons pour cela mesuré le niveau d'expression ARNm des gènes *CYP3A4*, *ABCB1* et *UGT1A9* après traitement des lignées PC3, 22RV1 et LNCap par 3 μ M de SR12813 pendant 24h dans deux conditions de culture généralement utilisées pour les lignées prostatiques : un milieu complété par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et un milieu complété par 5% de sérum déstéroïdé (DCC) contenant 0,1 nM de R1881. Le niveau d'expression de PXR dans la lignée DU145 étant indétectable, nous n'avons pas effectué ce test dans ce modèle. Les résultats présentés dans la **figure 18** démontrent que le SR12813 n'a que peu d'effet sur l'activité transcriptionnelle de PXR dans la lignée androgéno-indépendante PC3, quel que soient les conditions de culture utilisées (**Fig. 18C**). En condition de culture SVF, le traitement par 3 μ M de SR12813 induit une augmentation de l'expression de *CYP3A4* qui est faible dans la lignée LnCap mais significative (de l'ordre de 2 fois) (**Fig. 18A**). Le fait de cultiver les cellules LnCap et 22RV1 dans un milieu DCC+R1881 par rapport à un milieu SVF classique est associé à une augmentation de l'expression du *CYP3A4* de 2 à 4 fois en l'absence de SR12813 (**Fig. 18A & B**). L'ajout de SR12813 augmente encore cette expression dans la lignée LnCap mais n'a aucun effet supplémentaire dans la lignée 22RV1. En ce qui concerne les autres gènes cibles de NR1I2, nous n'avons pas observé d'effet significatif du SR12813 ou du changement de condition de culture (**Fig. 18 A & B**). Ces résultats démontrent que PXR semble fonctionnel dans les lignées androgéno-dépendantes malgré son faible niveau d'expression, et que des facteurs présents dans le sérum de veau fœtal de nature stéroïdienne influencent directement ou indirectement la transcription des gènes cibles de PXR, ce qui est en accord avec les études ayant mis en évidence un « *cross-talk* » entre PXR, le récepteur des androgènes et le récepteur des glucocorticoïdes [281], [282]. Une autre possibilité est que l'androgène de synthèse non métabolisable R1881 puisse jouer le rôle d'agoniste de PXR.

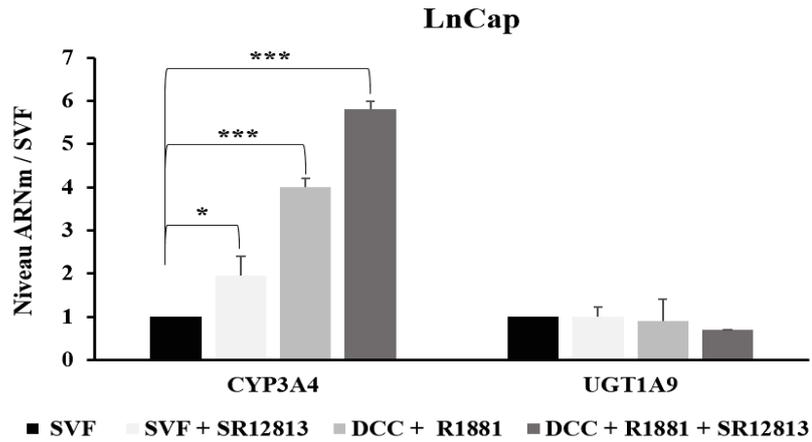
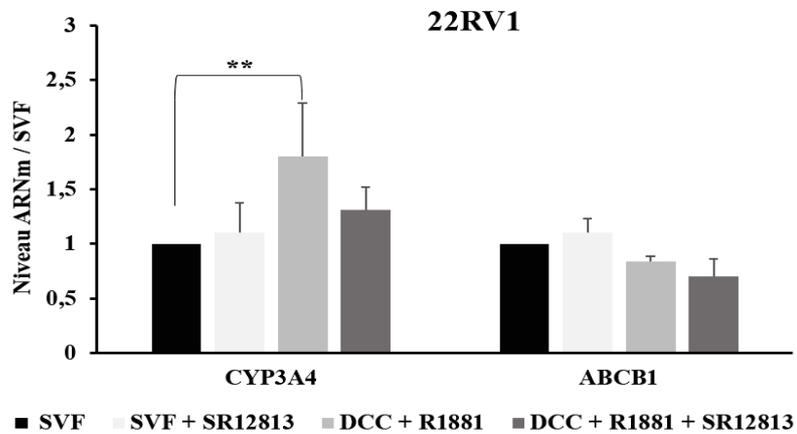
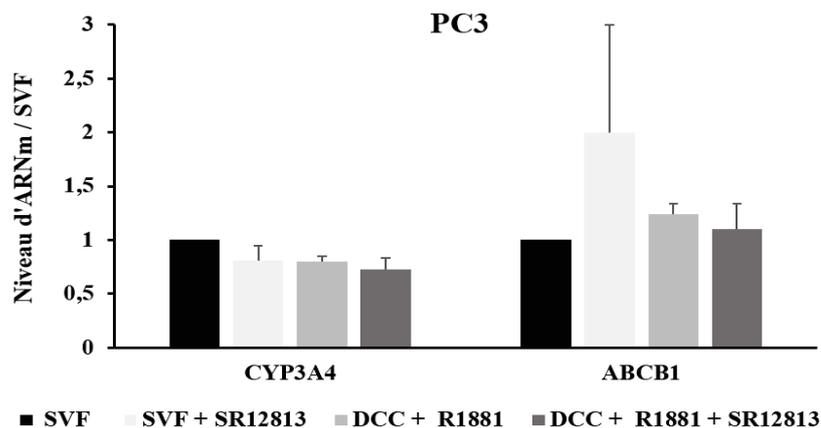
A**B****C**

Figure 18: Niveau d'expression des ARNm des gènes CYP3A4, UGT1A9 et ABCB1 dans les lignées cultivées en milieu classique (SVF) ou contenant une concentration connue d'androgènes (DCC + R1881), et après traitement par 3 μ M de SR12813. (A) Lignée LnCap (***: $p < 0.01$). (B) Lignée 22RV1 (**: $p < 0.05$). (C) Lignée PC3. L'expression de chaque gène est normalisé par rapport à l'expression du gène HPRT.

5. Effet de l'activation de PXR sur la cytotoxicité des inhibiteurs de kinases dans les lignées de cancer de la prostate

En parallèle de l'étude des effets de SR12813 sur l'activation de PXR et de ses gènes cibles, nous avons étudié les conséquences de l'utilisation de cet agoniste de PXR sur la cytotoxicité des inhibiteurs de kinases dans les lignées de cancer de la prostate. Pour cela, 4 inhibiteurs ont été utilisés, l'erlotinib, le gefitinib, le lapatinib et le vémurafénib. L'effet du SR12813 (3 μ M / 24h) sur la sensibilité des trois lignées à ces inhibiteurs, où PXR est exprimé au niveau basal, (lignées 22RV1, PC3 et LNCap) a été mesuré dans les deux conditions de culture : en présence de sérum fœtal de veau et en présence de sérum déstéroïdé complémenté par du R1881 à une concentration de 0,1 nM. (**Fig. 19**). Les IC_{50} de chaque inhibiteur en présence ou en absence d'agoniste de PXR ont été calculées à partir des résultats obtenus par le test de cytotoxicité à la sulforhodamine B (**Fig. 19**). Les résultats montrent clairement que la sensibilité de ces trois lignées aux 4 inhibiteurs n'est pas significativement affectée par la présence de SR12813. Ces résultats sont probablement liés au fait que PXR n'est que très peu exprimé dans ces lignées.

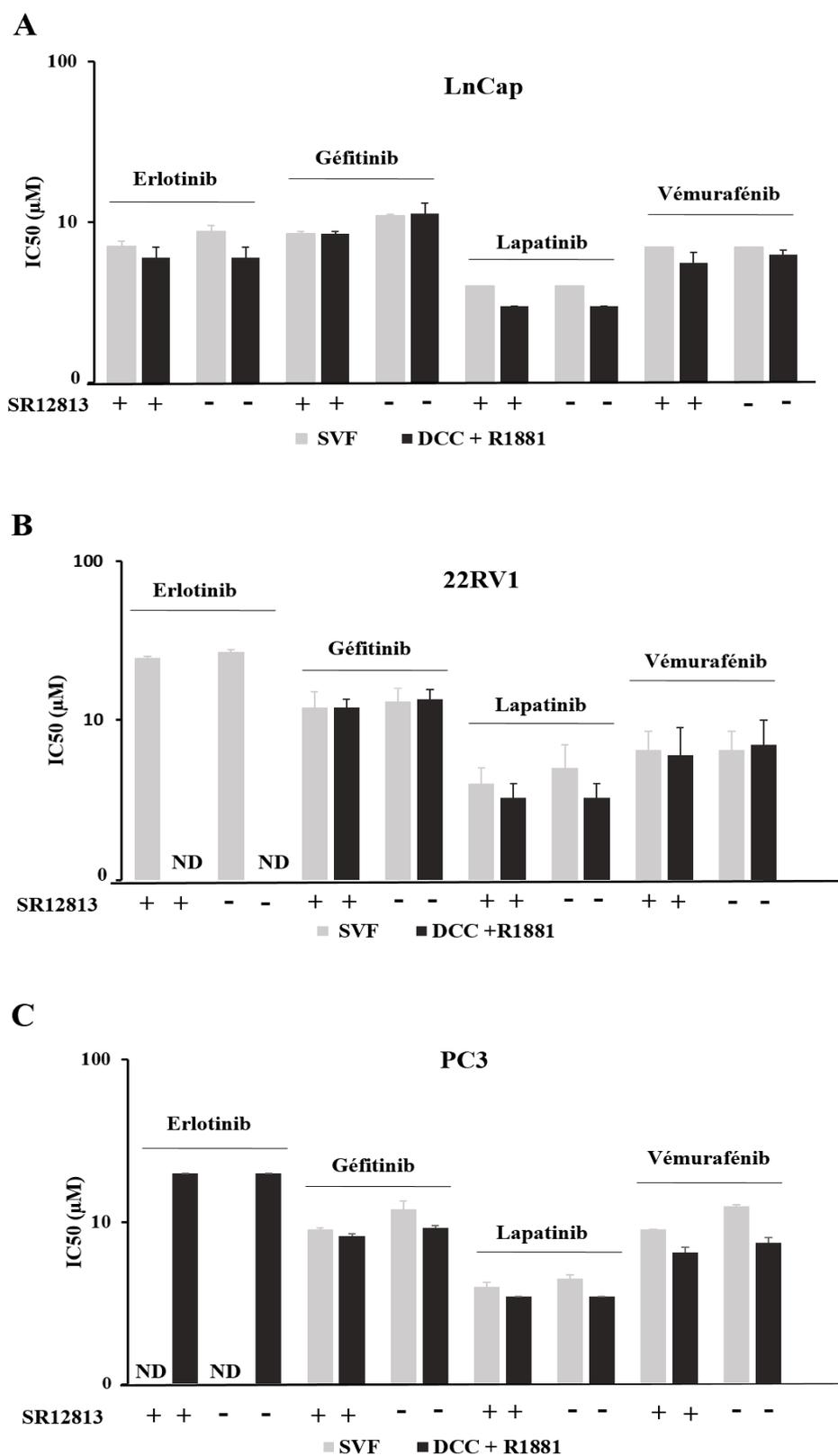


Figure 19 : Effet de l'activation de PXR par 3 µM de SR12813 sur la sensibilité de la lignée LnCap (A), 22RV1 (B) et PC3 (C) à 4 IKs, cultivées en milieu classique (SVF) ou contenant une concentration connue d'androgènes (DCC + R1881). ND : IC₅₀ non déterminée.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les lignées de cancer de la prostate sont métaboliquement compétentes car elles expriment beaucoup de gènes du métabolisme à des niveaux parfois similaires à ceux de la lignée HepaRG de référence, et que PXR est activable par son agoniste dans les lignées androgéno-dépendantes 22RV1 et LnCap. En revanche, ils démontrent qu'à l'état basal, ces lignées ne représentent pas un modèle facile à utiliser pour étudier l'impact de PXR et de ses gènes cibles sur le métabolisme et la réponse cellulaire des inhibiteurs de kinases, car elles ne reflètent pas ce que nous avons observé dans les échantillons cliniques de cancers de prostate de stades avancés (**Fig. 15**). En conséquence, nous avons décidé de développer des modèles de surexpression stable de PXR en utilisant les deux lignées androgéno-dépendantes 22RV1 et LnCap.

6. Sélection et caractérisation de modèles isogéniques de surexpression stable de PXR

Nous avons débuté cette sélection en utilisant la lignée 22RV1. Comme nous l'avons détaillé dans la partie Matériel et Méthodes, nous avons dans un premier temps réalisé une transfection des cellules avec un plasmide contenant la séquence du cDNA de PXR humain ou le vecteur pcDNA3 vide. Les populations issues de cette première transfection ont ensuite été transfectées par un plasmide contenant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de CYP3A4 et plusieurs clones ont été isolés par dilutions limites. Cette étape permet d'évaluer si PXR surexprimé est bien fonctionnel, c'est-à-dire capable d'exercer son activité transcriptionnelle, se traduisant par une bioluminescence basale des cellules dont l'intensité doit augmenter en présence d'agonistes comme le SR12813. Six clones de surexpression de PXR ont été sélectionnés pour la lignée 22RV1 et la fonctionnalité de PXR dans chacun d'eux a été vérifiée par mesure de leur luminescence en absence ou en présence de 3 μ M de SR12813 (**Fig. 20**). Les résultats montrent que pour l'ensemble des clones sélectionnés le SR12813 entraînait une augmentation de la luminescence d'environ 3 fois, indiquant que PXR était fonctionnel et probablement surexprimé dans ces différents clones, ce que nous avons vérifié par différentes techniques sur les deux clones 10 et 15 en utilisant le clone 3 transfecté par le vecteur pcDNA3 vide comme contrôle (**Fig. 21**).

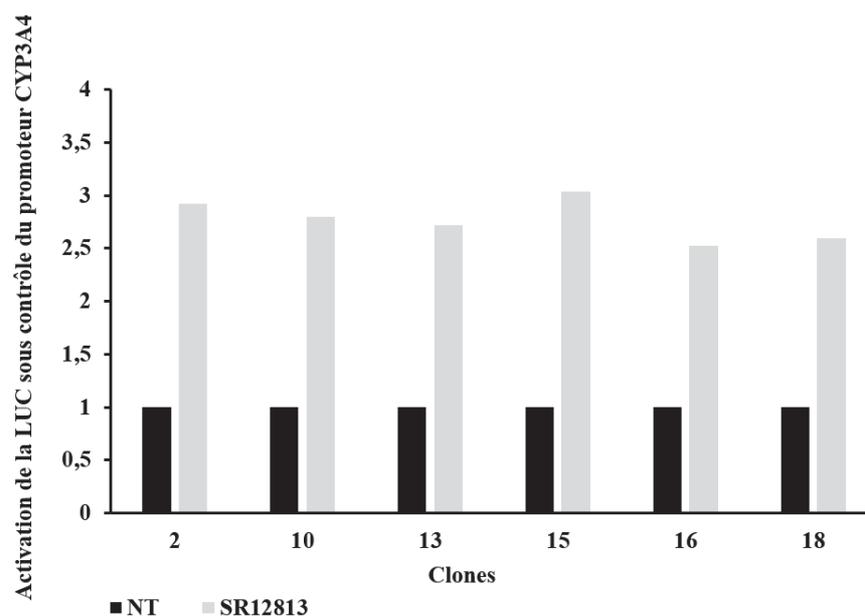


Figure 20 : Caractérisation de la fonctionnalité de PXR dans chacun des clones traités par 3 μ M de SR12813 et évaluée par luminométrie.

Nous avons tout d'abord vérifié l'expression de PXR au niveau protéique et confirmé sa surexpression dans les deux clones, le clone 3 ne montrant aucun niveau détectable de la protéine (**Fig. 21A**). Cette surexpression a été également confirmée par immunofluorescence (**Fig. 21B**) et par la mesure de l'expression des gènes cibles de PXR (**Fig. 21C & D**). L'expression ARNm ou protéique du *CYP3A4* est significativement augmentée (de l'ordre de 2 fois) dans les clones 10 et 15 par rapport au contrôle, le clone 3 (**Fig. 21A**). Le caractère activable de PXR a également été confirmé par une augmentation additionnelle de l'expression ARNm de *CYP3A4* lorsque les clones 10 et 15 sont traités par 3 μ M de SR12813 (**Fig. 21C & D**). Des résultats similaires sont observés pour le gène ABCB1, l'augmentation du niveau d'ARN messagers étant moins marquée (**Fig. 21 C & D**).

Ainsi, les clones 10 et 15 représentent des modèles de surexpression stables pertinents pour l'étude de la modulation de PXR et de ses gènes cibles sur la sensibilité des cellules 22RV1 aux inhibiteurs de kinases.

Une démarche similaire a été entreprise pour l'obtention de clones de surexpression stable de PXR dans les cellules LnCap. Nous venons d'obtenir les premières populations de cellules transfectées luminescentes et nous avons vérifié que ces cellules surexpriment bien PXR par rapport aux cellules LnCap contrôles transfectées par le vecteur vide (**Fig. 22**). Les clones sont en cours de sélection.

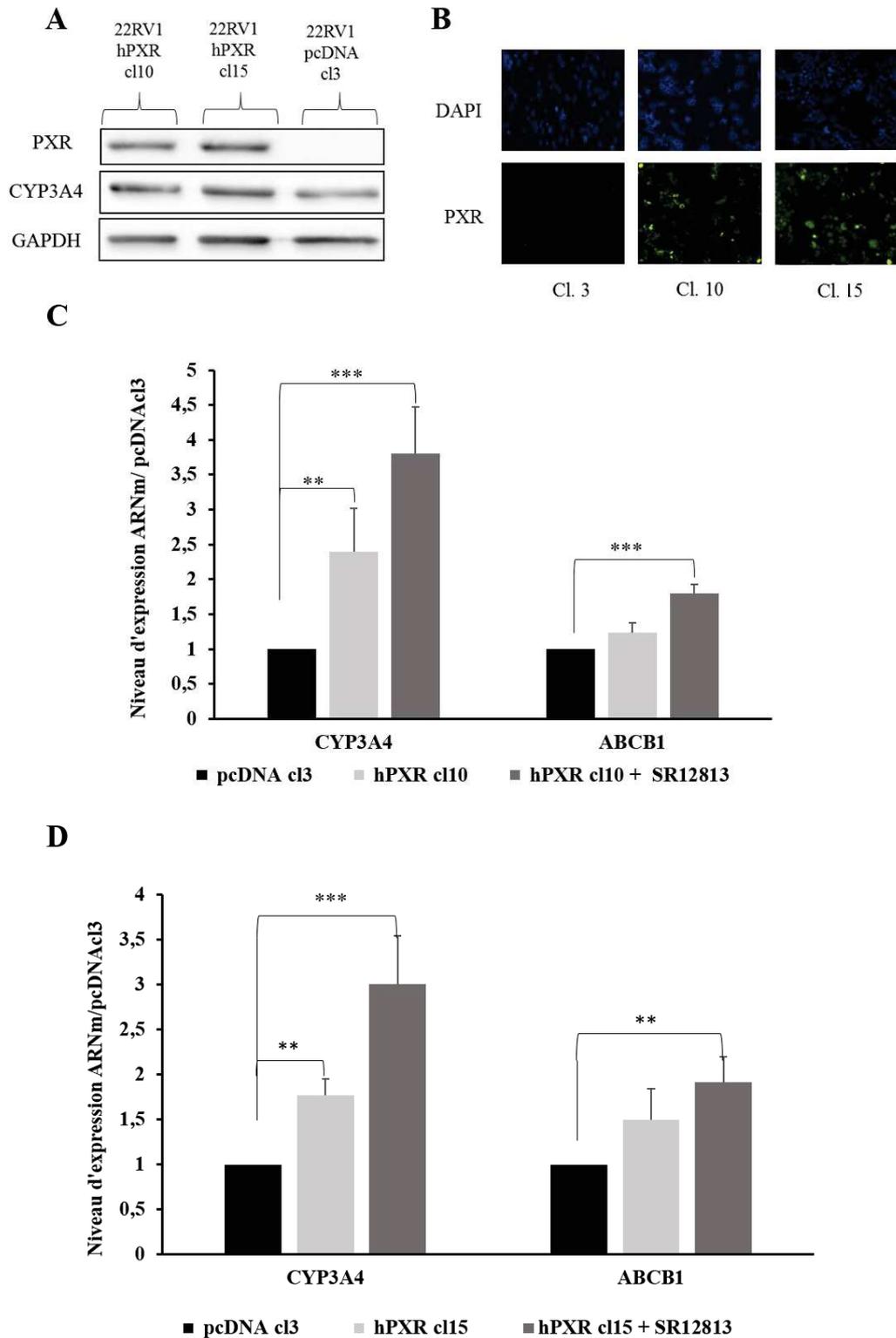


Figure 21: Caractérisation de l'expression et de la fonctionnalité de PXR dans les clones de surexpression stable de PXR (cl10 et cl15) par rapport au clone contrôle (cl3). (A) Expression protéique de PXR et du CYP3A4 normalisée par rapport à la GAPDH. (B) Expression protéique de PXR évaluée par immunofluorescence. (C et D) Expression des ARNm des gènes CYP3A4 et ABCB1 en absence ou en présence de 3 μ M de SR12813 dans les clones cl10 et cl15 et normalisée par rapport à l'expression du gène HPRT.

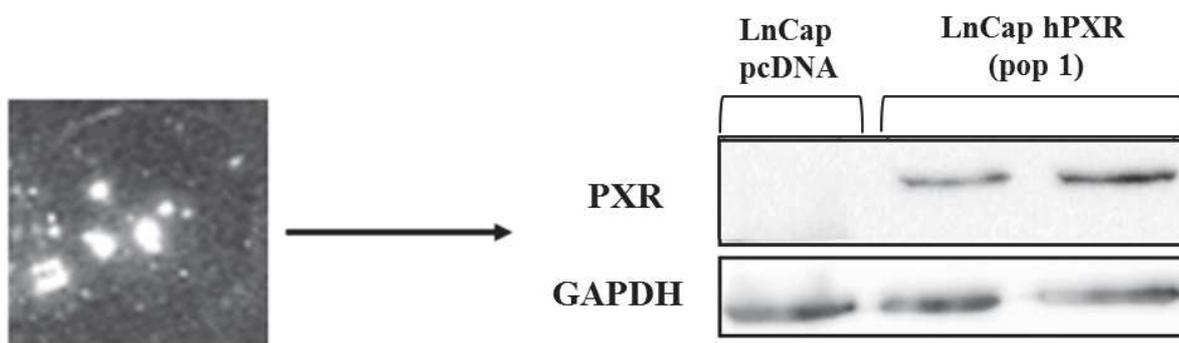


Figure 22: Caractérisation de l'expression de la protéine PXR par Western Blot et de son activité par bioluminescence. (pop 1 : 1^{ère} population de cellules LnCap après sélection par l'antibiotique)

7. Effets de la surexpression de PXR sur la sensibilité de la lignée 22RV1 aux inhibiteurs de kinases

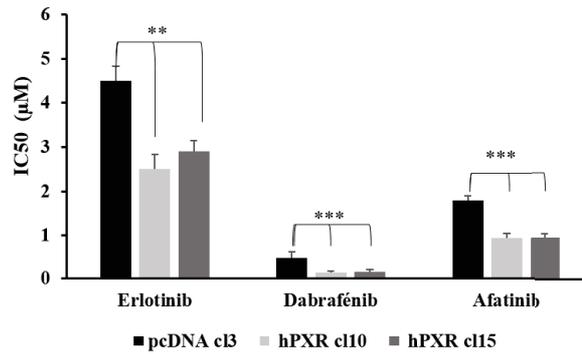
Dans le but de tester l'effet de la surexpression de PXR sur la réponse cellulaire à divers inhibiteurs de kinases, nous avons comparé la sensibilité de la lignée 22RV1hPXR clone 10 à celle de la lignée contrôle 22RV1pcDNA clone 3. La lignée 22RV1hPXR clone 15 a également été utilisée pour confirmer certains des résultats significatifs obtenus avec le clone 10. La cytotoxicité de 12 inhibiteurs de kinases (erlotinib, géfitinib, lapatinib, vémurafénib, cobimétinib, dabrafénib, tramétinib, afatinib, dasatinib, pazopanib, sorafénib, et imatinib) (**Fig. 23A**) a été mesurée par le test à la sulforhodamine B et l'IC₅₀ de chaque inhibiteur a été calculée à partir des courbes de prolifération obtenues (**Fig. 23**). Les résultats montrent que la surexpression de PXR dans la lignée 22RV1 confère une sensibilité accrue à l'erlotinib, au dabrafénib et à l'afatinib avec une diminution de leur IC₅₀ qui est d'environ 2 fois pour l'erlotinib et l'afatinib et d'environ 4 fois pour le dabrafénib (**Fig. 23A & B**). La surexpression de PXR confère en revanche une résistance au dasatinib mais uniquement à des concentrations d'inhibiteurs supérieures à 0,1 µM correspondant à l'IC₇₀.

Ces tests de cytotoxicité ont également été effectués en présence de 3 µM de SR12813 en testant l'hypothèse que l'activation de PXR par cette concentration d'agoniste pouvait amplifier les effets de la surexpression stable de PXR sur la sensibilité des inhibiteurs de kinases. Les résultats qui ne sont pas présentés ici ne montrent aucun effet du SR12813 à cette concentration, suggérant que pour ces modèles de surexpression, une concentration plus importante d'agoniste pourrait être nécessaire pour activer PXR. Nous avons donc testé l'effet de concentrations croissantes de SR12813 sur le niveau d'ARNm et la quantité de protéines des cibles de PXR, *CYP3A4* et *ABCB1* dans le clone 15 (**Fig. 24**). Les résultats démontrent un effet concentration-dépendant de SR12813 sur le niveau d'ARNm de *CYP3A4* et d'*ABCB1* qui est maximal pour une concentration de 6 µM de l'agoniste (**Fig. 24A & B**). Pour *CYP3A4*, un effet similaire est observé avec une augmentation significative de la quantité de protéine qui atteint son maximum dès la concentration de 1 µM (**Fig. 24C**). L'absence d'effet du SR12813 sur la sensibilité aux inhibiteurs de kinases dans les clones surexprimant PXR n'est donc pas lié au fait que la concentration en agoniste ne soit pas suffisante.

A

IKs Testés	IC50 (µM)				
	22rv1 hpxr c10	22rv1 hpxr c15	22rv1 pcDNA c13	Ratio IC50 c13/c10	Ratio IC50 c13/c15
Erlotinib	2,5	2,9	4,5	1,8	1,55
Géfitinib	5,2	ND	6	1,15	ND
Lapatinib	3	ND	3,5	1,16	ND
Vémurafénib	4	ND	4,5	1,13	ND
Cobimétinib	4	4,8	5,5	1,38	1,14
Dabrafénil	0,13	0,15	0,5	3,8	3,3
Tramétinib	10	10	10	0	0
Afatini	0,95	0,95	1,8	1,9	1,9
Dasatinib	0,05	0,1	0,05	0	0,5
Pazopanib	3,2	ND	4,2	1,3	ND
Sorafénib	2,5	ND	2	0,8	ND
Imatini	9,5	ND	8,5	0,9	ND

B



C

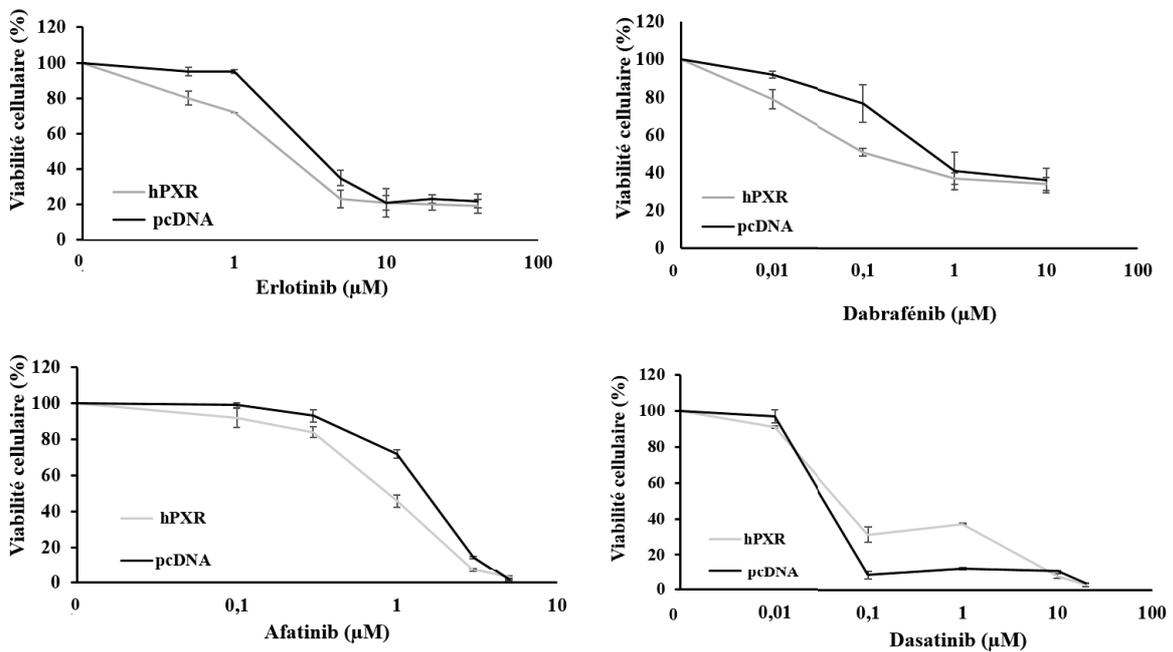


Figure 23: Influence de l'expression de PXR sur la sensibilité aux inhibiteurs de kinases dans les clones de surexpression de PXR (c110 et c115) par rapport au clone contrôle (c13). (A) Tableau récapitulatif des ratios des IC₅₀ et de leur ratio dans chaque modèle. (B) IC₅₀ obtenues après traitement par l'erlotinib, le dabrafénib et l'afatini. (C) Effets des inhibiteurs de kinases sur la croissance des lignées 22RV1hPXR et pcDNA évaluée par le test à la sulforhodamine B.

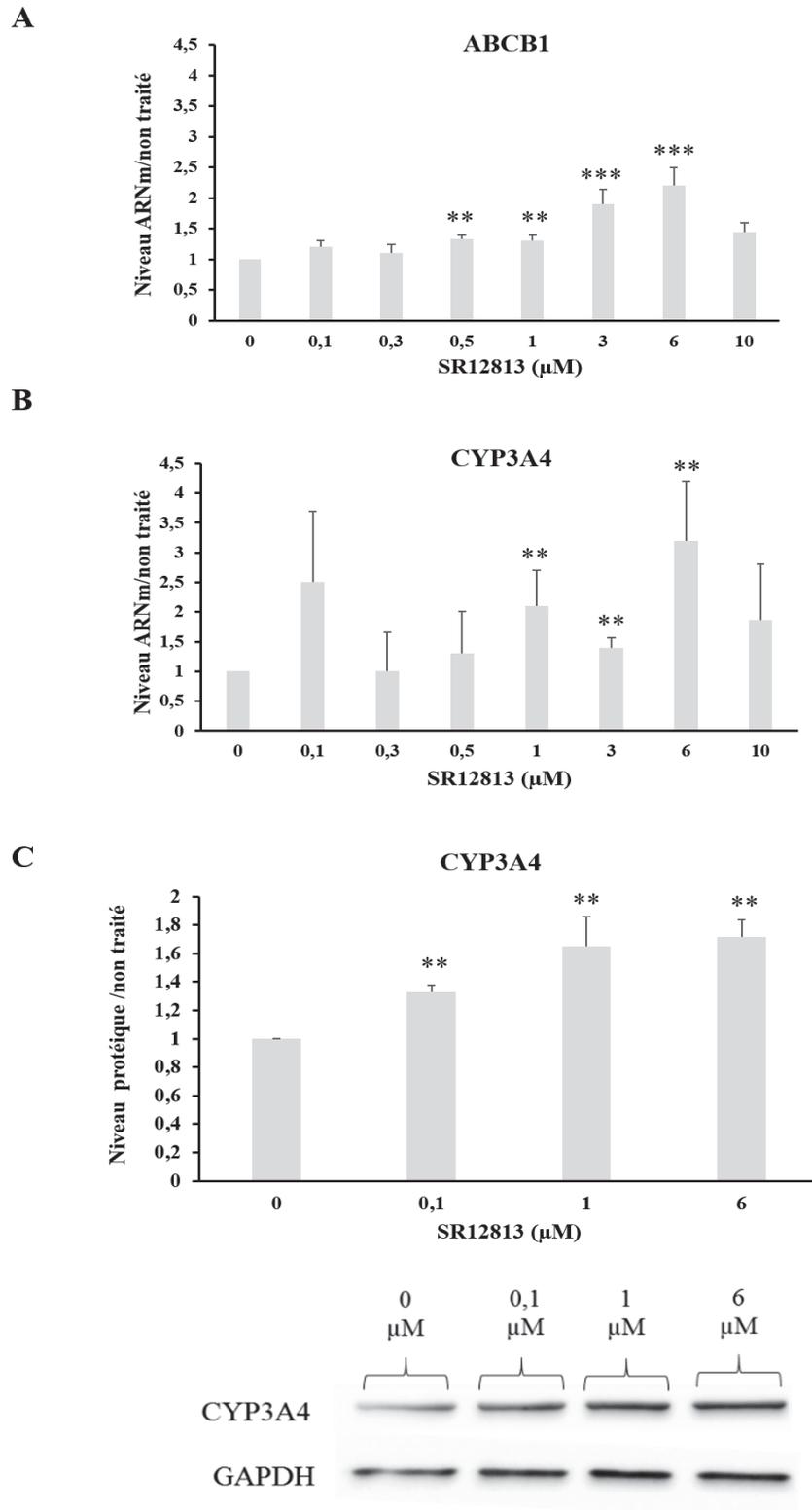


Figure 24 : Niveau d'expression des gènes ABCB1 et CYP3A4 dans le modèle 22RV1hPXR cl15, après traitement par une gamme de concentrations de SR12813. (A et B). Expression ARNm d'ABCB1 et CYP3A4, normalisée par rapport à l'expression du gène HPRT. (C) Effet du SR12813 sur l'expression protéique du CYP3A4 évalué par Western blotting. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge.

8. Effets du R1881 sur l'activité transcriptionnelle de PXR dans les lignées surexprimant PXR

Nous avons précédemment démontré un effet des conditions de culture sur l'activité transcriptionnelle de PXR, notamment sur l'expression du *CYP3A4* dans les lignées androgéno-dépendantes 22RV1 et LnCap à l'état basal (**Fig. 18**). Nous avons étudié l'impact de ces conditions de culture et notamment de l'androgène de synthèse R1881 sur l'activité de PXR lorsque celui-ci est surexprimé de façon stable. Le clone 15 a donc été cultivé en présence de sérum déstéroïdé (DCC) avec différentes concentrations de R1881 (0,1 ; 1 ; 10 nM) et le niveau d'expression de PXR et de ses gènes cibles a été mesuré par RT-qPCR et par Western blotting (**Fig. 25**). Les résultats montrent qu'à des concentrations de 0,1 et 1 nM, aucun effet sur l'expression de *NR1I2* et de ses gènes cibles *ABCB1* et *CYP3A4* n'est observé. En revanche, pour une concentration de 10 nM de R1881, on observe une augmentation de l'expression du gène *CYP3A4* au niveau ARNm et au niveau protéique, mais aussi du gène *NR1I2* et PXR.

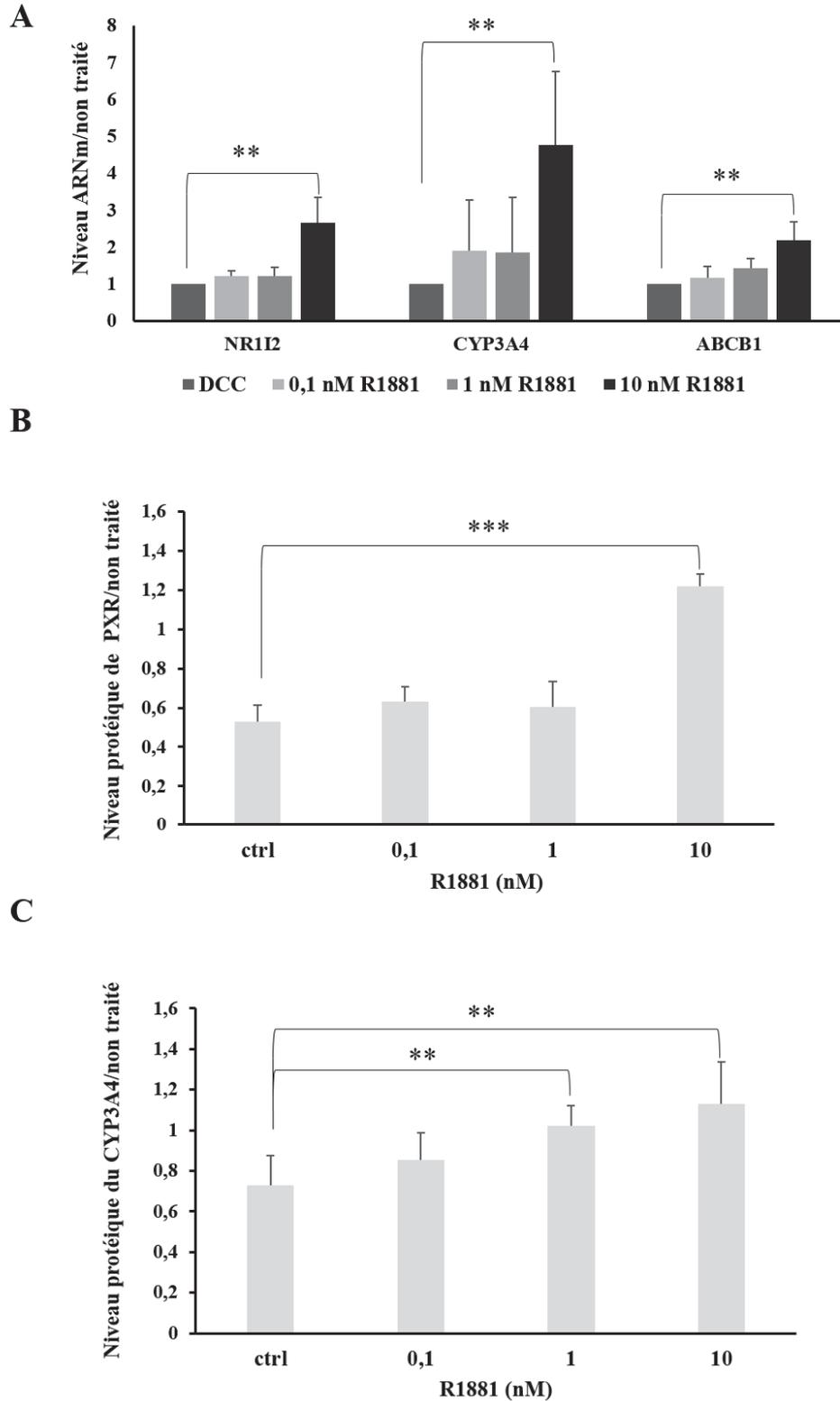
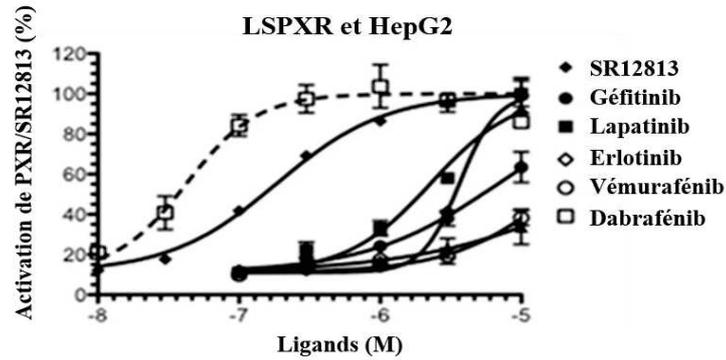


Figure 25: Niveau d'expression des gènes PXR, CYP3A4 et ABCB1 dans le modèle 22RV1hPXR cl15, après traitement par une gamme de concentrations de R1881. (A) Expression ARNm de CYP3A4, ABCB1 et NR1I2, normalisée par rapport à l'expression du gène HPRT. (B et C) Expression protéique de PXR et CYP3A4, normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH (Western Blot issus des travaux de M2 de Mme Leenhardt.F).

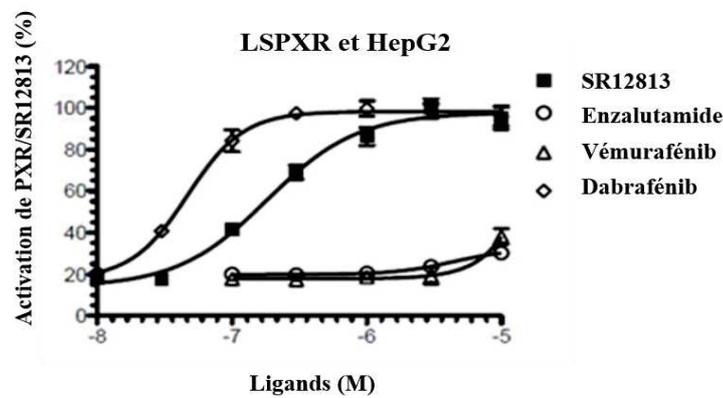
9. Etude de l'effet agoniste potentiel de différents IKs sur PXR

Comme nous l'avons mentionné précédemment de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de plusieurs enzymes du métabolisme dont le xénorécepteur PXR dans le métabolisme d'une large majorité d'inhibiteurs de kinases [260]. En revanche, il existe beaucoup moins d'études adressant la possibilité que ces inhibiteurs soient des ligands de PXR et puissent de ce fait moduler leur propre métabolisme ou celui de médicaments associés. C'est cette hypothèse que nous avons testée en évaluant l'effet agoniste des 12 inhibiteurs sur l'activité transcriptionnelle de PXR, en utilisant des modèles de surexpression de PXR d'origine hépatiques (HepG2-PXR) et de cancer colorectal (LS174T-PXR) en collaboration avec la plateforme PCC du Dr P. Balaguer (U1194 IRCM). Ces cellules sont co-transfectées avec un plasmide rapporteur CYP3A4-luc qui permet de quantifier par mesure de la luminescence, les effets transcriptionnels de PXR suite à son interaction avec un ligand. L'activité agoniste potentielle de chaque inhibiteur de kinase a été comparée à l'activité du SR12813 pris comme référence. Les résultats de la **figure 26** montrent comme attendu que le SR12813 est un agoniste puissant de PXR avec un effet agoniste à 50% pour une concentration inférieure au micromolaire dans les deux modèles LS et HepG2 (**Fig. 26A & B**). Parmi les autres inhibiteurs testés, certains montrent également un effet agoniste mais à de fortes concentrations comme le lapatinib, le gefitinib, l'erlotinib, ou le vémurafénib pour lequel une étude avait montré une activité ligand de PXR à des concentrations cliniquement pertinentes [283]. Nous démontrons également pour la première fois que le dabrafénib est un agoniste de PXR et que cette activité ligand est encore plus marquée que celle du SR12813, utilisé comme agoniste de référence (**Fig. 26A & B**). Ce résultat original a été confirmé indépendamment dans notre clone 10 de la lignée 22RV1 surexprimant PXR. Son activité agoniste est également supérieure à celle du SR12813 mais uniquement pour des concentrations supérieures à 0,1 μ M (**Fig.26C**).

A



B



C

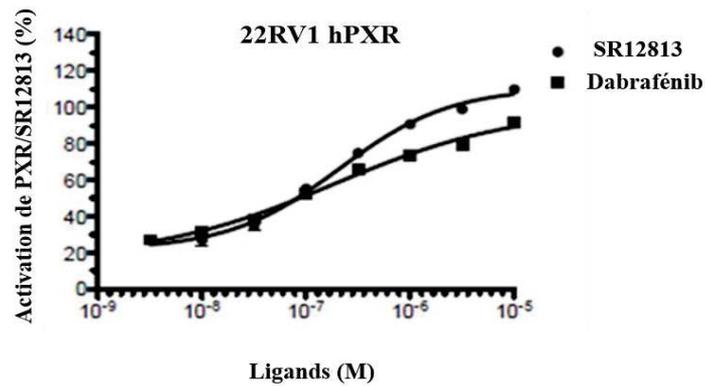


Figure 26: Mesure de l'effet agoniste de PXR d'un panel d'inhibiteurs de kinases et de l'enzalutamide par rapport au SR12813 dans les modèles de LS-PXR (A), HepG2-PXR (B) et 22RV1hPXR (C). L'effet agoniste est évalué par quantification de la luminescence produite grâce à l'expression du gène rapporteur de la luciférase et rapportée à l'effet du SR12813 considéré comme 100% pour une concentration de 3 μ M.

Sur la base de ces résultats, nous avons voulu confirmer l'effet agoniste de PXR de certains inhibiteurs de kinases, en vérifiant s'ils étaient capables d'induire l'expression des gènes cibles de PXR comme le *CYP3A4* et *ABCB1*. Nous avons débuté cette analyse par les deux inhibiteurs de BRAF, le vémurafénib et le dabrafénib. Les résultats de la **figure 27** montrent que le traitement du modèle de 22RV1hPXR clone 15 par des concentrations croissantes de vémurafénib induit bien l'expression ARNm et protéique de *CYP3A4* et *ABCB1*, mais également l'expression du gène NR1I2 lui-même (**Fig. 27**). A noter que cette induction n'est significative (de l'ordre de 3 à 5 fois) que pour les concentrations de vémurafénib la plus élevée (10 μ M), concentration à laquelle un effet agoniste PXR est décelable (**Fig. 27A**). Dans le cas du dabrafénib, des résultats similaires sont observés avec une induction de l'expression du gène *CYP3A4* du même ordre mais pour des concentrations d'inhibiteur 100 fois inférieures à celle du vémurafénib. Nous avons aussi confirmé l'effet agoniste supérieur par rapport au dérivé SR12813, avec une induction environ 2 fois supérieure de l'expression protéique du *CYP3A4* pour des concentrations équivalentes de 1 μ M (**Fig. 28**).

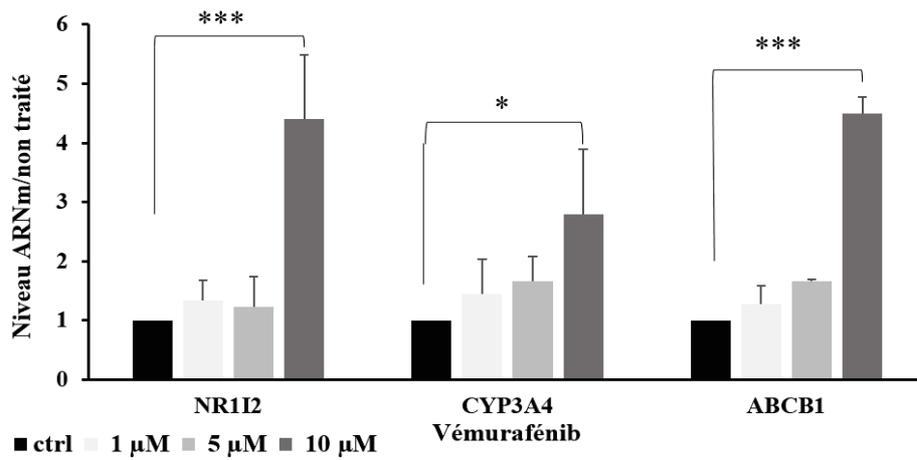
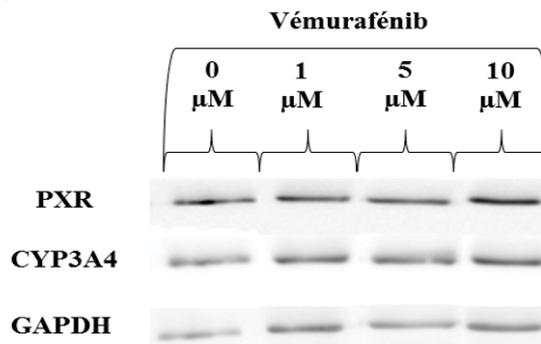
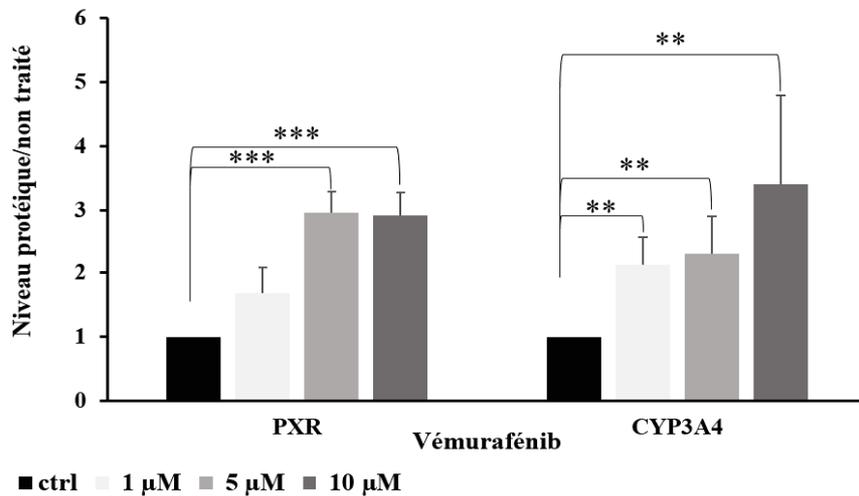
A**B**

Figure 27 : Niveau d'expression des gènes PXR, CYP3A4 et ABCB1 dans le modèle 22RV1hPXR c115, après traitement par des concentrations croissantes de vémurafénib (A) Niveau d'expression ARNm des gènes CYP3A4, ABCB1 et NR1I2, normalisé par rapport à l'expression du gène HPRT. (B) Niveau d'expression protéique de CYP3A4 et de PXR mesuré par Western blotting et normalisé par rapport à l'expression de la GAPDH (Western Blot issus des travaux de M2 de Mme Leenhardt.F).

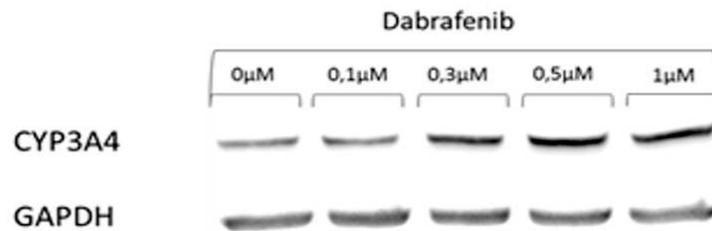
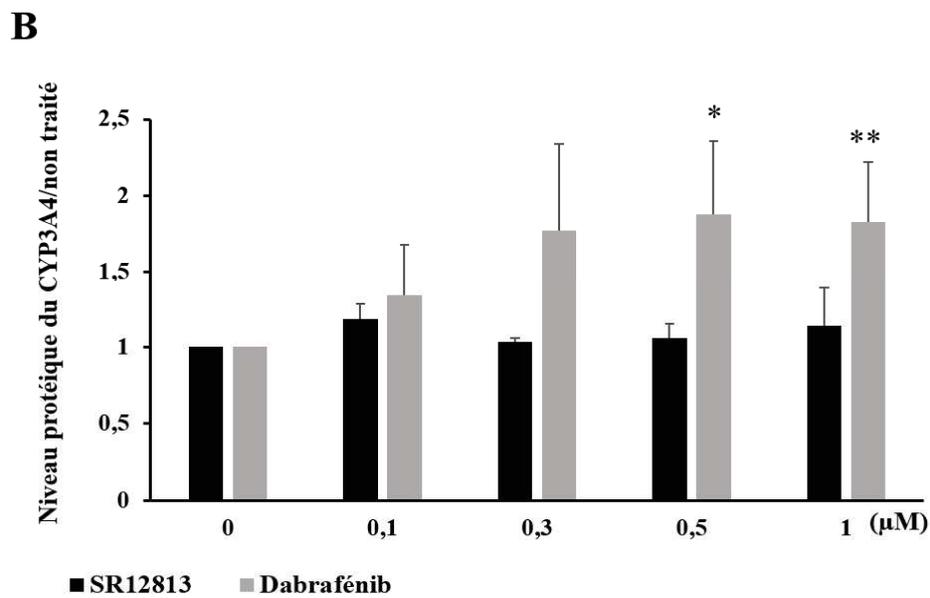
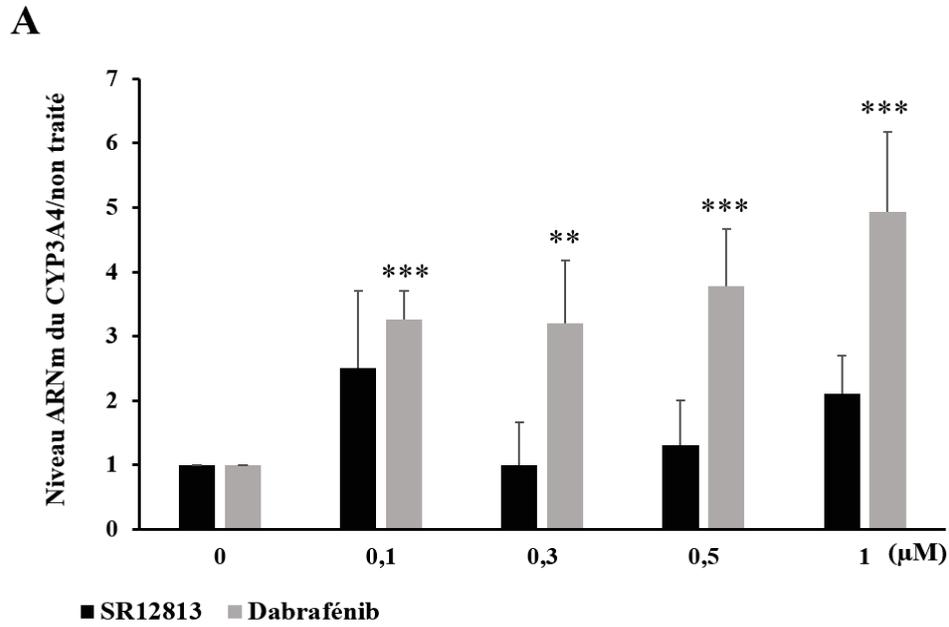


Figure 28: Niveaux d'expression du gène CYP3A4 dans la lignée 22RV1hPXR c115, après traitement par des concentrations croissantes de dabrafénib et de SR12813, (A) au niveau ARNm avec normalisation par rapport à l'expression du gène HPRT, et (B) au niveau protéique avec normalisation par rapport à l'expression de la GAPDH.

Nous avons voulu confirmer le caractère agoniste marqué inattendu du dabrafénib dans la lignée de cancer colique LS surexprimant PXR (LS-PXR) (**Fig. 29**). Les résultats montrent clairement que dans ce modèle le traitement des cellules par le dabrafénib induit une surexpression très significative du gène *CYP3A4* qui est d'environ 50 fois par rapport aux cellules non traitées, dès la concentration de 0,1 μ M d'inhibiteur et qui va jusqu'à 300 fois pour la concentration la plus élevée de 1 μ M (**Fig. 29A**). Contrairement au modèle 22RV1hPXR les effets sur l'expression de *CYP3A4* du dabrafénib et du SR12813 dans la lignée LS-PXR sont équivalents (**Fig. 29A**). Un effet du dabrafénib sur l'expression du gène *ABCB1* est également observé, mais l'augmentation de son expression n'est que d'environ 3 fois (**Fig. 29 B & C**). Le dabrafénib induit également une augmentation du même ordre de l'expression du gène *NR1I2*, ce qui n'est pas observé pour le composé SR12813 (**Fig. 29 B & C**).

L'ensemble de ces données confirme donc le caractère agoniste de deux inhibiteurs de B-RAF, le vémurafénib et surtout le dabrafénib dont les effets agonistes sur PXR sont du même ordre ou supérieur à l'agoniste de référence SR12813. Ce résultat original peut avoir des répercussions cliniques majeures dans la mesure où cette classe d'inhibiteurs est de plus en plus utilisée en cancérologie en association avec d'autres inhibiteurs, notamment les inhibiteurs de MEK. Le fait que ces molécules, en dehors de ce caractère agoniste de PXR, puissent également réguler l'expression de *NR1I2* renforce également l'intérêt de choisir de manière rationnelle les médicaments qui seront associés à ces inhibiteurs.

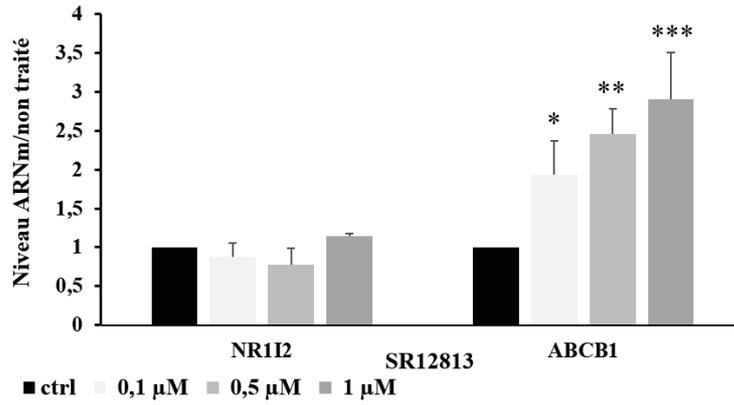
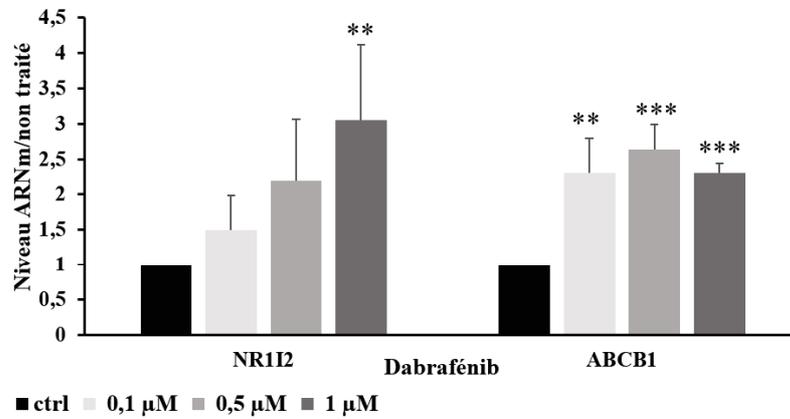
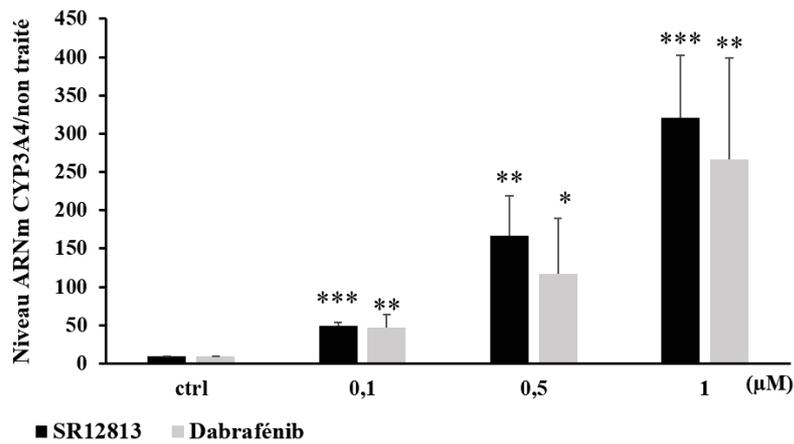
A**B****C**

Figure 29: Niveau d'ARN messagers des gènes NR1I2 (A), ABCB1 (B) et CYP3A4 (C) dans le modèle LS-PXR, après traitement par des concentrations croissantes de dabrafénib ou de SR12813. L'expression de chaque gène est normalisée par rapport à l'expression du gène HPRT.

10. Effet de la surexpression de PXR sur la sensibilité cellulaire aux associations contenant un inhibiteur de B-RAF.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'effet agoniste des inhibiteurs de B-RAF sur PXR, notamment celui du dabrafénib qui semble être très marqué, revêt une importance capitale pour leur combinaison à d'autres médicaments, dans la mesure où ils peuvent entraîner une modification de leur métabolisme et/ou de leur transport. Nous avons donc comparé l'effet de la combinaison dabrafénib + tramétinib, qui est déjà approuvée dans le traitement du mélanome, entre la lignée 22RV1 surexprimant PXR (clone 10) et la lignée 22RV1-pcDNA3 contrôle (clone 3). Nous avons réalisé ces tests en utilisant la méthodologie des matrices de synergie permettant de déterminer si l'effet de la combinaison est synergique, antagoniste ou additif, et ce, pour chaque jeu de concentrations des deux inhibiteurs (voir partie Matériels et Méthodes). Les résultats de ces matrices sont présentés dans la **figure 30**. Ils montrent que dans la lignée contrôle qui possède un niveau d'expression très faible de PXR, l'association entre le dabrafénib et le tramétinib est plutôt additive. En effet, dans ce type d'approche, il faut noter que les différences entre matrice observée et matrice d'additivité estimée ne sont généralement considérées « significatives » que lorsqu'elles sont supérieures à 10 ou inférieures à -10, alors qu'entre ces deux valeurs l'effet est considéré comme additif. Dans la lignée surexprimant PXR les résultats montrent que l'association entre le dabrafénib et le tramétinib est plutôt antagoniste (**Fig. 30A**). Il est intéressant de remarquer que cet antagonisme est plus important aux concentrations de dabrafénib pour lesquelles il induit fortement la transcription des gènes cibles de PXR. Comme nous le discuterons plus loin cet effet peut être lié à une inactivation PXR-dépendante du tramétinib induite par le dabrafénib. L'association entre le dabrafénib et le cobimétinib, un autre inhibiteur de MEK a également été testé dans les mêmes conditions (**Fig. 30B**). Les résultats montrent un effet globalement additif de cette association dans la lignée contrôle, effet qui n'est pas altéré lorsque PXR est surexprimé dans le clone 10 (**Fig. 30B**). Ces résultats confirment à l'évidence une différence de métabolisme entre les deux inhibiteurs de MEK, et renforcent l'idée que le choix des molécules à combiner est crucial pour obtenir un effet synergique de l'association. D'autres associations avec le dabrafénib, l'erlotinib ou l'afatinib ayant montré un effet antiprolifératif accru dans la lignée 22RV1 surexprimant PXR sont en cours d'évaluation.

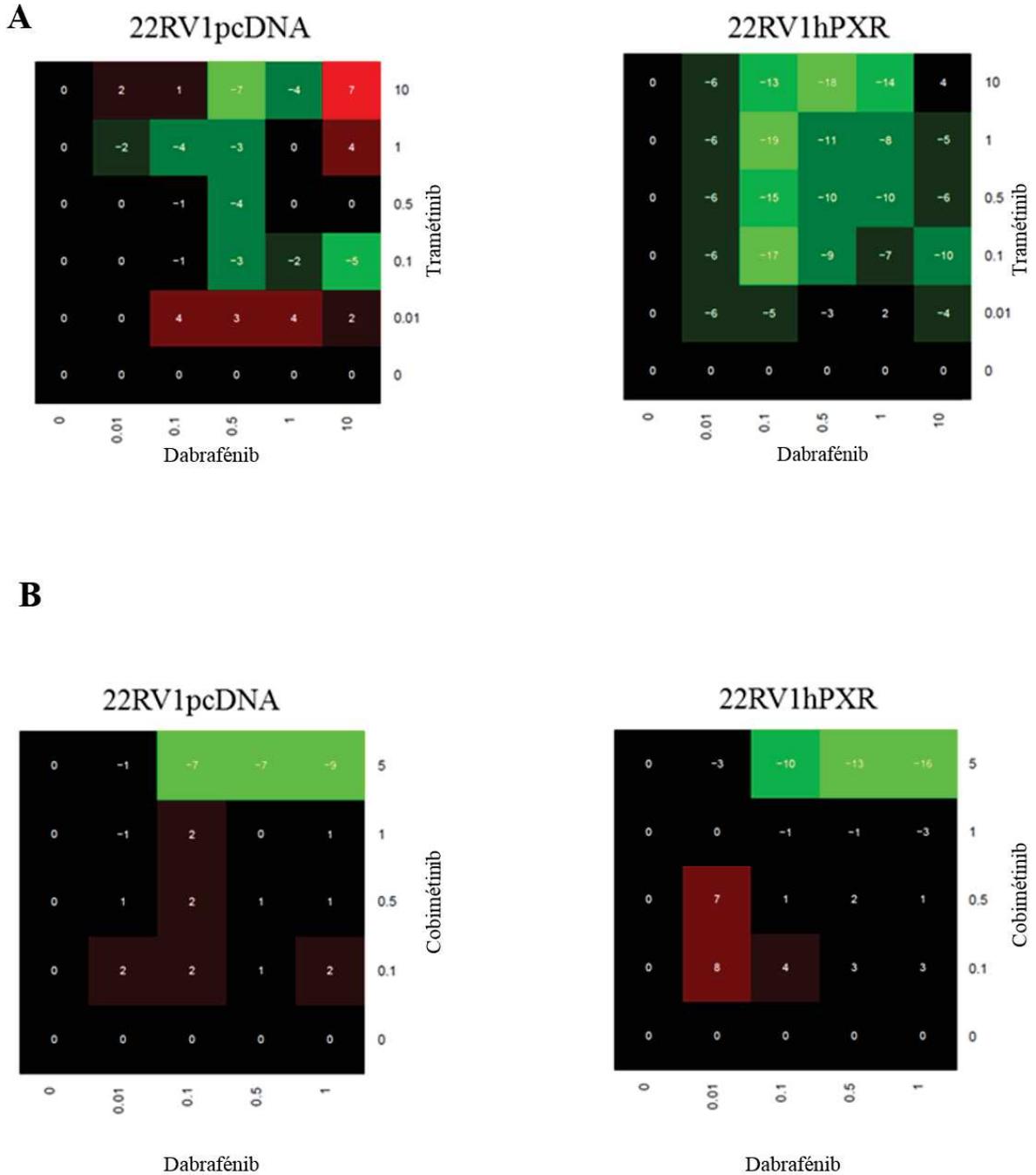


Figure 30 : Effet de la surexpression de PXR sur la sensibilité des cellules 22RV1 aux combinaisons dabrafénib+tramétinib (A) et dabrafénib+cobimétinib (B) évalué par le test de cytotoxicité à la sulforhodamine B. Les effets synergiques, antagonistes ou additifs sont évalués par la méthodologie des « matrices de synergie » qui est développée dans la partie Matériel et Méthodes. Les panels de gauche concernent les résultats obtenus pour la lignée 22RV1 transfectée par le vecteur vide (22RV1pcDNA), les panels de droite concernent les résultats obtenus pour la lignée 22RV1 surexprimant PXR (22RV1hPXR).

D DISCUSSION et PERSPECTIVES

Dans le cancer de la prostate, les essais cliniques qui ont été réalisés pour évaluer l'efficacité des IKs ont donné des résultats mitigés malgré la présence des cibles pharmacologiques de ces thérapies ciblées dans les cellules de cancers prostatiques (VEGF, EGFR, CMET..) [9]. Les différentes conclusions de ces essais cliniques se sont surtout intéressées aux variabilités inhérentes à la cible pharmacologique ou la pharmacocinétique, mais très peu à la variabilité du métabolisme intra-tumoral des molécules testées [284], [285]. L'étude de *Chen et al.* (2007) est la première étude à avoir mis en évidence l'expression de PXR dans des tumeurs de prostate, et a démontré que l'expression la plus forte de PXR est observée dans les tumeurs avec un score de Gleason de 6. Ces auteurs ont également observé une présence majoritairement cytoplasmique de PXR et parfois nucléaire suggérant une activation du xénorécepteur le délocalisant dans le noyau où il exerce son activité de facteur de transcription [6]. Néanmoins, ils n'ont évalué la résistance induite par PXR que sur la réponse aux paclitaxel et à la vinblastine, qui ne sont pas utilisés dans le traitement du cancer de la prostate. Une autre étude de *Fujimura et al* de 2009 a ensuite démontré que l'expression du gène CYP3A4 était plus faible dans le cancer de la prostate par rapport aux tissus sains de prostate et que cette expression diminuait avec la progression du cancer vers les stades avancés. Ils ont aussi mis en évidence que l'expression de CYP3A4 était corrélée à une meilleure survie des patients [278]. Ces résultats discordants d'expression de PXR et de sa principale cible CYP3A4 dans le cancer de la prostate, nous ont amené à analyser à nouveau l'expression de ces deux protéines à différents stades du cancer de la prostate. Nous avons étudié, en collaboration avec le groupe du Pr Gaëlle Fromont du CHU de Tours, l'expression de PXR par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs de prostate. Nos résultats confirment la localisation majoritairement cytoplasmique de PXR mais mettent en évidence une forte corrélation entre l'expression de PXR et le stade TNM ainsi que le score ISUP pour les cancers cliniquement localisés. De manière intéressante, nos résultats montrent également qu'un immuno-marquage positif de PXR est beaucoup plus fréquent dans les stades résistants à la castration et les métastases par rapport aux formes cliniquement localisées. De plus, le marquage Ki67 montre une relation entre l'expression de PXR et la prolifération cellulaire ce qui est cohérent avec la littérature qui décrit PXR comme un acteur de la prolifération cellulaire de nombreux cancers [225]. Ces résultats démontrent donc l'importance de PXR dans l'évolution du cancer de la prostate. Enfin, d'autres tests d'immunomarquages sont en cours de réalisation avec les anticorps anti-ABCB1 et ABCG2 et aussi avec un autre anticorps anti-CYP3A4, le premier n'ayant pas permis d'obtenir de signal.

Etant donné que les Inhibiteurs de Kinases sont décrits comme étant majoritairement métabolisés par le CYP3A4 et transportés par les pompes à efflux ABCB1 et ABCG2[3], gènes cibles de PXR, la forte expression de ce xénorécepteur dans les cancers de prostate de stades avancés pourrait être en partie responsable des résultats mitigés de certains essais cliniques ayant évalué l'efficacité des inhibiteurs de kinases dans cette indication.

L'approche *in cellulo* nous a permis de mettre en évidence une certaine «compétence métabolique» des lignées de cancer de prostate, notamment pour les lignées PC3, LnCap et 22RV1 exprimant une forme fonctionnelle de PXR ainsi que la plupart des gènes du métabolisme et du transport. Cependant, l'activation de PXR par son agoniste de référence, le SR12813, n'a pas permis d'augmentation significative de l'expression des gènes cibles de PXR et s'est traduit par le fait que dans les lignées basales, le traitement par SR12813 n'était pas capable de moduler la sensibilité de ces lignées aux différents inhibiteurs de kinases testés.

Ces résultats pourraient donc être liés à une trop faible expression du gène *NR1I2*. En effet, dans les cellules mises en culture, il est connu que de nombreux gènes sont soumis à des mécanismes épigénétiques pouvant diminuer ou éteindre leur expression, l'un des plus décrit étant l'hyperméthylation des promoteurs [215]. Notre hypothèse, selon laquelle l'hyperméthylation pourrait être à l'origine de la diminution de l'expression de PXR, repose sur plusieurs travaux antérieurs. Une étude a démontré que l'expression du gène *NR1I2* est liée à la méthylation d'un îlot CpG sur l'exon 3, entraînant une extinction du gène dans des cellules de neuroblastome [214]. Une autre étude a montré qu'une grande majorité des gènes exprimés dans les lignées de cancer de la prostate sont hyperméthylés, ce qui ne reflète pas leur expression au niveau tumoral [216]. Nos résultats de déméthylation utilisant la 5 aza-2 déoxycytidine ont démontré dans la lignée LnCap et 22RV1, que l'expression de *NR1I2* était bien sous le contrôle de ce mécanisme épigénétique. Une étude plus approfondie du mécanisme de méthylation de *NR1I2* devra être réalisée, pour identifier le ou les îlots CpG impliqués dans l'extinction de ce gène dans ces modèles. Une évaluation de l'état de méthylation de *NR1I2* dans les biopsies de cancer de la prostate et l'analyse des différences entre tissus sains et tumoraux pourra également être envisagée dans le cadre d'une recherche de biomarqueurs épigénétiques comme cela a été fait pour la *GSTP1* [286].

Le niveau d'expression de PXR et de ses gènes cibles peut également être modulé par les conditions de culture. Si le milieu complétement par du sérum de veau fœtal est largement utilisé pour cultiver les lignées de cancer de la prostate, beaucoup d'études utilisent également

un milieu dé-stéroïdé supplémenté par l'androgène de synthèse non métabolisable R1881 [287], [288]. Or, nous avons pu démontrer que l'utilisation de ce dernier entraîne une augmentation spécifique de l'expression du *CYP3A4* dans les lignées androgène-dépendantes. Ces résultats sont à mettre en parallèle du « *cross-talk* » qui existe entre AR et PXR décrit antérieurement [282]. En effet, dans la lignée DU145, la surexpression d'AR entraîne une diminution de l'activité de PXR alors que la répression d'AR conduisait à une augmentation de l'activité de PXR [282], suggérant une interaction entre ces deux facteurs de transcription, ce que les auteurs ont effectivement observé par immunoprécipitation de la chromatine [282]. L'ensemble de ces résultats renforcent notre hypothèse selon laquelle PXR pourrait être sous le contrôle négatif d'AR dans les lignées androgène-dépendantes LnCap et 22RV1. Il faut néanmoins garder à l'esprit que la transactivation de *NR1I2* est également contrôlé par de nombreux autres récepteurs nucléaires dont celui des glucocorticoïdes [275].

L'utilisation de modèles de surexpression stable de PXR dans la lignée 22RV1 nous a permis d'investiguer plus précisément le rôle de PXR dans les variations de sensibilité de cette lignée aux différents IKs. Il est intéressant d'observer que PXR exerce un effet différent sur la sensibilité en fonction de la drogue testée. En effet, les IKs présentent des voies métaboliques complexes avec des métabolites actifs ou inactifs dont la prise en charge par les transporteurs d'influx et d'efflux peut être différente [3]. Par exemple, l'erlotinib est décrit comme étant majoritairement métabolisé par le CYP3A4/5 en un métabolite actif, l'OSI420, pouvant avoir un rôle dans l'efficacité thérapeutique [289]. Le dabrafénib subit quant à lui un métabolisme oxydatif, d'une part majoritairement par le CYP3A4, puis le CYP2C9 et CYP2C19 pour donner le desméthyl-dabrafénib et d'autre part, principalement par le CYP2C8, puis le CYP3A4 et CYP2C9, pour donner l'hydroxy-dabrafénib, lui-même métabolisé par le CYP3A4 en carboxy-dabrafénib [290]. Les deux principaux métabolites du dabrafénib, l'hydroxy et le desméthyl-dabrafénib ont été décrits *in vitro* comme ayant une activité inhibitrice sur la mutation B-Raf V600E/K [291]. Ces deux molécules ont aussi la capacité d'induire leur propre métabolisme et donc de moduler leur efficacité. L'erlotinib a déjà été décrit comme étant un ligand agoniste de PXR, pouvant induire l'expression du CYP3A4 et le dabrafénib comme étant un inducteur de l'activité de nombreux CYP450 dont le CYP3A4 [190], [291]. Cependant, le métabolisme peut ne pas être la seule explication aux résultats observés pour ces deux molécules, notamment pour l'afatinib, un IK non métabolisable, présentant le même profil de sensibilisation que l'erlotinib ou le dabrafénib dans la lignée 22RV1. De nombreux IKs sont substrats des transporteurs à influx, les *SLC* et

des pompes à efflux de la famille des ABC transporteurs [240]. Les transporteurs de la famille des *SLC* sont largement décrits comme étant exprimés dans le cancer de la prostate, notamment le *SLC01B3* permettant le transport de certains androgènes (DHEA) [292]. Les transporteurs de la famille ABC sont aussi exprimés dans les cancers de la prostate, notamment ABCG2, responsable de la résistance à la mitoxantrone et ABCB1, responsable de la résistance au docétaxel [58]. De manière intéressante, la prise en charge des IKs et de leurs métabolites par les transporteurs d'influx n'est pas incontournable. Par exemple, concernant les 3 inhibiteurs pour lesquels la surexpression de PXR modifie l'IC₅₀ dans la lignée 22RV1, seuls le carboxy-dabrafénib et l'erlotinib sont des substrats des pompes à influx SLC01B1 et SLC01B3, alors que l'afatinib, le dabrafénib, le desméthyl et l'hydroxy-dabrafénib ne sont pas pris en charge par ces transporteurs [240], [290]. En effet, il est de plus en plus discuté que les IKs et leurs métabolites, notamment ceux non chargés, passeraient de manière passive les membranes et n'utiliseraient pas les transporteurs d'influx [240]. Dernièrement, il a aussi été décrit que les IKs pourraient être des inhibiteurs de l'activité des pompes à influx, comme par exemple l'afatinib et l'erlotinib qui seraient des inhibiteurs SLC02B1 et SLC01B3, pouvant être à l'origine d'une diminution de leur influx, ou celle de molécules associées [293], [294]. Enfin, et comme de nombreux IKs, le dabrafénib, l'erlotinib et l'afatinib sont décrits comme étant des substrats et inhibiteurs de des transporteurs ABCB1 et ABCG2, pouvant être à l'origine de leur accumulation intra-cellulaire [264], [295]. Au vu de ces différentes études, il est donc crucial de pouvoir identifier si cette hypersensibilité aux IKs que nous avons observé lorsque PXR est surexprimé, est liée à une production accrue de métabolites actifs, étude que nous avons débuté en effectuant un profilage métabolique du dabrafénib, de l'erlotinib et de l'afatinib, ainsi que leurs métabolites par une technique HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Cette technique a une sensibilité suffisante pour quantifier les métabolites au niveau intra- et extracellulaire.

A ce jour, seuls les travaux de *Harmsen et al* (2008, 2009 et 2012) ont montré que certains agents cytotoxiques et certaines thérapies ciblées pouvaient être des agonistes de PXR, notamment le paclitaxel [233]. De la même manière, nous avons évalué l'effet ligand d'un panel d'IKs sur PXR et avons identifié certains IKs comme étant agonistes de PXR, notamment le dabrafénib. Cet inhibiteur est la première molécule ayant montré un effet agoniste de PXR plus fort que la molécule agoniste de référence, le SR12813. Il est intéressant de noter que l'activité agoniste PXR de cet IK n'est pas référencée dans la bibliographie, à part dans le résumé de ses caractéristiques où il est simplement décrit comme

ayant « une activité sur PXR ». De plus, le dabrafénib est déjà utilisé en clinique dans le mélanome seul ou en association avec le tramétinib (anti-MEK) et testé dans d'autres indications comme le cancer colorectal, du poumon non à petites cellules et de la thyroïde (*clinical trial.gov*). Il est clair que, selon les capacités métaboliques de la tumeur, son utilisation, seul ou en association avec le tramétinib ou d'autres médicaments, pourrait avoir des conséquences majeures sur la réponse tumorale, en modifiant son propre métabolisme ou en modifiant celui des médicaments associés. Bien que moins marquée que celle du dabrafénib, nous avons également pu mettre en évidence une capacité agoniste de PXR pour le vémurafénib, un autre membre de la famille anti-BRAF, ce qui confirme les résultats d'une étude antérieure [283]. Dans cette même étude, il a aussi été démontré les conséquences de l'activité de PXR sur l'efficacité du vémurafénib dans des modèles *in vitro* et de souris humanisées. *In vitro*, son efficacité est majoritairement modulée par le CYP3A4, enzyme majeure de sa métabolisation. *A contrario, in vivo*, la biodisponibilité du vémurafénib est principalement influencée par l'augmentation d'ABCB1. Au vu des résultats obtenus avec le vémurafénib, il est crucial de développer les connaissances sur l'interaction PXR-dabrafénib et ses conséquences au niveau de son métabolisme *in vitro* et *in vivo*. En revanche, nous n'avons pas confirmé les résultats des études qui ont démontré que l'erlotinib, le géfitinib et le vémurafénib sont des agonistes de PXR [190], [283]. En effet, pour l'erlotinib et le géfitinib, pourtant décrits comme capables d'induire l'activité de PXR et d'augmenter l'expression ARNm et protéique d'ABCB1, nos résultats ne montrent qu'une stimulation du CYP3A4 non spécifique de PXR. Ces deux IKs ont induit la luciférase sous le contrôle du promoteur du *CYP3A4* mais sans activer PXR ; le vémurafénib, quant à lui, a entraîné une augmentation simultanée de l'expression et l'activité de *NR1I2*. Nous supposons que cette augmentation de l'expression du gène *NR1I2* serait liée à une stimulation du promoteur CMV, via l'émission de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). En effet, il a été décrit sur des cellules de muscles lisses que les DRO sont capables d'activer le promoteur CMV via le facteur de transcription NF-κB [296]. De plus, une récente étude utilisant des cellules cancéreuses de mélanome (A375 et SKMel28), a décrit le vémurafénib comme étant capable d'augmenter la respiration mitochondriale et la génération de DRO [297]. C'est pourquoi, suite à ces différents résultats avec le vémurafénib, faisant supposer que le promoteur CMV pourrait ne pas être assez stable, la plateforme PCC du Dr Balaguer est en train de générer de nouveaux modèles de sur-expression avec un nouveau promoteur, le SV40.

Il est intéressant de noter que des travaux antérieurs ont aussi démontré que certaines chimiothérapies sont des agonistes de PXR qui entraînent une augmentation spécifique

d'ABCB1 [234]. Il a notamment été démontré que divers types de chimiothérapies sont capables d'augmenter l'expression ARNm et protéique d'ABCB1 ; en revanche seul le paclitaxel peut induire l'expression protéique de CYP3A4, faisant de lui un potentiel ligand de PXR [233]. Beaucoup d'agents anticancéreux pourraient donc être responsables de leur propre efflux par l'augmentation de l'expression d'ABCB1, source principale de la résistance dite pléiotropique observée en clinique et probablement responsable d'une partie de l'échec des traitements. De récents travaux ont également montré que les fortes capacités de chimiorésistance au FOLFIRI des cellules souches cancéreuses de colon pourraient être liées à PXR et ses gènes cibles dont les pompes à efflux (ABCG2 et ABCC6)[298].

Nos résultats originaux sur la propriété agoniste puissante du dabrafénib mettent en lumière la possibilité que beaucoup d'autres inhibiteurs puissent aussi exercer un effet agoniste de PXR. Dans le cas du dabrafénib, une collaboration a été initiée avec l'équipe du Dr. W. Bourguet (Centre de Biochimie Structural de Montpellier) pour modéliser, à partir de la structure cristalline du complexe dabrafénib/PXR qui vient d'être obtenue, l'interaction de l'inhibiteur avec le xénorécepteur. Cela nous permettra de générer des dérivés du dabrafénib actifs sur sa cible pharmacologique mais dépourvus d'effet ligand sur PXR, permettant d'améliorer l'efficacité de ces inhibiteurs de RAF (sujet de Thèse de M. Schneider).

A ce jour, la plupart des traitements anticancéreux administrés sont des combinaisons de traitements incluant des agents cytotoxiques, des thérapies ciblées (IKs) et éventuellement des immunothérapies auxquelles s'ajoutent des traitements adjuvants ou de l'automédication par la phytothérapie. Ces associations représentent autant de possibilité d'activer PXR et d'influencer la réponse tumorale aux traitements. Par conséquent, il est impératif d'identifier au préalable les molécules qui sont susceptibles d'activer directement ou indirectement PXR ou ses gènes cibles, afin d'identifier les associations thérapeutiques qui seront les plus synergiques. L'effet de l'association entre IKs ou d'un IK avec des chimiothérapies est d'ores et déjà étudié sur la base que certains IKs sont des inhibiteurs des pompes à efflux ABCB1 et ABCG2 [264]. Dans le but de montrer que PXR peut aussi influencer l'efficacité d'associations d'IKs, nous avons utilisé le dabrafénib comme agoniste de PXR et l'avons associé à deux anti-MEK, le tramétinib avec qui il est approuvé dans le traitement du mélanome, et avec le cobimétinib. De manière intéressante, l'association dabrafénib-tramétinib qui est additive dans la lignée 22RV1 contrôle devient antagoniste dans la lignée surexprimant PXR, notamment pour les concentrations de dabrafénib qui sont activatrices de PXR. Le mécanisme sous-jacent à cet antagonisme est encore inconnu mais plusieurs

hypothèses peuvent être envisagées: la première est que le tramétinib ou le dabrafénib soient davantage efflués via les transporteurs ABCB1 et/ou ABCG2, dans la mesure où le dabrafénib et le tramétinib sont connus pour être des substrats de ces pompes dans la lignée de rein MDCKII surexprimant ABCB1 et ABCG2 [299], [300]. Cependant, une récente étude a démontré qu'*in vitro* et *in vivo*, le tramétinib serait un inhibiteur de l'activité d'ABCB1 [301], suggérant que seule la pompe ABCG2 serait responsable de l'antagonisme. La deuxième hypothèse serait liée au métabolisme des deux inhibiteurs sachant que pour le tramétinib on sait seulement qu'il est métabolisé par les carboxylestérases (RCP). Il faudrait donc caractériser plus avant ses métabolites et leur activité intrinsèque. Le fait que nous n'ayons pas observé d'effet antagoniste dans le cas de l'association du dabrafénib avec le cobimétinib, dont le métabolisme est principalement lié au CYP3A4 [302], suggèrerait que la différence de sensibilité observée avec le tramétinib serait plutôt liée à une altération du métabolisme de ce dernier, induite par l'effet agoniste du dabrafénib sur PXR. Néanmoins, ce résultat nous donne une idée de l'influence que pourrait avoir PXR au niveau tumoral sur l'efficacité de l'association à différentes concentrations. Dans le but d'identifier la ou les voies métaboliques impliquées dans la synergie ou l'antagonisme de ces associations, nous envisageons de réaliser d'une part, un profilage métabolique de chacune de ces molécules par spectrométrie de masse et d'autre part, des associations incluant les IKs avec des inhibiteurs connus du CYP3A4 (Kétoconazole) et ABCB1 (Vérapamil). Ce qui nous donnera assez de rationnel pour envisager de nouvelles associations synergiques, en utilisant judicieusement le dabrafénib avec des molécules qui nécessiteront une activation métabolique via PXR pour être efficace.

E CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats de ce projet ont ouvert sur de nombreuses perspectives tant sur le plan mécanistique avec la caractérisation du rôle central de PXR dans le métabolisme intra-tumoral des IKs, que sur le plan clinique en termes d'associations médicamenteuses. En effet, la plupart des IKs administrés actuellement dans les cancers, sont des combinaisons auxquelles vont s'ajouter des traitements adjuvants ou de l'automédication "alternative". Ces associations représentent autant de possibilités d'activer PXR, ce qui peut avoir des conséquences importantes en ce qui concerne la réponse tumorale, comme l'indiquent les résultats que nous avons obtenus dans les modèles cellulaires de cancer de prostate surexprimant PXR. Il nous reste encore à identifier de manière plus détaillée le(s) mécanisme(s) impliqué(s). L'une des pistes que nous explorons est celle d'une altération du métabolisme de ces inhibiteurs, ce que nous sommes en train d'investiguer en mettant au point une méthode de dosage intra et extra-cellulaire de ces composés (erlotinib, afatinib et dabrafénib) et de leur métabolites connus par spectrométrie de masse. Cependant, le fait que PXR contrôle également l'expression de gènes impliqués dans de multiples voies contrôlant la progression tumorale [225], l'étude de l'activation ou de l'inactivation de ces voies est également envisagée.

De manière plus globale, nos résultats renforcent l'importance de PXR et du métabolisme dans la réponse tumorale aux inhibiteurs de kinases, et peuvent servir de base mécanistique pour expliquer certains résultats négatifs d'essais cliniques menés dans les cancers de la prostate [9]. Si des études antérieures ont déjà démontré l'intérêt potentiel de l'utilisation de PXR comme marqueur pronostic de l'évolution du cancer de la prostate[8], [278], nos résultats suggèrent que PXR pourrait également être utilisé comme marqueur prédictif de réponse à certains inhibiteurs de kinases dans cette pathologie. La nécessité de tels marqueurs est d'une importance capitale dans la mesure où un très grand nombre d'inhibiteurs sont récemment arrivés sur le marché ou le seront dans un futur proche. Actuellement, il n'existe que très peu de rationnel biologique, hormis la présence ou l'absence des cibles, pour choisir l'inhibiteur à tester et a fortiori pour choisir la combinaison la plus synergique (et/ou la moins toxique) avec les autres traitements utilisés. Une démarche qui s'inscrit parfaitement dans l'ère de la médecine de précision.

F ANNEXES

Publications et communications

Nos résultats ont été présentés dans différents congrès :

Posters aux congrès Grand Sud Ouest (GSO : Bordeaux 2015 ; Montpellier 2016) et au congrès du Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique (GPCO ; Toulouse 2016 : Prix meilleur poster).

Communication orale au congrès « *7th Meeting On Nuclear Receptors* » de 2016 (Montpellier).

Communication orale à un congrès international « *47th Drug Metabolism Gordon Research Conference (GRC 2017)* » et obtention d'une bourse pour le voyage et l'inscription au congrès (USA).

L'ensemble de nos résultats font l'objet de deux publications en premier ou co-premier auteur, l'une se focalisant sur la découverte des propriétés agonistes du dabrafénib sur PXR, qui devrait être soumise avant la fin de cette année, l'autre qui présente l'effet de la modulation de PXR sur la sensibilité des lignées de cancer de la prostate aux inhibiteurs de kinases, qui est en cours de finalisation. Deux autres études de pharmacogénétiques en co-auteur, ayant abordé l'influence de polymorphismes des xénorécepteurs et de leurs gènes cible sur la pharmacocinétique et la toxicité de traitements anticancéreux, ont également été publiées mais n'ont pas été détaillées dans ce travail de Thèse.

- Publication en cours de soumission:

THE ANTI-CANCER DRUG DABRAFENIB IS A POTENT ACTIVATOR OF THE HUMAN PREGNANE X RECEPTOR.

Nicolas Creusot^{1,2,3,4,*}, Matthieu Gassiot^{1,2,3,4,*}, Marina Grimaldi^{1,2,3,4}, Vanessa Delfosse^{4,5,6}, Abdelhay Boulhatouf^{1,2,3,4}, Sabine Gerbal-Chaloin^{3,7}, Martine Daujat^{3,7}, Alexandre Evrard^{1,2,3,4}, William Bourguet^{4,5,6}, Philippe Pourquier^{1,2,3,4}, Patrick Balaguer^{1,2,3,4**}**

¹IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier 34298, France; ²Inserm, U1194, Montpellier 34298, France; ³Université Montpellier, Montpellier 34090, France; ⁴ICM, Institut régional du Cancer de Montpellier, Montpellier 34298, France; ⁵Inserm U1054, Montpellier 34090, France; ⁶CNRS UMR5048, Centre de Biochimie Structurale, Montpellier 34090, France ; ⁷Inserm U1040, Montpellier, France.

*These authors equally contributed to this work.

**These authors jointly supervised this work.

ABSTRACT (250 words max)

The human pregnane X receptor (PXR) is a ligand-regulated transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily. PXR is activated by a large set of structurally diverse endogenous and exogenous compounds. It is the master regulator of the expression of many genes involved in the metabolism and the excretion of potentially harmful chemicals and therapeutic drugs. PXR is widely expressed in many different normal or tumor tissues where it can play a role in both the development of multidrug resistance and the enhancement of cancer cells aggressiveness.

Dabrafenib is a BRAF inhibitor that was recently approved for the treatment of tumors harboring BRAF V600 mutations, either alone or in combination with the MEK inhibitor trametinib. Dabrafenib was suspected to induce CYP3A4 and CYP2B6 expression via the activation of PXR and the constitutive androstane receptor (CAR) nuclear receptors. To confirm this hypothesis, we tested the ability of dabrafenib to activate PXR and CAR using dedicated reporter cell lines. We demonstrated that submicromolar concentrations of dabrafenib could activate human PXR activity and was more potent than the reference agonist SR12813. This agonist activity was accompanied by increased expression of PXR target genes and proliferation of hPXR-overexpressing HepG2 cells. Conversely, dabrafenib had no effect on mouse or zebrafish PXR and did not alter the human CAR activity either. Taken together, our results further stipulate to take into account the potential activation of PXR when dabrafenib is used in combination with other drugs to avoid reduced efficacy or the occurrence of severe adverse events.

- Publication en cours de finalisation:

“ROLE OF THE XENOBIOTIC RECEPTOR PXR (PREGNANE X RECEPTOR) ON THE MODULATION OF PROSTATE CANCER CELL LINES SENSITIVITY TO KINASE INHIBITORS”.

Gassiot et al.

- Publications associées: Participation aux travaux du Dr Litaty Céphanoée MBatchi de la Faculté de Pharmacie de Montpellier et du CHU de Nîmes :

SHORT COMMUNICATION

Association of NR1I2, CYP3A5 and ABCB1 genetic polymorphisms with variability of temsirolimus pharmacokinetics and toxicity in patients with metastatic bladder cancer

Litaty C. Mbatchi^{1,2,3} · Matthieu Gassiot^{1,2} · Philippe Pourquier² · Alejandro Goberna⁴ · Hakim Mahammedi⁵ · Loic Mourey⁶ · Florence Joly⁷ · Serge Lumbroso¹ · Alexandre Evrard^{1,2,3} · Nadine Houede^{2,8}

Received: 14 March 2017 / Accepted: 27 June 2017 / Published online: 4 July 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract

Purpose Temsirolimus is a mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor that exhibits antitumor activity in renal cell carcinoma and mantle cell lymphoma. The metabolism of temsirolimus and its active metabolite sirolimus mainly depends on cytochrome P450 3A4/5 (CYP3A4/A5) and the ABCB1 transporter. Differently from sirolimus, no pharmacogenetic study on temsirolimus has been conducted. Therefore, the aim of this pilot study was to identify genetic determinants of the inter-individual variability in temsirolimus pharmacokinetics and toxicity.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00280-017-3379-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alexandre Evrard
alexandre.evrard@umontpellier.fr

¹ Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Nîmes, Hôpital Carémeau, Place du Professeur Robert Debré, 30029 Nîmes, Cedex 9, France

² IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, 34298 Montpellier, France

³ Laboratoire de Pharmacocinétique, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, Montpellier, France

⁴ Département de Recherche Clinique et d'Epidémiologie, Institut Bergonié, Bordeaux, France

⁵ Département d'Oncologie Médicale, Centre Jean Perrin, Clermont Ferrand, France

⁶ Département d'Oncologie Médicale, IUCT Oncopole, Toulouse, France

⁷ Département d'Oncologie Médicale, Centre François Baclesse, Caen, France

⁸ Département d'Oncologie Médicale, CHU Nîmes, Hôpital Carémeau, Nîmes, France

Methods Pharmacokinetic profiles were obtained for 16 patients with bladder cancer after intravenous infusion of 25 mg temsirolimus. Non-compartmental analysis was performed to calculate the pharmacokinetic parameters of temsirolimus and sirolimus, its main metabolite. The presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CYP3A5, ABCB1 and in their transcriptional regulator NR1I2 (PXR) was assessed by genotyping. Non-parametric statistical tests were used to assess associations between candidate SNPs and temsirolimus pharmacokinetics and toxicity.

Results The ratio between sirolimus AUC and temsirolimus AUC was 1.6-fold higher in patients who experienced serious toxic events ($p = 0.034$). The frequency of adverse events was significantly higher in patients homozygous for the NR1I2-rs6785049 A allele (OR = 0.065, $p = 0.04$) or NR1I2-rs3814055 C allele (OR = 0.032, $p = 0.006$). These NR1I2 SNPs were also predictive of temsirolimus half-life and global exposure to temsirolimus and sirolimus. Finally, the effect of the ABCB1-rs1128503, ABCB1-rs2032582 and CYP3A5*3 SNPs on sirolimus pharmacokinetics was confirmed.

Conclusions Our findings suggest that SNPs of NR1I2 and its target genes CYP3A5 and ABCB1 are genetic determinants of temsirolimus pharmacokinetics and toxicity in patients with bladder cancer.

Keywords Temsirolimus · Pharmacogenetics · NR1I2 · CYP3A5 · ABCB1 · Pharmacokinetics

Introduction

Temsirolimus, a sirolimus ester, is a prodrug approved for the treatment of various cancer types, including renal cell carcinoma [1]. However, the objective response rates

to this mTOR inhibitor, used alone or in combination with other chemotherapeutic agents, remain low. This absence of major clinical efficacy is not fully understood and may involve multiple mechanisms, including individual pharmacokinetic variability. The metabolism of temsirolimus and sirolimus, its active metabolite, is similar to that of calcineurin inhibitors (such as cyclosporine and tacrolimus) [2, 3]. Specifically, temsirolimus is a substrate of cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4 and member 5 (CYP3A4 and CYP3A5) and of ATP-binding cassette transporter B1 (ABCB1, also known as P-gp or MDR1) [4, 5]. A previous study showed that the amount of cytochrome P450-dependent metabolites of temsirolimus varies more than 20-fold among patients [6]. CYP3A4/5 and ABCB1 activities can be influenced by different factors, such as the level of induction, inhibition and competition and also genetic variations [7]. For instance, *CYP3A5* and *ABCB1* polymorphisms are the main genetic factors underlying the inter-individual pharmacokinetic variability of calcineurin inhibitors [3, 8]. Particularly, *CYP3A5**3 (an allele encoding a non-functional truncated enzyme) affects tacrolimus pharmacokinetics [3]. Consequently, guidelines for CYP3A5 genotype determination and tacrolimus dosing have been published by the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and The Royal Dutch Pharmacists Association Pharmacogenetics Working Group [9]. Similarly, *ABCB1* single nucleotide polymorphisms (SNPs) influence the pharmacokinetics of sirolimus and calcineurin inhibitors, especially rs1045642 (C.3435C > T, p.I1145I; a synonymous SNP that leads to decreased ABCB1 expression level), rs1128503 (C.1236.C > T, p.G412G) and rs2032582 (G2677.G > T/A, p.A893S/T) [10, 11]. The transcription levels of *CYP3A5* and *ABCB1* are regulated by the nuclear receptors NR1I2 (also known as Pregnane X Receptor) and NR1I3 (also known as Constitutive Androstane Receptor) [12, 13]. NR1I2 activation by ligands, such as rifampicin and hyperforin (St. John's wort), is the main mechanism that leads to CYP3A4 induction [14]. *NR1I2* polymorphisms have been linked to changes in *ABCB1* and *CYP3A4* expression levels, CYP3A4 induction and tacrolimus pharmacokinetic variability [15, 16].

Differently from cyclosporine, tacrolimus and sirolimus, pharmacogenetic studies on temsirolimus are lacking. The aim of the present pilot study was to assess the effects of *CYP3A5*, *ABCB1* and *NR1I2* SNPs on the pharmacokinetics and toxicity of temsirolimus and its active metabolite sirolimus in a cohort of patients with urothelial carcinoma of the bladder.

Patients and methods

Patients

Fifty-four patients with relapsed urothelial carcinoma of the bladder who were refractory to first-line chemotherapy were enrolled in the VESTOR clinical trial (NCT01827943) approved by the *Institut Bergonié* ethical committee (Bordeaux, France). Temsirolimus was administered intravenously at a dose of 25 mg, once per week, by 30-min infusion, and was associated with anti-H1 treatment to avoid allergic reactions. Concomitant administration of known CYP3A4/5 inhibitors or inducers was not allowed. Among the 54 patients, 16 accepted additional blood sampling at different time points for an ancillary pharmacokinetic study. All patients signed an informed consent for the pharmacokinetic and genetic study. Data related to serious toxic events were collected according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (version 3) and then pooled, independently of the affected organ and cycle of treatment, in order to stratify patients in two groups: (i) patients who experienced grade 3 and 4 toxicity and (ii) patients who experienced grade 1 and 2 or no toxicity (Table 1).

Sirolimus and temsirolimus quantification in blood and pharmacokinetic analysis

During the first cycle of chemotherapy, venous blood samples were collected in tubes with dipotassium ethylene-diamine-tetra-acetic acid (K_2 EDTA) as anticoagulant at 0 (before starting the infusion), 0.25, 0.5 (end of infusion), 1.5, 3.5, 8, 24, 48, 96 and 168 h. Temsirolimus and sirolimus in blood samples were simultaneously quantified by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) using a Shimadzu LC-20 Prominence HPLC system (Tokyo, Japan) coupled to an AB/SCIEX API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (Foster City, CA, USA), according to a modified version of the protocol described by Navarette et al. [17], in which the internal standard was replaced by [$^{13}C_3, ^2H_7$]-temsirolimus. The method was linear in a concentration range of 0.25–100 ng/mL for temsirolimus and 0.1–100 ng/mL for sirolimus. Non-compartmental analysis using WinNonlin[®] (Pharsight Corporation, Palo Alto, CA, USA) was performed to calculate the following pharmacokinetic parameters: maximum concentration (C_{max}), area under the concentration–time curve from time zero to infinity (AUC_{TOT}), terminal half-life ($T_{1/2}$), total clearance (CL; for temsirolimus), and apparent clearance

Table 1 Demographic and clinical data of the patients included in the study

Characteristic	Total (<i>N</i> = 16)
Age (years)	
Mean ± SD	65 ± 6
Median	64
Minimum–maximum	54–75
Sex (<i>n</i>)	
Women	1
Men	15
Weight (kg)	
Mean ± SD	76 ± 15
Median	75
Minimum–maximum	52–98
Body surface area (m ²)	
Mean ± SD	1.89 ± 0.21
Median	1.91
Minimum–maximum	1.56–2.21
Serious toxic events*	
No toxicity, or grade 1 and 2	9
Grade 3 and 4	7
NR112-1523155 (<i>n</i>)	
CC	6
CT	6
TT	4
NR112-rs2472677 (<i>n</i>)	
TT	8
TC	4
CC	4
NR112-rs6785049 (<i>n</i>)	
AA	6
AG	7
GG	3
CYP3A5-rs776746 (CYP3A5*3) (<i>n</i>)	
GG	10
AG	6
ABCB1-rs1045642 (<i>n</i>)	
TT	6
TC	6
CC	4
ABCB1-rs1128503 (<i>n</i>)	
CC	8
TC	6
TT	2
ABCB1-rs2032582 (<i>n</i>)	
GG	6
GT	7
TT	3

* According to the common terminology criteria for adverse Events, version 3, and the system organ class classification, the most observed toxicities were: bone marrow disorders, gastro-intestinal disorders, constitutional symptoms

(CL/fm; for sirolimus) because the temsirolimus fraction metabolized into sirolimus (fm) was unknown. The metabolic ratio between sirolimus AUC and temsirolimus AUC (AUC_{ratio}) was calculated as an estimate of the relative extent of the conversion of the parent drug into its metabolite. The exposure to active entities was estimated by adding temsirolimus AUC and sirolimus AUC (AUC_{sum} , unadjusted for molecular weight differences).

SNP selection and genotyping

To ensure that variant alleles were represented in our cohort, candidate SNPs (*n* = 7) were chosen if literature data reported a significant functional or clinical effect and minor allele frequencies were higher than 0.1 in Caucasian populations. For NR112-rs3814055, NR112-rs2472677, NR112-rs6785049, CYP3A5-rs2472677 (CYP3A5*3), ABCB1-rs1045642, ABCB1-rs1128503 and ABCB1-rs20322582 genotyping, genomic DNA was extracted from whole blood samples using the MagNAPure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Targeted nucleotide sequences were PCR amplified using the GoTaq Master Mix (Promega). After purification of the PCR products with the ExoSAP-IT[®] PCR Product Cleanup kit (Thermo Fisher Scientific), amplicons were bi-directionally sequenced with the ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using the AgenCourt CleanSEQ kit (Beckman Coulter).

Statistical analysis

The following associations were assessed: (i) pharmacokinetic data (AUC_{TOT} , AUC_{ratio} , AUC_{sum} , C_{max} , CL, and $T_{1/2}$) with demographic data, candidate SNPs and toxicity data, and (ii) toxicity data with candidate SNPs. Because of the small size of our cohort (less than 30 patients), the non-parametric Kruskal–Wallis test was used to test associations between quantitative continuous data (pharmacokinetic parameters) and discrete variables (genotypes and toxicity). The Fisher's exact test was used to identify associations between qualitative data (genotypes versus toxicity). One patient was excluded from the pharmacokinetic analysis because of missing blood samples at four time points, but was included in the genetic/toxicity association analysis. Considering the small size of our cohort, the low number of candidate SNPs and the linkage disequilibrium between NR112 and ABCB1 polymorphisms, no correction for multiple testing was performed; *p* = 0.05 was considered as the significant threshold.

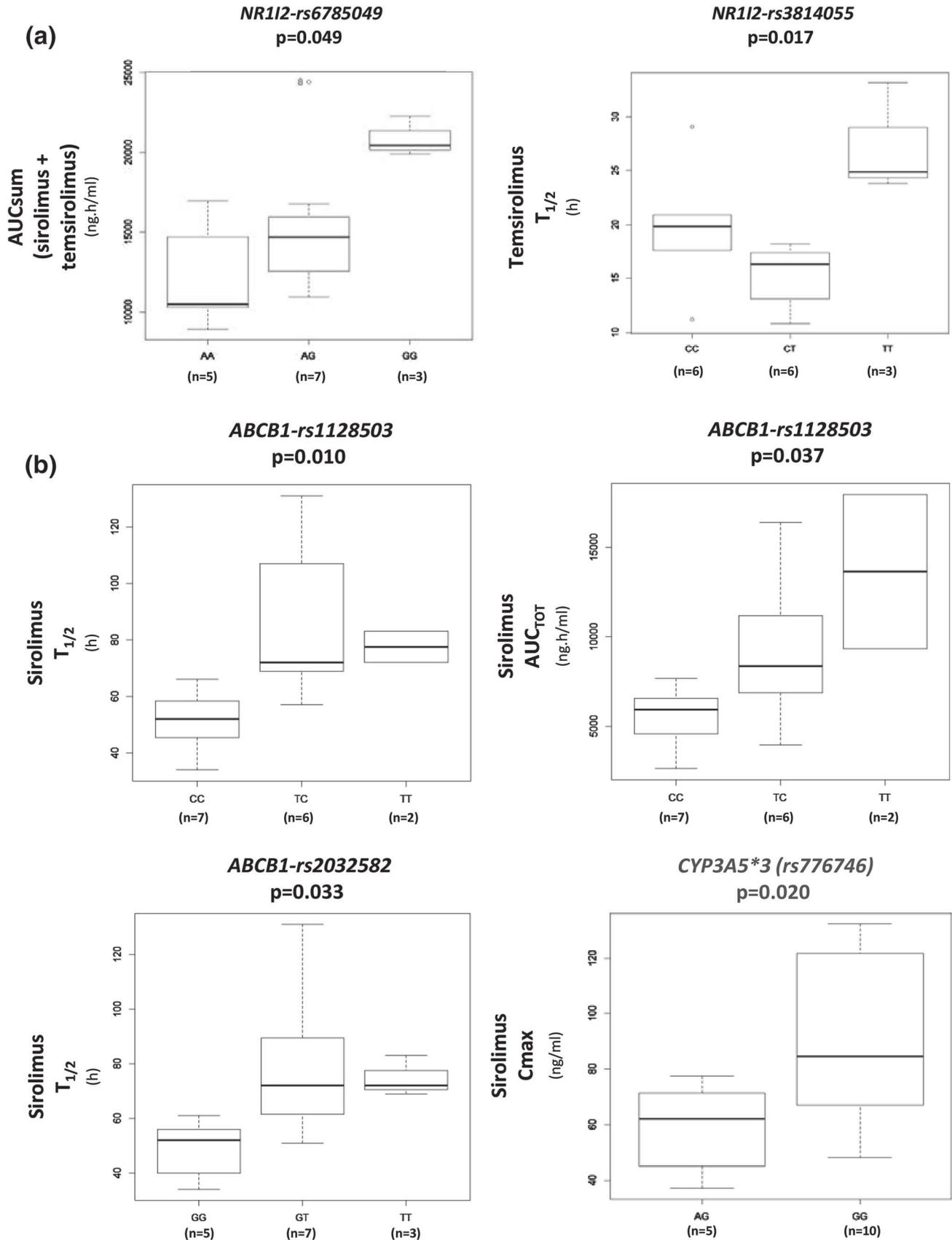


Fig. 1 **a** Effect of the *NR1I2*-rs3814055 and *NR1I2*-rs6785049 SNPs on temsirolimus pharmacokinetic parameters (AUC_{sum} and $T_{1/2}$) (**bold lines** medians). **b** Effect of the *ABCB1*-rs1128503, *ABCB1*-rs203582 and *CYP3A5*-rs776746 (*CYP3A5**3) SNPs on sirolimus pharmacokinetic parameters ($T_{1/2}$, AUC_{TOT} , C_{max})

Results

Pharmacokinetic analysis

The AUC_{TOT} values of temsirolimus and its metabolite showed substantial inter-patient variability, and the AUC_{ratio} ranged from 0.34 to 2.80, highlighting the highly variable conversion of temsirolimus to sirolimus. The median temsirolimus CL was 3.4L/h and the median sirolimus CL/fm was 3.1L/h. Sirolimus $T_{1/2}$ was longer than that of temsirolimus (median $T_{1/2}$: 66.3 vs 18.2 h, respectively). No significant association was observed between the pharmacokinetic parameters of temsirolimus or sirolimus and age, sex, weight and body surface area, suggesting that the observed pharmacokinetic variability is independent of these covariates.

Effect of the pharmacokinetic parameters and SNPs on toxicity

Seven of the 16 patients included in this study experienced at least one severe toxic event, according to the system organ class classification (grade 3/4 bone marrow toxicities: four patients; grade 3 and 5 constitutional symptoms: two patients; grade 3 gastro-intestinal toxicity: two patients). Compared with patients without serious toxicities ($n = 9$), these patients had a 1.6-fold higher AUC_{ratio} ($p = 0.034$) (supplementary Fig. 1) and showed a trend towards lower exposure to temsirolimus (20% lower AUC_{TOT} values, $p = 0.077$) and higher temsirolimus elimination (CL increase by 20%, $p = 0.077$). The frequency of severe adverse events was significantly lower among patients with the *NR1I2*-rs3814055 T allele ($p = 0.0057$) or the *NR1I2*-rs6785049 G allele ($p = 0.04$). To evaluate the association between genotypes and severe toxicities, patients with heterozygous and homozygous genotype were pooled. The odds ratio (OR) of severe toxicities was 0.032 [$4.2E-4$; $5.7 E-1$], $p = 0.0087$) for patients with the *NR1I2*-rs3814055 CT and TT genotypes compared with those harboring the *NR1I2*-rs3814055 CC genotype (supplementary Table 1). Similarly, the OR was 0.065 [$9.5E-4$; $9.9 E-1$], $p = 0.034$) for the *NR1I2*-rs6785049 AG and GG genotypes compared with the *NR1I2*-rs6785049 AA genotype. These findings suggest that *NR1I2* SNPs could be predictive of temsirolimus toxicity. Conversely, no association was observed between *CYP3A5* and *ABCB1* SNPs and toxicity (supplementary Table 1).

Effects of SNPs on temsirolimus and sirolimus pharmacokinetics

A pharmacogenetic analysis was conducted to evaluate the relationships between temsirolimus pharmacokinetic parameters and SNPs in genes involved in its disposition (Fig. 1 for significant associations; supplementary Table 2 lists all results). The *NR1I2*-rs6785049 GG genotype was associated with increased exposure to active entities (AUC_{sum}) compared with the AA and AG genotypes (Fig. 1a, left panel). Moreover, the *NR1I2*-rs3814055 TT genotype was associated with longer temsirolimus $T_{1/2}$ (Fig. 1a, right panel), although this effect was not additive ($T_{1/2}$ shorter for the CT genotype than for the CC genotype). The *ABCB1*-rs1128503 TT genotype was associated with longer sirolimus $T_{1/2}$ (about 1.5-fold, $p = 0.010$) and consequently with increased sirolimus exposure, expressed as AUC_{TOT} ($p = 0.037$) (Fig. 1b, upper panels). Similarly, the *ABCB1*-rs2032582 T allele was associated with longer sirolimus $T_{1/2}$ ($p = 0.033$) in patients with heterozygous (GT) or homozygous (TT) genotype (Fig. 1b, lower, left panel). Finally, the *CYP3A5* rs776746 G allele, which corresponds to the *CYP3A5**3 genotype, was associated with higher sirolimus C_{max} (about 1.5-fold, $p = 0.020$) in patients with homozygous (GG) compared with patients with heterozygous (AG) genotype (Fig. 1b, lower, right panel).

Discussion

In this exploratory study, association tests were performed between PK/PD data of temsirolimus and candidate SNPs in genes involved in the metabolism and disposition of this drug. Considering the limited number of candidate SNPs and the linkage disequilibrium among them, no correction for multiple testing was performed. Therefore, these study results on temsirolimus pharmacogenetics must be considered preliminary and need to be confirmed in a larger sample.

This study confirms the high variability of temsirolimus pharmacokinetics. It then shows that this variability is not influenced by the patients' demographic characteristics, but by *CYP3A5* and *ABCB1* SNPs. Moreover, the frequency of severe toxicities is significantly higher in patients homozygous for the *NR1I2*-rs6785049 A or *NR1I2*-rs3814055 C allele and in patients with high AUC_{ratio} . Previous studies evaluated the relationship between exposure and pharmacodynamics (efficacy or toxicity) of temsirolimus in patients with advanced renal cancer [18]. However, therapeutic ranges and target AUC values were not precisely defined. Furthermore, the specific contribution of each active entity (temsirolimus or sirolimus) to toxicity was not clearly

established. In a cohort of patients with advanced renal cancer, Boni et al. and demonstrated that, differently from temsirolimus AUC, AUC_{sum} (temsirolimus plus sirolimus) is associated with the severity and duration of adverse effects, especially thrombocytopenia, pruritus, dry mouth and hyperlipemia [18]. In the present study, patients with severe toxicities were pooled in two categories on the basis of the event severity and regardless of the affected organ (grade 3 and 4 vs grade 1 and 2 or no adverse event). The group of patients who experienced severe toxicities exhibited higher conversion of temsirolimus into sirolimus (AUC_{ratio}) than the group with grade 1–2 or no adverse event. Our findings suggest that sirolimus could be the main active entity responsible for toxicity. Thus, particular attention should be paid to sirolimus exposure in patients treated with temsirolimus, and especially to factors involved in its inter-individual variability, including the patient's genetic background.

Genetic polymorphisms of *CYP3A5* are used to personalize tacrolimus dosing. Our results highlight the strong effect of *ABCB1-rs1128503*, *ABCB1-rs2032582* and *CYP3A5*3* SNPs on sirolimus pharmacokinetic variability after temsirolimus administration. These SNPs were significantly associated with higher exposure and slower elimination of sirolimus. As *ABCB1* SNPs show linkage disequilibrium, a haplotype analysis would be useful to assess their global impact; unfortunately, such analysis requires a high number of patients to properly infer individual haplotypes and perform pharmacokinetic/haplotype association tests. Previous studies on the clinical impact of *NR1I2* SNPs on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors showed that the *NR1I2-rs3814055* T allele is associated with decreased apparent clearance [16] of tacrolimus and that *NR1I2-rs6785049* is involved in cyclosporine inter-individual pharmacokinetic variability in children [19]. In the present cohort, temsirolimus elimination rate and the risk for severe toxicity were lower in patients with the *NR1I2-rs3814055* T allele. The *NR1I2-rs6785049* A allele was associated with a lower systemic exposure to active entities (temsirolimus plus sirolimus), but higher risk of severe toxicities. Inter-individual variability of toxic events may be related to changes in hepatic metabolism and systemic exposure, but also to modifications of temsirolimus and sirolimus metabolism and transport in healthy tissues.

To our knowledge, the present work is the first pharmacogenetic study on temsirolimus. Despite the small size of our cohort, our preliminary results suggest that *ABCB1*, *CYP3A5* and *NR1I2* SNPs could be potential pharmacogenetic markers for temsirolimus personalized treatment (dosage and toxicity prediction) in patients with cancer. Like for immunosuppressant drugs, the definition of the therapeutic index of anticancer drugs is crucial. Pharmacokinetic endpoints need to be defined and factors

underlying pharmacokinetic variability must be taken into account to determine temsirolimus dosing to maximize its clinical efficacy and minimize the number and/or severity of adverse events. Further studies in larger cohorts of patients are required to confirm our preliminary findings, and also to broaden temsirolimus pharmacokinetic/pharmacogenetic analysis by including additional relevant SNPs (*CYP3A4*22* and *CYP3A4*1B*) with lower variant allele frequencies [7] and other candidate genes, such as *NR1I3* and *POR* that also regulate *CYP3A* activity [13, 20].

Acknowledgements We thank Bénédicte Marion, Céline Roques and Emilie Maturin (Laboratoire de Biophysique, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier) for their excellent technical support. We also thank Dr. Elisabetta Andermarcher for proofreading the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. A signed informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Hutson TE, Escudier B, Esteban E, Bjarnason GA, Lim HY, Pittman KB, Senico P, Niethammer A, Lu DR, Hariharan S, Motzer RJ (2014) Randomized phase III trial of temsirolimus versus sorafenib as second-line therapy after sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 32(8):760–767. doi:10.1200/JCO.2013.50.3961
- Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ (2003) Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol Ther* 2(3):222–232
- Barbarino JM, Staats CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB (2013) PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics* 23(10):563–585. doi:10.1097/FPC.0b013e328364db84
- Cai P, Tsao R, Ruppen ME (2007) In vitro metabolic study of temsirolimus: preparation, isolation, and identification of the metabolites. *Drug Metab Dispos* 35(9):1554–1563. doi:10.1124/dmd.107.014746
- Lampen A, Zhang Y, Hackbarth I, Benet LZ, Sewing KF, Christians U (1998) Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 285(3):1104–1112
- FDA temsirolimus access data. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022088s000_PharmR.pdf. Accessed March 2017
- Klein K, Zanger UM (2013) Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: recent progress toward the “missing heritability” problem. *Front Genet* 4:12. doi:10.3389/fgene.2013.00012
- Żochowska D, Wyzgał J, Pączek L (2012) Impact of *CYP3A4*1B* and *CYP3A5*3* polymorphisms on the

- pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients. *Ann Transpl* 17(3):36–44
9. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W, Wang D, Vinks AA, He Y, Swen JJ, Leeder JS, van Schaik R, Thummel KE, Klein TE, Caudle KE, MacPhee IA (2015) Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guidelines for CYP3A5 genotype and tacrolimus dosing. *Clin Pharmacol Ther* 98(1):19–24. doi:[10.1002/cpt.113](https://doi.org/10.1002/cpt.113)
 10. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75(1):13–33. doi:[10.1016/j.cplt.2003.09.012](https://doi.org/10.1016/j.cplt.2003.09.012)
 11. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT (2015) Impact of genetic polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) on drug disposition and potential clinical implications: update of the literature. *Clin Pharmacokinet* 54(7):709–735. doi:[10.1007/s40262-015-0267-1](https://doi.org/10.1007/s40262-015-0267-1)
 12. Chen Y, Tang Y, Guo C, Wang J, Boral D, Nie D (2012) Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem Pharmacol* 83(8):1112–1126. doi:[10.1016/j.bcp.2012.01.030](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.030)
 13. Tolson AH, Wang H (2010) Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv Drug Deliv Rev* 62(13):1238–1249. doi:[10.1016/j.addr.2010.08.006](https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.006)
 14. Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Bäckman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(21):12208–12213
 15. Lamba J, Lamba V, Schuetz E (2005) Genetic variants of PXR (NR1I2) and CAR (NR1I3) and their implications in drug metabolism and pharmacogenetics. *Curr Drug Metab* 6(4):369–383
 16. Benkali K, Prémaud A, Picard N, Rérolle JP, Toupance O, Hoizey G, Turcant A, Villemain F, Le Meur Y, Marquet P, Rousseau A (2009) Tacrolimus population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis and Bayesian estimation in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 48(12):805–816. doi:[10.2165/11318080-000000000-00000](https://doi.org/10.2165/11318080-000000000-00000)
 17. Navarrete A, Martínez-Alcázar MP, Durán I, Calvo E, Valenzuela B, Barbas C, García A (2013) Simultaneous online SPE-HPLC-MS/MS analysis of docetaxel, temsirolimus and sirolimus in whole blood and human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 921–922:35–42. doi:[10.1016/j.jchromb.2013.01.017](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.017)
 18. Boni JP, Leister C, Bender G, Fitzpatrick V, Twine N, Stover J, Dorner A, Immermann F, Burczynski ME (2005) Population pharmacokinetics of CCI-779: correlations to safety and pharmacogenomic responses in patients with advanced renal cancer. *Clin Pharmacol Ther* 77(1):76–89. doi:[10.1016/j.cplt.2004.08.025](https://doi.org/10.1016/j.cplt.2004.08.025)
 19. Ferrareso M, Turolo S, Belinghieri M, Tirelli AS, Grillo P, Gropali E, Edefonti A, Ghio L (2012) The potential of steroids and xenobiotic receptor polymorphisms in forecasting cyclosporine pharmacokinetic variability in young kidney transplant recipients. *Pediatr Transpl* 16(6):658–663. doi:[10.1111/j.1399-3046.2012.01751.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2012.01751.x)
 20. Woillard JB, Kamar N, Coste S, Rostaing L, Marquet P, Picard N (2013) Effect of CYP3A4*22, POR*28, and PPARA rs4253728 on sirolimus in vitro metabolism and trough concentrations in kidney transplant recipients. *Clin Chem* 59(12):1761–1769. doi:[10.1373/clinchem.2013.204990](https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.204990)

Effect of Single Nucleotide Polymorphisms in the Xenobiotic-sensing Receptors *NR1I2* and *NR1I3* on the Pharmacokinetics and Toxicity of Irinotecan in Colorectal Cancer Patients

Litaty Céphanoée Mbatchi^{1,2,3} · Jacques Robert⁴ · Marc Ychou^{2,5} ·
Jean-Christophe Boyer¹ · Maguy Del Rio² · Matthieu Gassiot^{1,2} · Fabienne Thomas⁶ ·
Nicole Tubiana⁷ · Alexandre Evrard^{1,2,3}

© Springer International Publishing Switzerland 2016

Abstract

Background and Objectives Nuclear receptors PXR (pregnane X receptor, *NR1I2*) and CAR (constitutive androstane receptor, *NR1I3*) are key regulators of irinotecan metabolism, and ligand-dependent modulation of their activity leads to significant drug–drug interactions. Because genetic polymorphisms can also affect the activity of these xenobiotic-sensing receptors, we hypothesized that they could contribute to the interpatient variability of

irinotecan pharmacokinetics and to the toxicity of irinotecan-based regimens.

Patients and Methods In a cohort of 109 metastatic colorectal cancer patients treated with irinotecan (180 mg/m²) in combination with other drugs, associations were assessed between 21 selected single nucleotide polymorphisms of *NR1I2* or *NR1I3* and pharmacokinetic parameters or toxicity of irinotecan and its metabolites.

Results After adjustment of the tests by the *UGT1A1**28 genotype and correction for multiple testing, the A allele of *NR1I2*-rs10934498 was associated with a decreased exposition and an increased degradation of SN-38, the active metabolite ($p = 0.009$ and $p = 0.017$, respectively). The risk of hematological toxicity was associated with *NR1I2*-rs10934498 and *NR1I2*-rs2472677 ($p = 0.009$ and $p = 0.003$, respectively).

Conclusion Our results reveal for the first time the involvement of *NR1I2* in the pharmacogenetics of irinotecan and suggest that it may help to predict the toxicity of low-dose irinotecan.

✉ Alexandre Evrard
alexandre.evrard@umontpellier.fr; alexandre.evrard@univ-montpl.fr

¹ Laboratoire de biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes, Hôpital Carémeau, Place du Professeur Robert Debré, 30029 Nîmes Cedex 9, France

² IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, Montpellier, France

³ Laboratoire de Pharmacocinétique, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, Montpellier, France

⁴ INSERM U916, Institut Bergonié, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

⁵ Institut Régional du Cancer de Montpellier (ICM)-Val d'Aurelle, Montpellier, France

⁶ EA4553 Institut Claudius-Regaud, and Université Paul-Sabatier, Toulouse, France

⁷ Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges Cedex, France

Key Points

The pharmacogenetics of irinotecan has been widely studied to identify genetic markers that could explain its pharmacokinetic variability and its toxicity. To date, all the genes involved in irinotecan metabolism have been screened excepted *NR1I2* and *NR1I3* that encode pregnane X receptor and constitutive androstane receptor, the main transcriptional regulators of *CYP3A4*, *UGT1A1*, *ABCB1*, and *ABCG2*.

This article investigates the impact of genetic variations of *NR1I2* and *NR1I3* on the metabolism, the pharmacokinetics, and the toxicity of irinotecan and SN38, its active metabolite, in a cohort of metastatic colorectal cancer patients.

The results showed that two single nucleotide polymorphisms, *NR1I2*-rs10934498 and *NR1I2*-rs2472677, are associated with SN38 pharmacokinetic parameters and with hematological toxicity, respectively. These polymorphisms may help to personalize irinotecan-based therapies.

1 Introduction

Irinotecan is a DNA topoisomerase I inhibitor, part of standard first-line options for patients with metastatic colorectal cancer in combination with fluorouracil/leucovorin (FOLFIRI) [1] or oxaliplatin (FOLFIRINOX) [2]. The prediction of neutropenia and diarrhea, the main toxicities of irinotecan, is a key issue that has been broadly studied and even the maximum tolerated dose of this drug is still questioned [3, 4]. Indeed, several publications have demonstrated that a dose of irinotecan above the standard dose of 180 mg/m² in FOLFIRI and FOLFIRINOX protocols can be well tolerated by patients. Furthermore, for patients receiving the same dose of irinotecan, the toxic risk is variable. This variability toxicity has also been linked to the complex metabolism of irinotecan [5–7] whose enzymatic steps can be impacted by pharmacogenetics. Carboxylesterases 1 and 2 (CES1/2) generate SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin), the active metabolite that is 100–1000 times more cytotoxic than the parent drug [8]. Members of the uridine diphosphate glucuronosyltransferases 1A family, especially the 1A1 isoform (UGT1A1) but also UGT1A6, 1A7, 1A9, and 1A10 detoxify SN-38 into SN-38G, an inactive glucuronide. *UGT1A1**28, a polymorphism in the TATA box of the UGT1A1 promoter region and consisting of a variable

number of TA repeats (six or seven) inversely associated with the gene transcription level [9], is responsible for a decreased detoxification of SN38 and an increased risk of toxicity. An oxidative metabolism, mediated by cytochrome P450 (CYP) 3A enzymes (*CYP3A4* and *CYP3A5*) leads to two inactive compounds: 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (APC), the major plasma metabolite and 7-ethyl-10-[4-amino-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (NPC). Transporters such as *SLCO1B1*, *SLCO19A1*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, and *ABCG2* are involved in irinotecan and SN38 cellular uptake or efflux in hepatocytes and target tissues.

Most of the genes encoding enzymes and transporters involved in the metabolism of irinotecan are transcriptionally regulated by *NR1I2* (PXR, pregnane X receptor) and *NR1I3* (CAR, constitutive androstane receptor) [10–13]. *NR1I2* and *NR1I3* (nuclear receptor subfamily 1, group I, members 2 and 3) are members of the nuclear receptor superfamily and act by up-regulating the expression level of drug-metabolizing enzymes and transporters to facilitate the elimination of xenobiotics from the body [14–16]. *NR1I2* and *NR1I3* translocate into the nucleus where they heterodimerize with the retinoid X receptor- α (RXR α or *NR2B1*) upon ligand binding or in the case of *NR1I3*, through an additional phosphorylation-dependent mechanism [16, 17]. In the nucleus, the heterodimers PXR/RXR and CAR/RXR bind to nuclear receptor response elements upstream of target genes. The ligands of *NR1I2* and *NR1I3* include endobiotics such as biliary salts, but mostly xenobiotics including drugs (rifampicin, paclitaxel, phenobarbital) and compounds from herbal medicine [17]. *NR1I2* is the main transcriptional regulator of *CYP3A4* inasmuch that the *CYP3A4* expression level or activity is often considered as a surrogate marker of *NR1I2* activation [16, 18–20]. Emerging evidence demonstrates that *NR1I2* and *NR1I3* are also involved in the regulation of expression and activity of *CES1* and *CES2* in mammalian liver and intestine [21]. Both *NR1I2* and *NR1I3* have been shown to induce the expression of *UGT1A1*. *ABCB1*, *ABCC2*, and *ABCG2* are also target genes of *NR1I2* and their expression levels are associated with peripheral blood mononuclear cells and the intestine [13, 22]. Thus, *NR1I2* and *NR1I3* play a critical part in the metabolism and the transport of many drugs, including irinotecan [23].

We previously demonstrated that the over-expression of *NR1I2* in colorectal cancer cells lines induced an increase of *UGT1A1* mRNA and an increased conversion of SN38 into SN38G, leading to a chemoresistance to SN38 [24]. Moreover, the modulation of *NR1I2* and *NR1I3* activity can lead to drug–drug interactions that critically affect irinotecan pharmacokinetics. For instance, the co-administration of St-John's Wort, containing hyperforin [25], a

powerful NR1I2 activator, or a co-treatment by anticonvulsive drugs known to activate NR1I2 and NR1I3 (such as phenobarbital and carbamazepine), results in a decrease of SN-38 systemic exposure [25, 26]. On the one hand, NR1I2 and NR1I3 activity can be modulated by environmental xenobiotics; but on the other hand, an intrinsic genetic variability of their activity has also been reported. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *NR1I2* are associated with changes in transcription levels of *NR1I2* and its target genes (such as *ABCB1* and *CYP3A4*) but also with the modification of NR1I2 inducibility by rifampicin [19, 27–29]. This genetic variability of *NR1I2* and *NR1I3* can impact the pharmacokinetics, the response, and the toxicity of many drugs, especially those displaying narrow therapeutic indexes. For instance, SNPs of *NR1I2* are associated with doxorubicin [30] and atazanavir clearance [31, 32], response to immunosuppressive therapies [33] and pazopanib [34], or hematotoxicity after paclitaxel plus carboplatin bi-therapy [35]; similarly, polymorphisms of *NR1I3* can impact efavirenz [36] pharmacokinetics and sunitinib efficacy [37] and toxicity [38].

Considering the critical role of NR1I2 and NR1I3 activity in irinotecan pharmacokinetics, and the functional impact of some of their SNPs, we hypothesize that the genetic variability of these nuclear receptors can explain a part of the observed variability of irinotecan pharmacokinetics and toxicity. A cohort of 109 metastatic colorectal cancer patients who received irinotecan-based chemotherapy at the standard dose of 180 mg/m² was genotyped for 21 SNPs of *NR1I2* and *NR1I3* and also for *UGT1A1**28. Irinotecan and metabolite exposure [area under the plasma-concentration curve (AUC)] were measured, metabolic ratios reflecting oxidation and glucuronidation activities were calculated, and grade 3–4 toxicity were reported, to test pharmacogenetic correlations.

2 Patients and Methods

2.1 Patients

Two hundred metastatic colorectal cancer patients with informed written consent were included in a multicentric study (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00559676) approved by the Ethical Committee of Dupuytren University Hospital (Limoges, France). The main eligibility criteria were a World Health Organization performance status between 0 and 2 and histologically confirmed metastatic colorectal cancer scheduled for first-line chemotherapy for metastatic disease. In France, the standard first-line treatment is a combination of: 5-fluorouracil (400 mg/m² as a bolus plus 1200 mg/m² as a perfusion); leucovorin (400 mg/m², perfusion); oxaliplatin (85 mg/m², perfusion)

and/or irinotecan (180 mg/m², perfusion); plus bevacizumab or cetuximab if possible. Toxicity, including hematological and gastrointestinal, was evaluated according to common terminology criteria for adverse events (CTCAE) criteria. Among the initial cohort, 57 patients received a FOLFOX therapy, based on 5-fluorouracil plus oxaliplatin, without irinotecan; 143 other patients were treated by an irinotecan-based protocol. The present study focused on 109 patients for which irinotecan plasma concentrations were assessable. Considering the size of our cohort, toxicity was split into two categories: grade 3 and 4 vs. no toxicity or low toxicity (grade 0–2).

2.2 Pharmacokinetic Analysis

Plasma samples were collected on day 1 of the first cycle before the beginning of irinotecan infusion (t_0) and at time 1.5, 4.5, 7.5, 28.5, and 46 h after the beginning of the infusion [39]. Plasma concentrations of irinotecan and metabolites were measured according to a previously described, high-performance liquid chromatography-fluorescence method [40]. The AUC between 0 and 46 h (AUC_{0–46 h}) of irinotecan, SN-38, SN-38G, APC, and NPC were calculated by non-compartmental analysis using the WinNonLin software (WinNonlin, Pharsight, Cary, NC, USA). Metabolic ratios were calculated by dividing the AUC of the metabolite by the AUC of the parent compound. We also evaluated the biliary index [BI = AUC_{SN-38G} / (AUC_{SN-38} × AUC_{IRI})], which is regarded as a parameter associated with intestinal toxicity risk [41]. The values of these pharmacokinetic parameters were log-transformed before performing association tests.

2.3 SNP Selection and Genotyping

Genomic DNA was extracted using manual (QIAamp DNA blood; Qiagen, Courtaboeuf, France) or automated (MAGNAPure compact; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) methods. Extracted DNA was qualified and quantified by spectrophotometry using the NanoDropTM system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). We chose 21 candidate SNPs of *NR1I2* and *NR1I3* according to their minor allele frequencies (>0.1) and to literature (Table 2) [19, 28, 29, 42–51]. To ensure a good coverage of the genetic variability of *NR1I2* and *NR1I3*, we used HaploviewTM to choose additional tag-SNPs that have an estimated correlation coefficient of $r^2 \geq 0.8$ with non-genotyped SNPs [52]. Genotyping was carried out with an Illumina panel (Plateforme Génome-Transcriptome; Bordeaux University, Bordeaux, France) or by high-resolution melting analysis [52]. *UGT1A1**28 was genotyped by fragment analysis (3130 genetic analyzer; Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

2.4 Single Locus Association Tests

For pharmacokinetic parameters, the association tests were adjusted by age, sex, irinotecan dose, and *UGT1A1**28 genotype in the case of SN-38 or SN-38G; for toxicity, chemotherapy regimens and co-administration of target therapy were added to the covariates of adjustment. Single locus association tests were performed with SNPAssoc, a package of the software R [53] as described previously [35, 53]. For each SNP, deviation of genotype frequencies distribution from those expected under the Hardy–Weinberg Equilibrium was measured using the Fisher’s exact test (significance threshold: $p = 1 \times 10^{-3}$). The association between genotype and pharmacokinetic parameters of irinotecan and metabolites or toxicity was measured using a general linear model and analyzed under genotypic, dominant, recessive, and additive models (significance threshold: $p < 0.05$); the model displaying the lowest Akaike information criterion was regarded as the most reliable one. To take into account the multiple testing and control for false-positive results, the false discovery rate was calculated by the method of Benjamini and Hochberg [54–56].

2.5 Linkage Disequilibrium and Haplotype Analysis

We used HaploviewTM to generate linkage disequilibrium maps and identify block or region in which haplotypes could be defined between SNPs. Our final goal was to assess the combined effect of SNPs on our variables. Associations between haplotypes and pharmacokinetic parameters or toxicity were carried out using haplo.stats, an R package [57]; we performed score tests with a defined number of SNPs along the regions of linkage disequilibrium [significance threshold: $p = 0.05$ or $-\log(p) = 1.3$]; the combination of SNPs that leads to the lowest p value is regarded as the most relevant region in the block.

3 Results

3.1 Pharmacokinetic Analysis and Genotyping

The baseline clinical characteristics of patients and the pharmacokinetic parameters are described in Table 1; pharmacokinetic parameters exhibit a high inter-patient variability. The mean percentage of missing genotype was below 10 %. Allelic frequencies were in accordance with those described in the National Center for Biotechnology Information database for Caucasian populations [58] (Table 2). No SNPs deviate from the Hardy–Weinberg Equilibrium except *NR1I2*-rs2461818, which was excluded from the analysis.

3.2 Single Locus Analysis

Significant results after adjustment by covariates and correction for multiple testing are listed in Table 3 and Fig. 1.

*UGT1A1**28 was associated with the AUC of SN-38 ($p = 1.914e-04$), the metabolic ratios of SN-38 and SN-38G ($p = 4.481e-05$ and $p = 3.637e-07$, respectively), and also to the biliary index of Gupta ($p = 6.351e-06$); in each case, the effect of the (TA) dinucleotide was additive. No association of *UGT1A1**28 with toxicity was found.

The A allele of *NR1I2*-rs10934498 was associated with a decreased AUC of SN-38 ($p = 0.009$, recessive), with a decreased biliary index ($p = 0.017$, recessive) and also with a decreased risk of grade 3–4 hematotoxicity (odds ratio [OR] = 0.17 [0.04–0.082], $p = 0.009$, additive).

SNPs located in the promoter of *NR1I2* were associated with the metabolic ratios of APC and NPC. The T allele of rs1523130 ($p = 0.020$), the T allele of rs3814055 ($p = 0.033$), and the C allele of rs1523127 ($p = 0.014$) were associated with a decreased metabolic ratio of APC with dominant effects. The results were quite similar with NPC for which we observed a decrease of the metabolic ratio associated with the T allele of rs1523130 ($p = 0.024$, additive) and with the C allele of rs1523127 ($p = 0.045$, dominant). Concerning the toxicity, the T allele of rs3814055 and C allele of rs1523127 were associated, according to an additive effect, with an increased risk of grade 3–4 hematotoxicity with $p = 0.005$, OR = 9.25 [1.59–53.95] and $p = 0.009$, OR = 7.23 [1.32–39.53] respectively. The T allele of *NR1I2*-rs2276707 was also associated with the NPC metabolic ratio ($p = 0.030$, T dominant) but not with any toxicity.

NR1I2-rs2472677 was not associated with any pharmacokinetic parameters but with an increased risk of grade 3–4 toxicity. The G allele exhibited a recessive effect on the risk for all type of grade 3–4 toxicity (OR = 6.78 [1.18–39.06], $p = 0.029$) and on the risk for grade 3–4 hematotoxicity (OR = 41.55 [2.39–722.62], $p = 0.003$).

Finally, *NR1I3*-rs2307418, *NR1I3*-rs3003596, and *NR1I3*-rs2501873 were associated with AUC of SN-38 and with the metabolic ratio of SN-38 and SN-38G, but these correlations were lost after adjustment of the tests by the *UGT1A1**28 genotype. No significant association was found between *UGT1A1**28, SNPs of *NR1I2* and *NR1I3*, and the AUC of irinotecan itself; no association was found between these polymorphisms and digestive toxicity.

3.3 Haplotype Analysis

The map of *NR1I2* exhibited two regions in which SNPs are in high-linkage disequilibrium (Fig. 2). The first region is a block that covers the promoter and a part of the first

Table 1 Demographics, clinical characteristics, and pharmacokinetic data of the studied population

Characteristic	No. of patients	Mean	Range	Minimum	Maximum
Total number of patients	109				
Sex					
Male	68				
Female	41				
Age, years		63	32–86	32	86
BSA, m ²		1.78	1.32–2.23	1.32	2.23
Dose, mg		315	218–390	218	390
Regimens					
FOLFIRI	85				
FOLFIRINOX	18				
Other	6				
Targeted therapy					
Bevacizumab	60				
Cetuximab	2				
NO	47				
Toxicity					
Diarrhea (grade 3–4)	4				
Leukopenia (grade 3–4)	9				
All toxicity (grade 3–4) ^a	18				
Pharmacokinetic parameters					
Irinotecan AUC _{0–45h} (ng.h.mL ⁻¹)		19,489	2995–69,315	2995	69,315
SN38 AUC _{0–45h} (ng.h.mL ⁻¹)		289	63–999	63	999
SN38G AUC _{0–45h} (ng.h.mL ⁻¹)		2074	358–11,909	358	11,909
APC AUC _{0–45h} (ng.h.mL ⁻¹)		4607	450–20,249	450	20,249
NPC AUC _{0–45h} (ng.h.mL ⁻¹)		579	72–4579	72	4579
SN38 AUC _{0–45h} to irinotecan AUC _{0–45h} ratio		0.024	0.006–0.071	0.006	0.071
SN38G AUC _{0–45h} to SN38 AUC _{0–45h} ratio (glucuronidation ratio)		0.177	0.034–0.568	0.034	0.568
Biliary index of Gupta ^b		7.945	1.403–41.631	1.403	41.631
APC AUC _{0–45h} to irinotecan AUC _{0–45h} ratio (oxidation ratio)		0.236	0.019–0.980	0.019	0.980
NPC AUC _{0–45h} to irinotecan AUC _{0–45h} ratio (oxidation ratio)		0.033	0.007–0.135	0.007	0.135

BSA body surface area, FOLFIRI folinic acid/5-fluorouracil/irinotecan, FOLFIRINOX folinic acid/5-fluorouracil/irinotecan/oxaliplatin, AUC area under the plasma-concentration curve

^a Including asthenia, increase of γ -glutamyl transferase level, bradycardia and atrial fibrillation, and urinary tract infection

^b Irinotecan AUC/(SN38 AUC*SN38G AUC), regarded as a predictor of intestinal toxicity [40]

intron and includes five SNPs, rs1523130, rs3814055, rs1523127, rs2472671, and rs10934498; the second region starts in intron 3 and includes SNPs of the 3' untranslated region. We focused on the first region, which includes SNPs displaying significant results in the single locus association tests. Haplotype association tests were conducted by performing score tests with smaller and smaller groups of SNPs (from five to two) starting at different positions in the block. The most significant region of the block was the diplotype consisting of rs2472671 and rs10934498, which was associated with the hematological toxicity of irinotecan-based regimens ($p = 0.011$) (Fig. 3). No significant effect of any SNP combinations was found on pharmacokinetic parameters.

4 Discussion

The pharmacogenetics of irinotecan has been broadly studied over the previous 15 years, and many genetic variations that affect the pharmacokinetics and the toxicity of this drug have been identified [59, 60]. Concerning phase I enzymes, a Japanese study has reported that the *CES1* genotype is associated with irinotecan pharmacokinetics [61]. A decreased glucuronidation activity resulting in a reduced SN-38 clearance and a higher risk of diarrhea and neutropenia has been associated with *UGT1A7*3*, *UGT1A9*1* [62], *UGT1A1*-rs11563250 [63], *UGT1A1*93* [64], and above all *UGT1A1*28* [65]. Then, for a high dose of irinotecan, a pre-therapeutic genotyping of *UGT1A1*28*

Table 2 Candidate single nucleotide polymorphisms and genotyping results

SNP	Localization	Alleles	MAF	HWE	Rational
<i>NR1I2</i>					
rs1523130	5'UTR	C/T	0.471	0.6930	Within STAT1, STAT3, STA6, and NFAT binding sites (TF) ↓ <i>CYP3A4</i> mRNA, ↓ <i>NR1I2</i> mRNA, ↓ <i>NR1I2</i> promoter activity [19, 28]
rs3814055	5'UTR	C/T	0.451	0.6932	T: within NF-KB, STAT1 binding sites (TF) ↓ <i>NR1I2</i> mRNA, ↑inducibility by rifampicin [19, 28] ↓Tacrolimus apparent clearance [41]; predictive marker of pazopanib efficacy [34]; Tag: rs3842689 ($r^2 = 1$): cyclosporine metabolism in children [45]; risk of IBD [42]
rs1523127	5'UTR	A/C	0.471	0.6930	CYP3A4, ABCB1 expression level [30]; risk of IBD [42] ¹
rs2472671	5'UTR	T/C	0.258	0.5896	Tag for ^a : rs1403527, rs13071341, rs2472670, rs2472671, rs2873951, rs2056530, rs11712211
rs10934498	Intron 1	G/A	0.484	0.6831	Tag for ^a : rs12488820 ($r^2 = 1$)
rs2472677	Intron 1b	A/G	0.337	1.0000	Within a putative binding site for HNF3β (TF) GG: ↓ <i>NR1I2</i> mRNA, ↓basal CYP3A activity, ↑inducibility by rifampicin [19] Atazanavir PK [31, 32, 65, 66];
rs2461823	Intron 1b	C/T	0.301	0.8061	Bilirubinemia, intrahepatic cholestasis of pregnancy; severity of liver injury in nonalcoholic fatty liver disease [43]; risk of IBD (Crohn's disease) [50]
rs2461818	Intron 1b	C/T	0.074	0.0002	Tag
rs7643645	Intron 1b	A/G	0.374	0.3856	G: loss of a putative binding site for HNF4 (TF) [19]; severity of liver injury in nonalcoholic fatty liver disease [43]
rs1464603	Intron 2	A/G	0.338	0.8286	AA: midazolam clearance (in vivo CYP3A activity) [29]
rs3732357	Intron	A/G	0.300	0.3268	Tag for ^a : rs3732357, rs2472681
rs6785049	Intron 5	A/G	0.398	0.6646	↑CYP3A4 inducibility [28]; cyclosporine PK in children [45]; Tag for ^a : rs2472682, rs6785049, rs6784598 ($r^2 = 1$) => IBD [42]; risk of IBD [44, 49]
rs2276707	Intron 6	C/T	0.252	0.4393	Tag for ^a : rs11917714, rs3814057 ($r^2 = 0.988$, CC or CT genotype => ↑ABCB1 in human gut biopsy) [28] TT: genotype of the donor ↑risk for delay graft function after renal transplantation (prevented by cyclosporine or tacrolimus) [33]; risk of IBD [42]
rs3732359	3' UTR	A/G	0.309	0.3517	Tag for: rs3732360 ($r^2 = 0.9$, CYP3A4 in vivo activity assessed by midazolam clearance) [29]
rs2461818, rs2461823: CT					Tag for ^a : rs6771638, rs1357459, rs1403526
rs2276707, rs6785049: CG					Tag for ^a : rs10511395, rs1054191, rs11929668
rs3732360, rs6785049: TG					Tag for ^a : rs1054190 ($r^2 = 1$) => IBD [44]
<i>NR1I3</i>					
rs4073054	Intron	G/T	0.400	0.3995	CAT haplotype (rs2307424-rs2307418-rs4073054): sunitinib-induced neutropenia and PFS [37, 38]
rs2307418	Intron	A/C	0.162	1.0000	CAT haplotype (rs2307424-rs2307418-rs4073054): sunitinib-induced neutropenia and PFS [37, 38]
rs2307424 (pro180pro)	Exon 5	C/T	0.340	0.1240	CAT haplotype (rs2307424-rs2307418-rs4073054): sunitinib-induced neutropenia and PFS [37, 38] CC: early discontinuation of efavirenz-containing regimens [48]
rs2502815	Intron	C/T	0.223	0.5494	CC: ↑bone mineral density [46]
rs3003596	Intron	T/C	0.422	0.3136	C: ↓efavirenz plasma concentrations [36]
rs2501873	Intron	G/A	0.422	0.3136	When combined with HNF4α-rs3212198: determinant of stable warfarin doses [47]
rs6686001	Intron	C/A	0.162	0.2886	Tag ^a

Table 2 continued

SNP	Localization	Alleles	MAF	HWE	Rational
<i>UGT1A1</i> *28					
rs8175347	TATA box	(TA) ₆ /(TA) ₇	0.328	1.0000	Gilbert's syndrome

CYP cytochrome P450, *HNF3β/4* hepatocyte nuclear factor 3-β or 4, *HWE* Hardy–Weinberg equilibrium (*p*-value of ...), *IBD* inflammatory bowel disease, *MAF* minor allele frequency, *NFAT* nuclear factor of activated T cells, *NF-κB* nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells, *PFS* progression-free survival, *SNP* single nucleotide polymorphism, *STAT1/3/6* signal transducer and activator of transcription 1/3/6, *TF* transcription factor(s), ↑ increased, ↓ decreased, *UTR* untranslated region, *PK* pharmacokinetics

^a HapMap data via haploview™

is recommended by many guidelines [65]. However, for a dose inferior or equal to 180 mg/m², *UGT1A1**28 is not a good predictor of irinotecan toxic risk despite its impact on SN-38 pharmacokinetics [59, 66]. This is in accordance with the results of the present study, showing an association between *UGT1A1**28 and an increased SN-38 systemic exposure and a decreased conversion into SN-38G, but no correlation with hematological toxicity. Concerning digestive toxicity, a lack of power owing to a low prevalence in our cohort, could also be an explanation for the lack of association between this toxicity and any tested polymorphisms.

Concerning uptake and efflux (phase 0 and III), variants of *SLCO1B1* and *SLC191A1* have been identified as protective markers against neutropenia and associated with better response and survival [67]; polymorphisms in *ABCB1*, *ABCC2*, and *ABCG2* have been associated with irinotecan clearance and toxicity [5, 59, 68]. Thus, the entire metabolic pathway of irinotecan has been screened for pharmacogenetics markers, except the nuclear receptors *NR1I2* and *NR1I3* despite the critical role they play in the transcriptional regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters [10, 11, 23, 27]. Our work aimed at assessing whether polymorphisms in *NR1I2* and *NR1I3* are involved in irinotecan pharmacogenetics. Metabolic ratios ($AUC_{\text{METABOLITE}}/AUC_{\text{PARENT}}$) and the irinotecan biliary index [$BI = AUC_{\text{SN-38G}}/(AUC_{\text{SN-38}} \times AUC_{\text{IRI}})$] were regarded as surrogate markers for carboxylesterase, oxidation, and glucuronidation activities. The relevance of metabolic ratios as markers of enzymatic activity can be discussed because they do not take into account the elimination rate of the metabolite. Despite this limitation, metabolic ratios were effective enough to confirm the impact of *UGT1A1**28 on glucuronidation activity.

We showed that homozygous patients for *NR1I2*-rs10934498 (a tag-SNP located in the first intron) were less exposed to SN-38, and had a decreased conversion rate of SN38 into SN38G; these patients had also a lower risk of grade 3–4 hematotoxicity.

Polymorphisms of *NR1I2* located in the promoter of the gene (rs1523130, rs3814055, and rs1523127) were associated with decreased metabolic ratios of APC and NPC,

suggesting an impact on *CYP3A4/5* activity. *NR1I2*-rs3814055 and *NR1I2*-rs1523127 were also associated with an increased risk of grade 3–4 hematotoxicity. These SNPs, located in transcription factor-binding sites, can alter *NR1I2* promoter activity leading to a decreased transcription of *NR1I2* and its target genes and also modified inducibility by rifampicin [19, 28]. The cytotoxic activity of irinotecan is 100–1000 times lower than that of SN38 and its oxidation by *CYP3A4-5* is not regarded as critical for the toxicity of irinotecan; thus, it is unlikely that this increase of hematological toxic risk could be explained by a modification of irinotecan oxidation. An explanation could be a reduced expression level of *NR1I2* in the hematopoietic tissue because of these SNPs, resulting in a decreased transactivation of the genes involved in irinotecan and SN38 detoxification and a higher cytotoxicity. The haplotype association tests did not identify any combination of SNPs that has a stronger effect than single locus markers.

Interestingly, *NR1I2*-rs2472677 was associated with an increased risk of grade 3–4 hematotoxicity. This SNP is located in the intron 1b of the gene and in a putative transcription factor binding site for *HNF3β* (hepatocyte nuclear factor 3-β). The GG genotype is associated with a decreased basal level of *NR1I2* mRNA, with a decreased basal activity of *CYP3A4* but with a higher inducibility by rifampicin [19]. This SNP is associated with a decreased clearance of atazanavir [69], and in a recent prospective study, it was used to successfully optimize the plasma exposure of this human immunodeficiency virus protease inhibitor [31, 32, 70]. Surprisingly, we do not found any association between this SNP and pharmacokinetic parameters, suggesting again a putative role of this variant in the ability of hematopoietic tissues to detoxify irinotecan and its metabolites.

Our findings were obtained in patients treated with irinotecan at 180 mg/m². Even if it is regarded as a low dose inducing a low risk of toxicity [4, 66], many patients are still treated according to this standard dose and some of them experience gastrointestinal toxicity and myelotoxicity. Thus, markers that could predict irinotecan toxic risk at this dosage are useful, and *NR1I2*-rs10934498 and *NR1I2*-rs2472677 may be part of them. Validation studies in larger cohorts are

Table 3 Results of single locus analysis

Genes	SNP	log ₁₀ (SN38 AUC) ^a	AUC ratios (log ₁₀ transformed)					Toxicity		
			SN38/IRI ^a	APC/IRI	NPC/IRI	SN38G/SN38 ^a	Biliary index of Gupta ^a AUC _{SN38G} / (AUC _{SN38} × AUC _{IRI})	All type Grade 3–4	Hematological Grade 3–4	Digestive Grade 3–4
<i>NR1I2</i>	rs1523130	NS	NS	<i>p</i> = 0.01997 T dominant	<i>p</i> = 0.02444 T additive	NS	NS	NS	NS	NS
	rs3814055	NS	NS	<i>p</i> = 0.03293 T dominant	NS	NS	NS	NS	<i>p</i> = 0.003257 T: additive OR = 9.25 [1.59–53.95]	NS
	rs1523127	NS	NS	<i>p</i> = 0.01357 C dominant	<i>p</i> = 0.04526 C dominant	NS	NS	NS	<i>p</i> = 0.007804 C: additive OR = 7.23 [1.32–39.53]	NS
	rs10934498	<i>p</i> = 0.008875 A recessive	NS	NS	NS	NS	<i>p</i> = 0.01655 A recessive	NS	<i>p</i> = 0.01150 A: additive OR = 0.17 [0.04–0.082]	NS
	rs2276707	NS	NS	NS	<i>p</i> = 0.02896 T dominant	NS	NS	NS	NS	NS
	rs2472677	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<i>p</i> = 0.031228 G: recessive OR = 6.78 [1.18–39.06]	<i>p</i> = 0.003920 G: recessive OR = 41.55 [2.39–722.62]	NS <i>p</i> = 0.03477 FDR = 0.3161
<i>NR1I3</i>	rs2307418	NS	NS	NS	NS	<i>p</i> = 6.351e–06 NS when adjusted by UGT1A1*28	<i>p</i> = 0.001959 NS when adjusted by UGT1A1*28	NS	NS	NS
	rs3003596	NS	<i>p</i> = 0.04646 NS when adjusted by UGT1A1*28	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	rs2501873	NS	<i>p</i> = 0.04646 NS when adjusted by UGT1A1*28	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>UGT1A1</i>	UGT1A1*28	<i>p</i> = 0.0001914 (TA): additive	<i>p</i> = 4.481e-05 (TA): additive	NS	NS	<i>p</i> = 3.637e–07 (TA): additive	<i>p</i> = 6.351e–06 (TA): additive	NS	NS	NS

NS non-significant *p*-value, FDR false discovery rate (the chosen significant threshold for raw *p*-value and for FDR was 0.05), AUC area under the plasma-concentration curve, OR odds ratio, SNP single nucleotide polymorphism

^a Association tests adjusted by UGT1A1*28 genotype

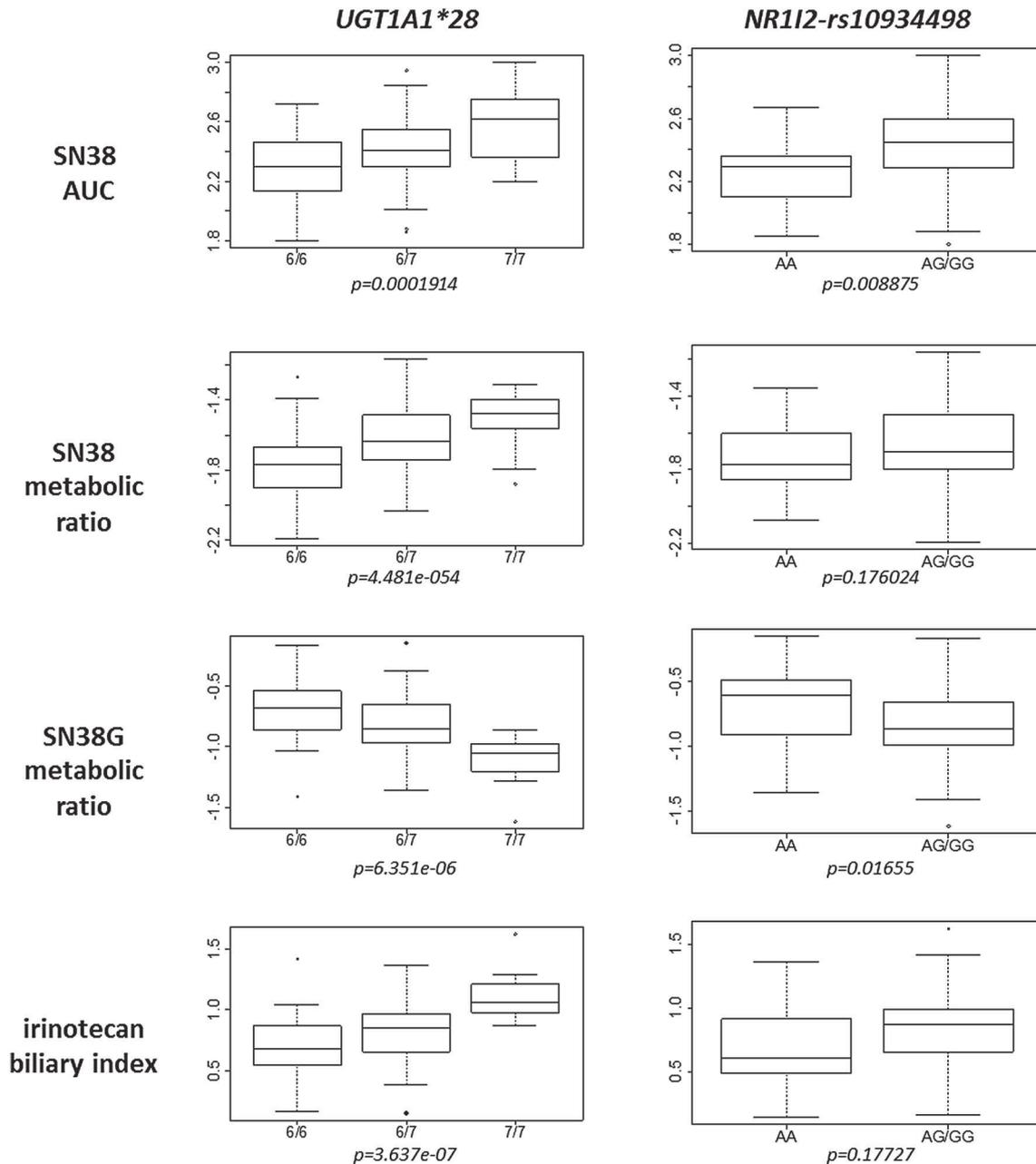


Fig. 1 Box plot of SN38 and SN38G pharmacokinetic parameters depending on UGT1A1*28 and NR1I2-rs10934498. The A allele of NR1I2 exhibits a recessive effect, thus AG and GG genotypes were grouped. AUC area under the plasma-concentration curve

now needed to confirm our findings, especially on patients treated with a high dose of irinotecan and to evaluate the clinical relevance of these new genetic markers.

5 Conclusion

We demonstrate for the first time that *NR1I2* plays a role in the pharmacogenetic of irinotecan. Our results reveal that this nuclear receptor is involved in the variability of

irinotecan metabolism, not only through drug–drug interactions [25, 26], but also through intrinsic inter-patient variability, supported by genetic polymorphisms. These findings emphasize the role of transcriptional regulators of drug-metabolizing enzymes and transporters in the pharmacogenetics of anticancer drugs. However, the usefulness of supplementary genetic markers that will join the extensive list of genetic variants to be considered could be questioned, especially because the genotyping of *UGT1A1**28 is not yet systemized. In fact, the example of

Fig. 2 Linkage disequilibrium map of *NR1I2* single nucleotide polymorphisms. The value in each lozenge represents the D' parameter (filled diamond $D' = 100$; empty diamond $D' = 0$). The higher D' is, the stronger is the linkage between the two single nucleotide polymorphisms

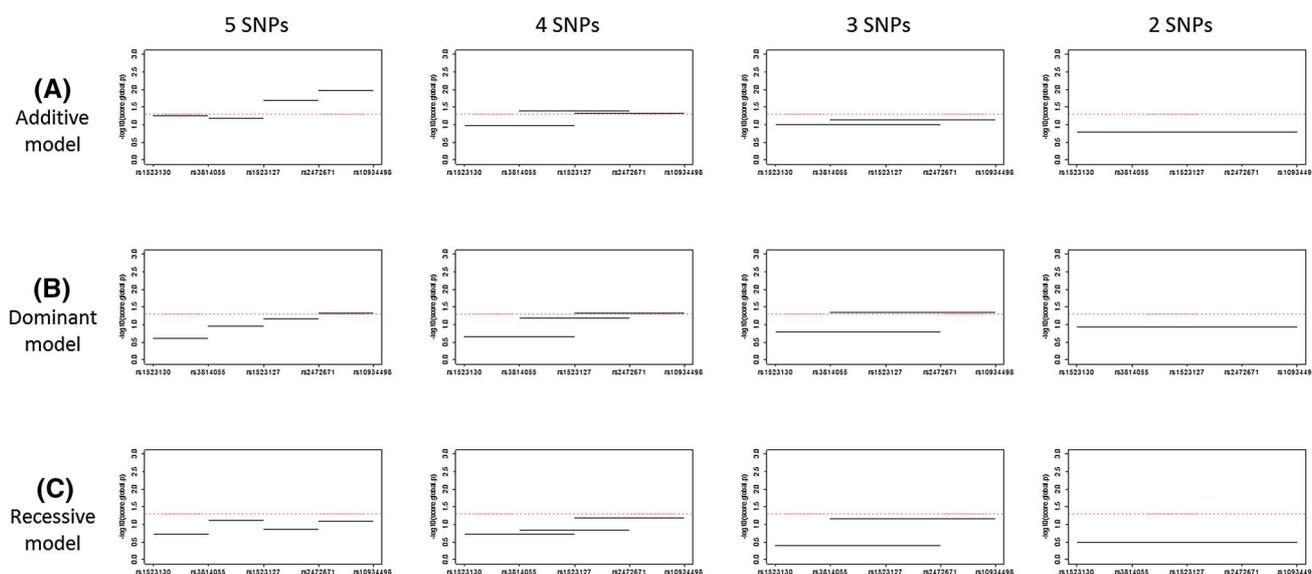
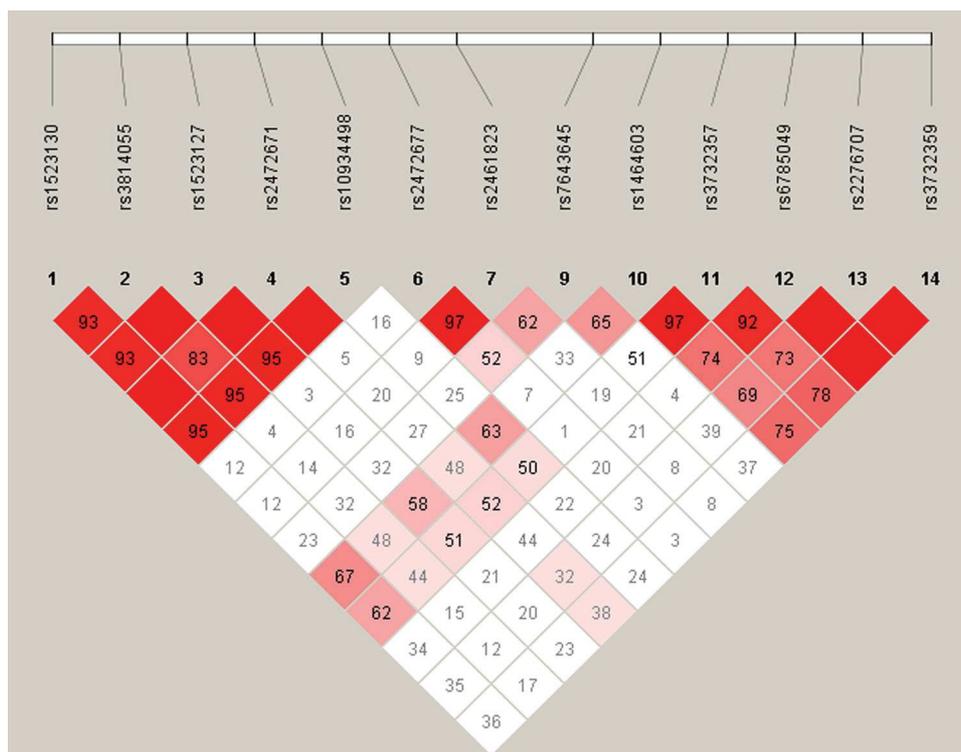


Fig. 3 Association between haplotypes in the *NR1I2* promoter and hematological toxicity of irinotecan-based chemotherapy, according to additive (a), dominant (b), and recessive (c) models. Score tests were performed with smaller and smaller groups of SNPs (from 5 to 2) starting at different positions in the block. In each graph, p values of the global score test between hematological toxicity and a

combination of SNPs are expressed in a negative logarithm. The red line corresponds to the significant threshold $p = 0.05$ or $-\log(p) = 1.3$. The combination of SNPs that leads to the lowest p value is regarded as the most relevant region in the block. SNPs single nucleotide polymorphisms

irinotecan is typical of many drugs whose pharmacology is complex, multigenic, and multifactorial, but for which the idea of a personalized medicine should not be abandoned.

Compliance with Ethical Standards

Funding This work was supported by a Grant from the Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes (France) and a grant from Cancéropôle Grand Sud-Ouest (France).

Conflicts of interest Litaty Céphanoée Mbatchi, Jacques Robert, Marc Ychou, Jean-Christophe Boyer, Maguy Del Rio, Matthieu Gassiot, Fabienne Thomas, Nicole Tubiana, and Alexandre Evrard declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer: irinotecan Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343(13):905–14.
- Ychou M, Viret F, Kramar A, Desseigne F, Mitry E, Guimbaud R, et al. Tritherapy with fluorouracil/leucovorin, irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX): a phase II study in colorectal cancer patients with non-resectable liver metastases. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;62(2):195–201.
- Innocenti F, Schilsky RL, Ramírez J, Janisch L, Undevia S, House LK, et al. Dose-finding and pharmacokinetic study to optimize the dosing of irinotecan according to the UGT1A1 genotype of patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32(22):2328–34.
- Kim KP, Hong YS, Lee JL, Bae KS, Kim HS, Shin JG, et al. A phase I study of UGT1A1 *28/*6 genotype-directed dosing of irinotecan (CPT-11) in Korean patients with metastatic colorectal cancer receiving FOLFIRI. *Oncology*. 2015;88(3):164–72.
- Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. *Toxicol In Vitro*. 2006;20(2):163–75.
- Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: the call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol*. 2014;20(30):10316–30.
- Daniella Lowenberg CFT, Whirl-Carrillo M, Ramirez J, Gong L, Marsh S, Schuetz EG, Dolan ME, Innocenti F, McLeod HL, Ratain MJ. PharmGKB: irinotecan pathway, pharmacokinetics. <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2001#PGG>. Accessed 20 Mar 2016.
- Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res*. 2001;7(8):2182–94.
- Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(14):8170–4.
- Chen Y, Tang Y, Guo C, Wang J, Boral D, Nie D. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(8):1112–26.
- Tolson AH, Wang H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(13):1238–49.
- Staudinger JL, Woody S, Sun M, Cui W. Nuclear-receptor-mediated regulation of drug- and bile-acid-transporter proteins in gut and liver. *Drug Metab Rev*. 2013;45(1):48–59.
- Xie W, Uppal H, Saini SP, Mu Y, Little JM, Radominska-Pandya A, et al. Orphan nuclear receptor-mediated xenobiotic regulation in drug metabolism. *Drug Discov Today*. 2004;9(10):442–9.
- Blumberg B, Sabbagh W, Juguilon H, Bolado J, van Meter CM, Ong ES, et al. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev*. 1998;12(20):3195–205.
- Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeborg L, Sydow-Bäckman M, et al. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(21):12208–13.
- Goodwin B, Hodgson E, D’Costa DJ, Robertson GR, Liddle C. Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol*. 2002;62(2):359–65.
- Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem*. 2000;275(20):15122–7.
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest*. 1998;102(5):1016–23.
- Lamba J, Lamba V, Strom S, Venkataramanan R, Schuetz E. Novel single nucleotide polymorphisms in the promoter and intron 1 of human pregnane X receptor/NR1I2 and their association with CYP3A4 expression. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(1):169–81.
- Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, et al. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(7):795–804.
- Staudinger JL, Xu C, Cui YJ, Klaassen CD. Nuclear receptor-mediated regulation of carboxylesterase expression and activity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010;6(3):261–71.
- Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z’graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, et al. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol*. 2005;70(6):949–58.
- Evrard A, Mbatchi L. Genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes and transporters: the long way from bench to bedside. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(15):1720–9.
- Raynal C, Pascussi JM, Leguinel G, Breuker C, Kantar J, Lallemand B, et al. Pregnane X Receptor (PXR) expression in colorectal cancer cells restricts irinotecan chemosensitivity through enhanced SN-38 glucuronidation. *Mol Cancer*. 2010;9:46.
- Mathijssen RH, Verweij J, de Bruijn P, Loos WJ, Sparreboom A. Effects of St. John’s wort on irinotecan metabolism. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(16):1247–9.
- Crews KR, Stewart CF, Jones-Wallace D, Thompson SJ, Houghton PJ, Heideman RL, et al. Altered irinotecan pharmacokinetics in pediatric high-grade glioma patients receiving enzyme-inducing anticonvulsant therapy. *Clin Cancer Res*. 2002;8(7):2202–9.
- Lamba J, Lamba V, Schuetz E. Genetic variants of PXR (NR1I2) and CAR (NR1I3) and their implications in drug metabolism and pharmacogenetics. *Curr Drug Metab*. 2005;6(4):369–83.
- Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, et al. The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics*. 2001;11(7):555–72.
- Oleson L, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH. Identification of polymorphisms in the 3′-untranslated region of the human pregnane X receptor (PXR) gene associated with variability in cytochrome P450 3A (CYP3A) metabolism. *Xenobiotica*. 2010;40(2):146–62.

30. Sandanaraj E, Lal S, Selvarajan V, Ooi LL, Wong ZW, Wong NS, et al. PXR pharmacogenetics: association of haplotypes with hepatic CYP3A4 and ABCB1 messenger RNA expression and doxorubicin clearance in Asian breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):7116–26.
31. Schipani A, Siccardi M, D'Avolio A, Baietto L, Simiele M, Bonora S, et al. Population pharmacokinetic modeling of the association between 63396C->T pregnane X receptor polymorphism and unboosted atazanavir clearance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):5242–50.
32. Siccardi M, D'Avolio A, Baietto L, Gibbons S, Sciandra M, Colucci D, et al. Association of a single-nucleotide polymorphism in the pregnane X receptor (PXR 63396C->T) with reduced concentrations of unboosted atazanavir. *Clin Infect Dis.* 2008;47(9):1222–5.
33. Hauser IA, Kruck S, Gauer S, Nies AT, Winter S, Bedke J, et al. Human pregnane X receptor genotype of the donor but not of the recipient is a risk factor for delayed graft function after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;91(5):905–16.
34. Xu CF, Bing NX, Ball HA, Rajagopalan D, Sternberg CN, Hutson TE, et al. Pazopanib efficacy in renal cell carcinoma: evidence for predictive genetic markers in angiogenesis-related and exposure-related genes. *J Clin Oncol.* 2011;29(18):2557–64.
35. Mbatchi LC, Schmitt A, Thomas F, Cazaubon Y, Robert J, Lumbroso S, et al. Polymorphisms in SLCO1B3 and NR1H2 as genetic determinants of hematotoxicity of carboplatin and paclitaxel combination. *Pharmacogenomics.* 2015;16(13):1439–50.
36. Swart M, Whitehorn H, Ren Y, Smith P, Ramesar RS, Dandara C. PXR and CAR single nucleotide polymorphisms influence plasma efavirenz levels in South African HIV/AIDS patients. *BMC Med Genet.* 2012;13:112.
37. van der Veldt AA, Eechoute K, Gelderblom H, Gietema J, Guchelaar HJ, van Erp NP, et al. Genetic polymorphisms associated with a prolonged progression-free survival in patients with metastatic renal cell cancer treated with sunitinib. *Clin Cancer Res.* 2011;17(3):620–9.
38. van Erp NP, Eechoute K, van der Veldt AA, Haanen JB, Reyners AK, Mathijssen RH, et al. Pharmacogenetic pathway analysis for determination of sunitinib-induced toxicity. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4406–12.
39. Poujol S, Pinguet F, Ychou M, Abderrahim AG, Duffour J, Bressolle FM. A limited sampling strategy to estimate the pharmacokinetic parameters of irinotecan and its active metabolite, SN-38, in patients with metastatic digestive cancer receiving the FOLFIRI regimen. *Oncol Rep.* 2007;18(6):1613–1621.
40. Poujol S, Pinguet F, Malosse F, Astre C, Ychou M, Culine S, et al. Sensitive HPLC-fluorescence method for irinotecan and four major metabolites in human plasma and saliva: application to pharmacokinetic studies. *Clin Chem.* 2003;49(11):1900–8.
41. Gupta E, Lestingi TM, Mick R, Ramirez J, Vokes EE, Ratain MJ. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res.* 1994;54(14):3723–5.
42. Benkali K, Prémaud A, Picard N, Rérolle JP, Toupance O, Hoizey G, et al. Tacrolimus population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis and Bayesian estimation in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(12):805–16.
43. Dring MM, Goulding CA, Trimble VI, Keegan D, Ryan AW, Brophy KM, et al. The pregnane X receptor locus is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2006;130(2):341–8 (**quiz 592**).
44. Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. The nuclear receptor PXR gene variants are associated with liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmacogenet Genom.* 2010;20(1):1–8.
45. Karlsen TH, Lie BA, Frey Frøslie K, Thorsby E, Broomé U, Schruppf E, et al. Polymorphisms in the steroid and xenobiotic receptor gene influence survival in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology.* 2006;131(3):781–7.
46. Ferrarasso M, Turolo S, Belinghieri M, Tirelli AS, Grillo P, Groppali E, et al. The potential of steroids and xenobiotic receptor polymorphisms in forecasting cyclosporine pharmacokinetic variability in young kidney transplant recipients. *Pediatr Transpl.* 2012;16(6):658–63.
47. Urano T, Usui T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in the constitutive androstane receptor gene with bone mineral density. *Geriatr Gerontol Int.* 2009;9(3):235–41.
48. Moon JY, Lee KE, Chang BC, Jeong E, Jeong H, Gwak HS. Combined effects of hepatocyte nuclear factor 4 α and constitutive androstane receptor on stable warfarin doses. *Pharmacogenet Genom.* 2015;25(1):38–40.
49. Wyen C, Hendra H, Siccardi M, Platten M, Jaeger H, Harrer T, et al. Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) and constitutive androstane receptor (CAR) polymorphisms are associated with early discontinuation of efavirenz-containing regimens. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):2092–8.
50. Andersen V, Christensen J, Ernst A, Jacobsen BA, Tjønneland A, Krarup HB, et al. Polymorphisms in NF- κ B, PXR, LXR, PPAR γ and risk of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2011;17(2):197–206.
51. Amre DK, Mack DR, Israel D, Morgan K, Krupoves A, Costea I, et al. Investigation of associations between the pregnane-X receptor gene (NR1H2) and Crohn's disease in Canadian children using a gene-wide haplotype-based approach. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(9):1214–8.
52. Dahan L, Ciccolini J, Evrard A, Mbatchi L, Tibbitts J, Ries P, et al. Sudden death related to toxicity in a patient on capecitabine and irinotecan plus bevacizumab intake: pharmacogenetic implications. *J Clin Oncol.* 2012;30(4):e41–4.
53. González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics.* 2007;23(5):644–5.
54. John Storey AB, Dabney A, Robinson D. qvalue: Q-value estimation for false discovery rate control. R package version 2.0.0. <http://qvalue.princeton.edu/>, <http://github.com/jdstorey/qvalue>. Accessed 20 Feb 2016.
55. Yoav B, Yosef H. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc Series B (Methodological).* 1995;1995(57):289–300.
56. Chen JJ, Roberson PK, Schell MJ. The false discovery rate: a key concept in large-scale genetic studies. *Cancer Control.* 2010;17(1):58–62.
57. Sinnwell JP SD. haplo.stats: Statistical analysis of haplotypes with traits and covariates when linkage phase is ambiguous. 2015. <https://cran.r-project.org/web/packages/haplo.stats/index.html>. Accessed 10 Oct 2015
58. NCBI. dbSNP: Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and multiple small-scale variations that include insertions/deletions, microsatellites, and non-polymorphic variants. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. Accessed 10 Oct 2015.
59. Marsh S, Hoskins JM. Irinotecan pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* 2010;11(7):1003–10.
60. Mathijssen RH, Gurney H. Irinogenetics: how many stars are there in the sky? *J Clin Oncol.* 2009;27(16):2578–9.
61. Sai K, Saito Y, Tatewaki N, Hosokawa M, Kaniwa N, Nishimaki-Mogami T, et al. Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2010;70(2):222–33.
62. Carlini LE, Meropol NJ, Bever J, Andria ML, Hill T, Gold P, et al. UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin Cancer Res.* 2005;11(3):1226–36.

63. Chen S, Laverdiere I, Tourancheau A, Jonker D, Couture F, Cecchin E, et al. A novel UGT1 marker associated with better tolerance against irinotecan-induced severe neutropenia in metastatic colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics J*. 2015;15(6):513–20
64. Crona DJ, Ramirez J, Qiao W, de Graan AJ, Ratain MJ, van Schaik RH, et al. Clinical validity of new genetic biomarkers of irinotecan neutropenia: an independent replication study. *Pharmacogenomics J*. 2016;16(1):54–9.
65. Etienne-Grimaldi MC, Boyer JC, Thomas F, Quaranta S, Picard N, Lorient MA, et al. UGT1A1 genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29(3):219–37.
66. Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL. UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(17):1290–5.
67. Huang L, Zhang T, Xie C, Liao X, Yu Q, Feng J, et al. SLC01B1 and SLC19A1 gene variants and irinotecan-induced rapid response and survival: a prospective multicenter pharmacogenetics study of metastatic colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;8(10):e77223.
68. De Mattia E, Toffoli G, Polesel J, D'Andrea M, Corona G, Zagonel V, et al. Pharmacogenetics of ABC and SLC transporters in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOL-FIRI treatment. *Pharmacogenet Genom*. 2013;23(10):549–57.
69. Kile DA, MaWhinney S, Aquilante CL, Rower JE, Castillo-Mancilla JR, Anderson PL. A population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis of atazanavir. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(10):1227–34.
70. Bonora S, Rusconi S, Calcagno A, Bracchi M, Viganò O, Cusato J, et al. Successful pharmacogenetics-based optimization of unboosted atazanavir plasma exposure in HIV-positive patients: a randomized, controlled, pilot study (the REYAGEN study). *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(11):3096–9

G BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. B. Longley, W. L. Allen, et P. G. Johnston, « Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer », *Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Cancer*, vol. 1766, n° 2, p. 184–196, 2006.
- [2] L. H. Patterson et G. I. Murray, « Tumour cytochrome P450 and drug activation », *Curr. Pharm. Des.*, vol. 8, n° 15, p. 1335–1347, 2002.
- [3] N. Widmer *et al.*, « Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two--targeted therapies », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 50, n° 12, p. 2020–2036, août 2014.
- [4] T. Chen, « Overcoming drug resistance by regulating nuclear receptors », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, n° 13, p. 1257–1264, oct. 2010.
- [5] A. Poso et P. Honkakoski, « Ligand recognition by drug-activated nuclear receptors PXR and CAR: structural, site-directed mutagenesis and molecular modeling studies », *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 6, n° 8, p. 937–943, 2006.
- [6] Y. Chen, Y. Tang, M.-T. Wang, S. Zeng, et D. Nie, « Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 21, p. 10361–10367, nov. 2007.
- [7] T. Fujimura *et al.*, « Clinical significance of steroid and xenobiotic receptor and its targeted gene CYP3A4 in human prostate cancer », *Cancer Sci.*, vol. 103, n° 2, p. 176–180, févr. 2012.
- [8] B. Zhang *et al.*, « Pregnane X receptor as a therapeutic target to inhibit androgen activity », *Endocrinology*, vol. 151, n° 12, p. 5721–5729, déc. 2010.
- [9] I. Heidegger *et al.*, « Novel therapeutic approaches for the treatment of castration-resistant prostate cancer », *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 138, p. 248–256, nov. 2013.
- [10] J. S. de Bono *et al.*, « Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial », *The Lancet*, vol. 376, n° 9747, p. 1147–1154, 2010.
- [11] E. Farber et R. Cameron, « The sequential analysis of cancer development », *Adv. Cancer Res.*, vol. 31, p. 125–226, 1980.
- [12] S. Puyo, « Recherche d'alternatives thérapeutiques aux taxanes dans les cancers de la prostate de hauts grades: identification d'une signature prédictive de la réponse à l'oxaliplatine », Bordeaux 2, 2011.
- [13] I. B. Weinstein, « Carcinogenesis as a multistage process—experimental evidence. », *IARC Sci. Publ.*, n° 39, p. 9, 1982.
- [14] H. Vainio, P. Magee, D. McGregor, et A. J. McMichael, *Mechanisms of carcinogenesis in risk identification*. IARC Lyon, 1991.
- [15] G. I. Evan et K. H. Vousden, « Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer », *Nature*, vol. 411, n° 6835, p. 342–348, 2001.
- [16] I. J. Fidler, D. M. Gersten, et I. R. Hart, « The biology of cancer invasion and metastasis », *Adv. Cancer Res.*, vol. 28, p. 149–250, 1978.
- [17] « Epidémiologie des cancers - Les chiffres du cancer en France | Institut National Du Cancer ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers>. [Consulté le: 08-nov-2016].
- [18] « Anatomie de la prostate - Cancer de la prostate | Institut National Du Cancer ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-de-la-prostate/Anatomie-de-la-prostate>. [Consulté le: 08-nov-2016].
- [19] E. D. Crawford, « Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer », *Urology*, vol. 73, n° 5 Suppl, p. S4–10, mai 2009.
- [20] « Evolution de l'incidence et de la mortalité nationales par localisation cancéreuse entre 1980 et 2012 ». [En ligne]. Disponible sur: <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Fiches-de>

synthese/Epidemiologie/Evolution-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-nationales-par-localisation-cancereuse-entre-1980-et-2012. [Consulté le: 08-nov-2016].

- [21] W. G. Nelson, A. M. De Marzo, et W. B. Isaacs, « Prostate Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, n° 4, p. 366-381, juillet 2003.
- [22] H. Samaratunga, R. A. Gardiner, J. Yaxley, et I. Brown, « Atypical prostatic glandular proliferations on needle biopsy: Diagnostic implications, use of immunohistochemistry, and clinical significance », *Anal. Quant. Cytol. Histol. Int. Acad. Cytol. Am. Soc. Cytol.*, vol. 28, n° 2, p. 104-110, avr. 2006.
- [23] S. Davidsson *et al.*, « Inflammation, focal atrophic lesions, and prostatic intraepithelial neoplasia with respect to risk of lethal prostate cancer », *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.*, vol. 20, n° 10, p. 2280-2287, oct. 2011.
- [24] J. Felgueiras, J. V. Silva, et M. Fardilha, « Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets », *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, vol. 15, n° 1, p. 16-42, janv. 2014.
- [25] S. Bernardini *et al.*, « Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region of the GSTP1 gene in prostate cancer: a useful diagnostic and prognostic marker? », *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 350, n° 1-2, p. 181-188, déc. 2004.
- [26] O. E. Bryzgunova, E. S. Morozkin, S. V. Yarmoschuk, V. V. Vlassov, et P. P. Laktionov, « Methylation-Specific Sequencing of GSTP1 Gene Promoter in Circulating/Extracellular DNA from Blood and Urine of Healthy Donors and Prostate Cancer Patients », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1137, n° 1, p. 222-225, 2008.
- [27] M. Crumbaker, L. Khoja, et A. M. Joshua, « AR Signaling and the PI3K Pathway in Prostate Cancer », *Cancers*, vol. 9, n° 4, avr. 2017.
- [28] B. S. Carver *et al.*, « Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer », *Cancer Cell*, vol. 19, n° 5, p. 575-586, mai 2011.
- [29] D. J. Mulholland *et al.*, « Cell Autonomous Role of PTEN in Regulating Castration-Resistant Prostate Cancer Growth », *Cancer Cell*, vol. 19, n° 6, p. 792-804, juin 2011.
- [30] C. S. Grasso *et al.*, « The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer », *Nature*, vol. 487, n° 7406, p. 239-243, juill. 2012.
- [31] B. S. Taylor *et al.*, « Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer », *Cancer Cell*, vol. 18, n° 1, p. 11-22, juill. 2010.
- [32] H. Beltran *et al.*, « Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity », *Eur. Urol.*, vol. 63, n° 5, p. 920-926, 2013.
- [33] S. A. Tomlins *et al.*, « Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer », *Science*, vol. 310, n° 5748, p. 644-648, 2005.
- [34] C. E. Barbieri *et al.*, « The mutational landscape of prostate cancer », *Eur. Urol.*, vol. 64, n° 4, p. 567-576, oct. 2013.
- [35] M. F. Berger *et al.*, « The genomic complexity of primary human prostate cancer », *Nature*, vol. 470, n° 7333, p. 214-220, février 2011.
- [36] J. Lindberg *et al.*, « Exome sequencing of prostate cancer supports the hypothesis of independent tumour origins », *Eur. Urol.*, vol. 63, n° 2, p. 347-353, 2013.
- [37] R. E. Bakin, D. Gioeli, R. A. Sikes, E. A. Bissonette, et M. J. Weber, « Constitutive activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway promotes androgen hypersensitivity in LNCaP prostate cancer cells », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 8, p. 1981-1989, avr. 2003.
- [38] L. Bubendorf *et al.*, « Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients », *Hum. Pathol.*, vol. 31, n° 5, p. 578-583, 2000.

- [39] E. S. Martens-Uzunova *et al.*, « Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer », *Oncogene*, vol. 31, n° 8, p. 978–991, 2012.
- [40] C. Jerónimo *et al.*, « Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance », *Eur. Urol.*, vol. 60, n° 4, p. 753–766, 2011.
- [41] J. W. Catto *et al.*, « MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review », *Eur. Urol.*, vol. 59, n° 5, p. 671–681, 2011.
- [42] K. P. Porkka, M. J. Pfeiffer, K. K. Waltering, R. L. Vessella, T. L. Tammela, et T. Visakorpi, « MicroRNA expression profiling in prostate cancer », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 13, p. 6130–6135, 2007.
- [43] S. Varambally *et al.*, « The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer », *Nature*, vol. 419, n° 6907, p. 624–629, 2002.
- [44] K. Xu *et al.*, « EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent », *Science*, vol. 338, n° 6113, p. 1465–1469, 2012.
- [45] M. Nieto, S. Finn, M. Loda, et W. C. Hahn, « Prostate cancer: Re-focusing on androgen receptor signaling », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, n° 9, p. 1562–1568, 2007.
- [46] P. E. Lonergan, D. J. Tindall, et others, « Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression », *J. Carcinog.*, vol. 10, n° 1, p. 20, 2011.
- [47] C. A. Heinlein et C. Chang, « Androgen receptor in prostate cancer », *Endocr. Rev.*, vol. 25, n° 2, p. 276–308, avr. 2004.
- [48] N. Craft, Y. Shostak, M. Carey, et C. L. Sawyers, « A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase », *Nat. Med.*, vol. 5, n° 3, p. 280–285, 1999.
- [49] G. Buchanan, N. M. Greenberg, H. I. Scher, J. M. Harris, V. R. Marshall, et W. D. Tilley, « Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer », *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, n° 5, p. 1273–1281, 2001.
- [50] B. J. Feldman et D. Feldman, « The development of androgen-independent prostate cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 1, n° 1, p. 34–45, 2001.
- [51] H.-Y. Kang, H.-K. Lin, Y.-C. Hu, S. Yeh, K.-E. Huang, et C. Chang, « From transforming growth factor- β signaling to androgen action: identification of Smad3 as an androgen receptor coregulator in prostate cancer cells », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, n° 6, p. 3018–3023, 2001.
- [52] H.-A. Meyer, I. Ahrens-Fath, A. Sommer, et B. Haendler, « Novel molecular aspects of prostate carcinogenesis », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 58, n° 1, p. 10–16, 2004.
- [53] « Urofrance: Résultats de la recherche ». [En ligne]. Disponible sur: <http://urofrance.org/nc/publications-livres/publications-scientifiques/resultats-de-la-recherche/html/depistage-du-cancer-de-la-prostate.html>. [Consulté le: 08-nov-2016].
- [54] F. H. Schröder, C. Gosselaar, S. Roemeling, R. Postma, M. J. Roobol, et C. H. Bangma, « PSA and the detection of prostate cancer after 2005. Part I », *Eau-Ebu Update Ser.*, vol. 4, n° 1, p. 2–12, 2006.
- [55] N. Lumen *et al.*, « Screening and early diagnosis of prostate cancer: an update », *Acta Clin. Belg.*, vol. 67, n° 4, p. 270–275, 2012.
- [56] D. F. Gleason, « Histologic grading of prostate cancer: a perspective », *Hum. Pathol.*, vol. 23, n° 3, p. 273–279, 1992.
- [57] L. Egevad, B. Delahunt, J. R. Srigley, et H. Samaratunga, « International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer - An ISUP consensus on contemporary grading », *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, vol. 124, n° 6, p. 433–435, juin 2016.

- [58] N. Mottet *et al.*, «EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer », *Eur. Urol.*, vol. 59, n° 4, p. 572-583, avril 2011.
- [59] A. H. Reid, G. Attard, E. Barrie, et J. S. De Bono, « CYP17 inhibition as a hormonal strategy for prostate cancer », *Nat. Clin. Pract. Urol.*, vol. 5, n° 11, p. 610–620, 2008.
- [60] C. J. Ryan *et al.*, « Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy », *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, n° 2, p. 138-148, janv. 2013.
- [61] C. Tran *et al.*, « Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer », *Science*, vol. 324, n° 5928, p. 787–790, 2009.
- [62] H. I. Scher *et al.*, « Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1–2 study », *The Lancet*, vol. 375, n° 9724, p. 1437–1446, 2010.
- [63] H. I. Scher *et al.*, « Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy », *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, n° 13, p. 1187-1197, sept. 2012.
- [64] A. Heidenreich *et al.*, « Cabazitaxel plus prednisone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel: results from the German compassionate-use programme », *Eur. Urol.*, vol. 63, n° 6, p. 977–982, 2013.
- [65] K. Fizazi *et al.*, « Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study », *The Lancet*, vol. 377, n° 9768, p. 813–822, 2011.
- [66] E. J. Small *et al.*, « Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer », *J. Clin. Oncol.*, vol. 24, n° 19, p. 3089–3094, 2006.
- [67] P. W. Kantoff *et al.*, « 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, n° 7, p. 1099–1105, 2010.
- [68] N. Finnström *et al.*, « Detection of cytochrome P450 mRNA transcripts in prostate samples by RT-PCR », *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 31, n° 10, p. 880-886, oct. 2001.
- [69] L. cephanoe Mbatchesi, « Pharmacogénétique des xénorécepteurs PXR et CAR: implication dans la toxicité hématologique de la chimiothérapie à base de carboplatine et paclitaxel et dans la pharmacocinétique de l'irinotécan. », 2013.
- [70] H. Kusuvara et Y. Sugiyama, « In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney », *Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 24, n° 1, p. 37–52, 2009.
- [71] U. Gether, P. H. Andersen, O. M. Larsson, et A. Schousboe, « Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 27, n° 7, p. 375-383, juill. 2006.
- [72] I. Spriet, W. Meersseman, J. de Hoon, S. von Winckelmann, A. Wilmer, et L. Willems, « Mini-series: II. clinical aspects. clinically relevant CYP450-mediated drug interactions in the ICU », *Intensive Care Med.*, vol. 35, n° 4, p. 603-612, avr. 2009.
- [73] M. Michael et M. M. Doherty, « Tumoral Drug Metabolism: Overview and Its Implications for Cancer Therapy », *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, n° 1, p. 205-229, janv. 2005.
- [74] J. K. Lamba, Y. S. Lin, E. G. Schuetz, et K. E. Thummel, « Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, n° 10, p. 1271-1294, nov. 2002.
- [75] N. Plant, « The human cytochrome P450 sub-family: transcriptional regulation, inter-individual variation and interaction networks », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1770, n° 3, p. 478-488, mars 2007.
- [76] N. E. Sládek, « Aldehyde dehydrogenase-mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines », *Curr. Pharm. Des.*, vol. 5, n° 8, p. 607-625, août 1999.

- [77] J. K. Lamba, « Genetic factors influencing cytarabine therapy », *Pharmacogenomics*, vol. 10, n° 10, p. 1657-1674, oct. 2009.
- [78] Z.-H. Lu, R. Zhang, et R. B. Diasio, « Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver. », *J. Biol. Chem.*, vol. 267, n° 24, p. 17102–17109, 1992.
- [79] T. K. Kiang, M. H. Ensom, et T. K. Chang, « UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions », *Pharmacol. Ther.*, vol. 106, n° 1, p. 97–132, 2005.
- [80] P. I. Mackenzie *et al.*, « Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily », *Pharmacogenet. Genomics*, vol. 15, n° 10, p. 677-685, oct. 2005.
- [81] R. G. Deeley, C. Westlake, et S. P. C. Cole, « Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins », *Physiol. Rev.*, vol. 86, n° 3, p. 849-899, juill. 2006.
- [82] A. A. Stavrovskaya et T. P. Stromskaya, « Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells », *Biochem. Biokhimiia*, vol. 73, n° 5, p. 592-604, mai 2008.
- [83] Y. G. Assaraf et M. J. Borgnia, « Probing the interaction of the multidrug-resistance phenotype with the polypeptide ionophore gramicidin D via functional channel formation », *Eur. J. Biochem.*, vol. 222, n° 3, p. 813–824, 1994.
- [84] M. J. Borgnia, G. D. Eytan, et Y. G. Assaraf, « Competition of hydrophobic peptides, cytotoxic drugs, and chemosensitizers on a common P-glycoprotein pharmacophore as revealed by its ATPase activity », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 6, p. 3163–3171, 1996.
- [85] L.-Y. Ma *et al.*, « Design and synthesis of novel 1, 2, 3-triazole–pyrimidine–urea hybrids as potential anticancer agents », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 25, n° 5, p. 1124–1128, 2015.
- [86] R. Didziapetris, P. Japertas, A. Avdeef, et A. Petrauskas, « Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity », *J. Drug Target.*, vol. 11, n° 7, p. 391–406, 2003.
- [87] C. F. Higgins et M. M. Gottesman, « Is the multidrug transporter a flippase? », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 17, n° 1, p. 18–21, 1992.
- [88] M. Dong, F. Penin, et L. G. Baggetto, « Efficient purification and reconstitution of P-glycoprotein for functional and structural studies », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 46, p. 28875–28883, 1996.
- [89] H. N. Tinsley *et al.*, « Colon Tumor Cell Growth–Inhibitory Activity of Sulindac Sulfide and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Is Associated with Phosphodiesterase 5 Inhibition », *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)*, vol. 3, n° 10, p. 1303–1313, 2010.
- [90] L. A. Doyle et D. D. Ross, « Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) », *Oncogene*, vol. 22, n° 47, p. 7340–7358, 2003.
- [91] M. Munoz, M. Henderson, M. Haber, et M. Norris, « Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer », *IUBMB Life*, vol. 59, n° 12, p. 752-757, déc. 2007.
- [92] S. A. Wardlaw, K. J. Nikula, D. A. Kracko, G. L. Finch, J. R. Thornton-Manning, et A. R. Dahl, « Effect of cigarette smoke on CYP1A1, CYP1A2 and CYP2B1/2 of nasal mucosae in F344 rats », *Carcinogenesis*, vol. 19, n° 4, p. 655-662, avr. 1998.
- [93] T. K. H. Chang, « Activation of pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) by herbal medicines », *AAPS J.*, vol. 11, n° 3, p. 590-601, sept. 2009.
- [94] N. Isoherranen et K. E. Thummel, « Drug Metabolism and Transport During Pregnancy: How Does Drug Disposition Change during Pregnancy and What Are the

- Mechanisms that Cause Such Changes? », *Drug Metab. Dispos.*, vol. 41, n° 2, p. 256-262, févr. 2013.
- [95] J.-P. Gillet et M. M. Gottesman, « Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer », in *Multi-Drug Resistance in Cancer*, Humana Press, 2010, p. 47-76.
- [96] S. Rendic et F. J. D. Carlo, « Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors », *Drug Metab. Rev.*, vol. 29, n° 1-2, p. 413-580, 1997.
- [97] A. A. Desai, F. Innocenti, et M. J. Ratain, « UGT pharmacogenomics: implications for cancer risk and cancer therapeutics », *Pharmacogenet. Genomics*, vol. 13, n° 8, p. 517-523, 2003.
- [98] F. P. Guengerich, « Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy », *Cancer Res.*, vol. 48, n° 11, p. 2946-2954, 1988.
- [99] T. Suzuki, K. Nishio, et S. Tanabe, « The MRP family and anticancer drug metabolism », *Curr. Drug Metab.*, vol. 2, n° 4, p. 367-377, déc. 2001.
- [100] G. I. Murray, « The role of cytochrome P450 in tumour development and progression and its potential in therapy », *J. Pathol.*, vol. 192, n° 4, p. 419-426, 2000.
- [101] G. I. Murray, M. C. Taylor, M. D. Burke, et W. T. Melvin, « Enhanced expression of cytochrome P450 in stomach cancer. », *Br. J. Cancer*, vol. 77, n° 7, p. 1040, 1998.
- [102] L. Massaad *et al.*, « Comparison of mouse and human colon tumors with regard to phase I and phase II drug-metabolizing enzyme systems », *Cancer Res.*, vol. 52, n° 23, p. 6567-6575, 1992.
- [103] S. V. Bhagwat, M. R. Boyd, et V. Ravindranath, « Multiple forms of cytochrome P450 and associated monooxygenase activities in human brain mitochondria », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 59, n° 5, p. 573-582, 2000.
- [104] H. K. Crewe, L. M. Notley, R. M. Wunsch, M. S. Lennard, et E. M. Gillam, « Metabolism of Tamoxifen by Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes: Formation of the 4-Hydroxy, 4'-Hydroxy and N-Desmethyl Metabolites and Isomerization of trans-4-Hydroxytamoxifen », *Drug Metab. Dispos.*, vol. 30, n° 8, p. 869-874, 2002.
- [105] F. J. Gonzalez et H. V. Gelboin, « Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins », *Drug Metab. Rev.*, vol. 26, n° 1-2, p. 165-183, 1994.
- [106] H.-J. Xie, S. Lundgren, U. Broberg, N. Finnström, A. Rane, et M. Hassan, « Effect of cyclophosphamide on gene expression of cytochromes P450 and β -actin in the HL-60 cell line », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 449, n° 3, p. 197-205, 2002.
- [107] M. C. McFadyen, H. L. McLeod, F. C. Jackson, W. T. Melvin, J. Doehmer, et G. I. Murray, « Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression:: A novel mechanism of anticancer drug resistance », *Abbreviations: CYP, cytochrome P450; ANF, alpha-naphthoflavone; MTT, 3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; and 5-FU, 5-fluorouracil.* », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 62, n° 2, p. 207-212, 2001.
- [108] U. M. Zanger et K. Klein, « Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance », *Front. Genet.*, vol. 4, mars 2013.
- [109] M. Goetz, A. Kamal, et M. Ames, « Tamoxifen Pharmacogenomics: The Role of CYP2D6 as a Predictor of Drug Response », *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 83, n° 1, p. 160-166, janv. 2008.
- [110] G. S. Hwang, R. Bhat, R. D. Crutchley, et M. V. Trivedi, « Impact of CYP2D6 polymorphisms on endoxifen concentrations and breast cancer outcomes », *Pharmacogenomics J.*, août 2017.

- [111] L. Dean, « Tamoxifen Therapy and CYP2D6 Genotype », in *Medical Genetics Summaries*, V. Pratt, H. McLeod, L. Dean, A. Malheiro, et W. Rubinstein, Éd. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2012.
- [112] V. J. Wachter, J. A. Silverman, Y. Zhang, et L. Z. Benet, « Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics », *J. Pharm. Sci.*, vol. 87, n° 11, p. 1322–1330, 1998.
- [113] I. Royer, B. Monsarrat, M. Sonnier, M. Wright, et T. Cresteil, « Metabolism of docetaxel by human cytochromes P450: interactions with paclitaxel and other antineoplastic drugs », *Cancer Res.*, vol. 56, n° 1, p. 58–65, 1996.
- [114] Y. Miyoshi, A. Ando, Y. Takamura, T. Taguchi, Y. Tamaki, et S. Noguchi, « Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues », *Int. J. Cancer*, vol. 97, n° 1, p. 129–132, 2002.
- [115] C. Martínez, E. García-Martín, R. M. Pizarro, F. J. García-Gamito, et J. A. G. Agúndez, « Expression of paclitaxel-inactivating CYP3A activity in human colorectal cancer: implications for drug therapy », *Br. J. Cancer*, vol. 87, n° 6, p. 681–686, sept. 2002.
- [116] A. Beck *et al.*, « A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil », *Eur. J. Cancer*, vol. 30, n° 10, p. 1517–1522, 1994.
- [117] M. E. Nita, O. Tominaga, H. Nagawa, T. Tsuruo, et T. Muto, « Dihydropyrimidine dehydrogenase but not thymidylate synthase expression is associated with resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer. », *Hepatogastroenterology.*, vol. 45, n° 24, p. 2117–2122, 1997.
- [118] M. C. Etienne *et al.*, « Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. », *J. Clin. Oncol.*, vol. 13, n° 7, p. 1663–1670, 1995.
- [119] D. Salonga *et al.*, « Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase », *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, n° 4, p. 1322–1327, 2000.
- [120] L. Dean, « Fluorouracil Therapy and DPYD Genotype », in *Medical Genetics Summaries*, V. Pratt, H. McLeod, L. Dean, A. Malheiro, et W. Rubinstein, Éd. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2012.
- [121] L. Iyer *et al.*, « Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. », *J. Clin. Invest.*, vol. 101, n° 4, p. 847, 1998.
- [122] J. Cummings *et al.*, « Glucuronidation as a Mechanism of Intrinsic Drug Resistance in Human Colon Cancer Reversal of Resistance by Food Additives », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 23, p. 8443–8450, 2003.
- [123] T. Takahashi, Y. Fujiwara, M. Yamakido, O. Katoh, H. Watanabe, et P. I. Mackenzie, « The Role of Glucuronidation in 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin Resistance in vitro », *Jpn. J. Cancer Res.*, vol. 88, n° 12, p. 1211–1217, 1997.
- [124] D. M Townsend et K. Tew, *Townsend, D. M. & Tew, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. Oncogene 22, 7369-7375*, vol. 22. 2003.
- [125] M. M. Gottesman, T. Fojo, et S. E. Bates, « Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, n° 1, p. 48–58, 2002.
- [126] D. R. Ferry, M. A. Russell, et M. H. Cullen, « P-glycoprotein possesses a 1, 4-dihydropyridine-selective drug acceptor site which is allosterically coupled to a vinca-alkaloid-selective binding site », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 188, n° 1, p. 440–445, 1992.

- [127] M. M. Gottesman et I. Pastan, « Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 62, n° 1, p. 385–427, 1993.
- [128] M. F. Rosenberg, R. Callaghan, R. C. Ford, et C. F. Higgins, « Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 16, p. 10685–10694, 1997.
- [129] C. M. Armstrong et A. C. Gao, « Drug resistance in castration resistant prostate cancer: resistance mechanisms and emerging treatment strategies », *Am. J. Clin. Exp. Urol.*, vol. 3, n° 2, p. 64, 2015.
- [130] A. J. O'Neill *et al.*, « Characterisation and manipulation of docetaxel resistant prostate cancer cell lines », *Mol. Cancer*, vol. 10, p. 126, 2011.
- [131] Y. Zhu *et al.*, « Inhibition of ABCB1 expression overcomes acquired docetaxel resistance in prostate cancer », *Mol. Cancer Ther.*, vol. 12, n° 9, p. 1829, sept. 2013.
- [132] Y. Zhu, C. Liu, C. Armstrong, W. Lou, A. Sandher, et A. C. Gao, « Anti-androgens inhibit ABCB1 efflux and ATPase activity and reverse docetaxel resistance in advanced prostate cancer », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 21, n° 18, p. 4133, sept. 2015.
- [133] P. M. Fracasso *et al.*, « Phase I study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar, in resistant malignancies », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 10, n° 21, p. 7220-7228, nov. 2004.
- [134] L. van Zuylen *et al.*, « Disposition of docetaxel in the presence of P-glycoprotein inhibition by intravenous administration of R101933 », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 38, n° 8, p. 1090-1099, mai 2002.
- [135] A. P. Lombard *et al.*, « ABCB1 Mediates Cabazitaxel–Docetaxel Cross-Resistance in Advanced Prostate Cancer », *Mol. Cancer Ther.*, juill. 2017.
- [136] Y. Xie *et al.*, « 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, n° 6, p. 3349-3356, août 2008.
- [137] N. A. Colabufo *et al.*, « Bicalutamide failure in prostate cancer treatment: Involvement of Multi Drug Resistance proteins », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 601, n° 1, p. 38-42, déc. 2008.
- [138] K.-A. Kim, Y.-J. Cha, H.-M. Lee, H.-J. Joo, et J.-Y. Park, « Effects of the ABCG2 and ABCB1 drug transporter polymorphisms on the pharmacokinetics of bicalutamide in humans », *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 438, p. 7-11, janv. 2015.
- [139] T. M. Sissung *et al.*, « ABCB1 genetic variation influences the toxicity and clinical outcome of patients with androgen independent prostate cancer treated with docetaxel », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 14, n° 14, p. 4543-4549, juill. 2008.
- [140] T.-C. Hsia, C.-C. Lin, J.-J. Wang, S.-T. Ho, et A. Kao, « Relationship between chemotherapy response of small cell lung cancer and P-glycoprotein or multidrug resistance-related protein expression », *Lung*, vol. 180, n° 3, p. 173-179, 2002.
- [141] K. Nooter *et al.*, « Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 7, n° 1, p. 75-81, janv. 1996.
- [142] « MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines », *Publ. Online 15 August 2000 Doi101038sjpcan4500394*, vol. 3, n° 2, août 2000.
- [143] M. J. Grzywacz, J.-M. Yang, et W. N. Hait, « Effect of the Multidrug Resistance Protein on the Transport of the Antiandrogen Flutamide », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 10, p. 2492-2498, mai 2003.

- [144] P. Germain, B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding, et V. Laudet, « Overview of nomenclature of nuclear receptors », *Pharmacol. Rev.*, vol. 58, n° 4, p. 685–704, 2006.
- [145] S. M. Hollenberg *et al.*, « Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA », *Nature*, vol. 318, n° 6047, p. 635–641, 1985.
- [146] M. Petkovich, N. J. Brand, A. Krust, et P. Chambon, « A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors », *Nature*, vol. 330, n° 6147, p. 444–450, 1987.
- [147] S. A. Kliewer, J. M. Lehmann, et T. M. Willson, « Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse », *Science*, vol. 284, n° 5415, p. 757–760, 1999.
- [148] Y. Li, M. H. Lambert, et H. E. Xu, « Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics », *Structure*, vol. 11, n° 7, p. 741–746, 2003.
- [149] A. Chawla, J. J. Repa, R. M. Evans, et D. J. Mangelsdorf, « Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files », *Science*, vol. 294, n° 5548, p. 1866–1870, 2001.
- [150] C. Raynal, *Etude du rôle du récepteur des xénobiotiques PXR dans la réponse à la chimiothérapie du cancer colorectal*. Montpellier 1, 2009.
- [151] B. Blumberg *et al.*, « BXR, an embryonic orphan nuclear receptor activated by a novel class of endogenous benzoate metabolites », *Genes Dev.*, vol. 12, n° 9, p. 1269–1277, 1998.
- [152] S. A. Kliewer *et al.*, « An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway », *Cell*, vol. 92, n° 1, p. 73–82, 1998.
- [153] B. Blumberg *et al.*, « SXR, a novel steroid and xenobioticsensing nuclear receptor », *Genes Dev.*, vol. 12, n° 20, p. 3195–3205, 1998.
- [154] G. Bertilsson *et al.*, « Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, n° 21, p. 12208–12213, 1998.
- [155] J. M. Lehmann, D. D. McKee, M. A. Watson, T. M. Willson, J. T. Moore, et S. A. Kliewer, « The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. », *J. Clin. Invest.*, vol. 102, n° 5, p. 1016, 1998.
- [156] M. Baes, T. Gulick, H. S. Choi, M. G. Martinoli, D. Simha, et D. D. Moore, « A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, n° 3, p. 1544–1552, 1994.
- [157] P. Honkakoski, I. Zelko, T. Sueyoshi, et M. Negishi, « The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, n° 10, p. 5652–5658, 1998.
- [158] Y.-M. Wang, S. S. Ong, S. C. Chai, et T. Chen, « Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism », *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 8, n° 7, p. 803–817, juill. 2012.
- [159] R. E. Watkins *et al.*, « The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity », *Science*, vol. 292, n° 5525, p. 2329–2333, 2001.
- [160] J. Orans, D. G. Teotico, et M. R. Redinbo, « The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: recent insights and new challenges », *Mol. Endocrinol.*, vol. 19, n° 12, p. 2891–2900, 2005.
- [161] M. Saradhi, A. Sengupta, G. Mukhopadhyay, et R. K. Tyagi, « Pregnane and Xenobiotic Receptor (PXR/SXR) resides predominantly in the nuclear compartment of the interphase cell and associates with the condensed chromosomes during mitosis », *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.*, vol. 1746, n° 2, p. 85–94, 2005.
- [162] H. Li et H. Wang, « Activation of xenobiotic receptors: driving into the nucleus », *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 6, n° 4, p. 409–426, 2010.

- [163] D. D. Moore *et al.*, « International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor α , farnesoid X receptor β , liver X receptor α , liver X receptor β , and vitamin D receptor », *Pharmacol. Rev.*, vol. 58, n° 4, p. 742–759, 2006.
- [164] N. Scheer *et al.*, « A novel panel of mouse models to evaluate the role of human pregnane X receptor and constitutive androstane receptor in drug response », *J. Clin. Invest.*, vol. 118, n° 9, p. 3228–3239, 2008.
- [165] J. Y. Cui, S. S. Gunewardena, C. E. Rockwell, et C. D. Klaassen, « ChIPing the cistrome of PXR in mouse liver », *Nucleic Acids Res.*, p. gkq654, 2010.
- [166] S. R. Faucette, T. Sueyoshi, C. M. Smith, M. Negishi, E. L. LeCluyse, et H. Wang, « Differential regulation of hepatic CYP2B6 and CYP3A4 genes by constitutive androstane receptor but not pregnane X receptor », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 317, n° 3, p. 1200–1209, 2006.
- [167] W. Xie *et al.*, « Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR », *Genes Dev.*, vol. 14, n° 23, p. 3014–3023, 2000.
- [168] B. Goodwin, E. Hodgson, D. J. D’Costa, G. R. Robertson, et C. Liddle, « Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor », *Mol. Pharmacol.*, vol. 62, n° 2, p. 359–365, 2002.
- [169] C. Handschin et U. A. Meyer, « Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors », *Pharmacol. Rev.*, vol. 55, n° 4, p. 649–673, déc. 2003.
- [170] A. H. Tolson et H. Wang, « Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, n° 13, p. 1238–1249, oct. 2010.
- [171] N. Hariparsad *et al.*, « Identification of pregnane-X receptor target genes and coactivator and corepressor binding to promoter elements in human hepatocytes », *Nucleic Acids Res.*, p. gkn1047, 2009.
- [172] H. Zaher, T. J. Yang, H. V. Gelboin, P. Fernandez-Salguero, et F. J. Gonzalez, « Effect of Phenobarbital on Hepatic CYP1A1 and CYP1A2 in the Ahr-Null Mouse », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 55, n° 2, p. 235–238, janv. 1998.
- [173] K. Yoshinari, N. Yoda, T. Toriyabe, et Y. Yamazoe, « Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 5'-flanking region », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 79, n° 2, p. 261–269, 2010.
- [174] J. Sugatani *et al.*, « The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR », *Hepatology*, vol. 33, n° 5, p. 1232–1238, 2001.
- [175] W. Xie *et al.*, « Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 7, p. 4150–4155, avr. 2003.
- [176] O. Burk, K. A. Arnold, A. Geick, H. Tegude, et M. Eichelbaum, « A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression », *Biol. Chem.*, vol. 386, n° 6, p. 503–513, 2005.
- [177] A. Geick, M. Eichelbaum, et O. Burk, « Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 18, p. 14581–14587, 2001.
- [178] H. R. Kast *et al.*, « Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 4, p. 2908–2915, 2002.
- [179] X. C. Kretschmer et W. S. Baldwin, « CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters? », *Chem. Biol. Interact.*, vol. 155, n° 3, p. 111–128, 2005.

- [180] S. S. Ong, S. C. Chai, T. Chen, et Y.-M. Wang, *Pregnane X receptor in drug development*. INTECH Open Access Publisher, 2011.
- [181] J. L. Staudinger *et al.*, « The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, n° 6, p. 3369–3374, 2001.
- [182] W. Mnif *et al.*, « Estrogens and antiestrogens activate hPXR », *Toxicol. Lett.*, vol. 170, n° 1, p. 19–29, 2007.
- [183] N. Landes *et al.*, « Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 65, n° 2, p. 269–273, 2003.
- [184] C. Zhou, M. M. Tabb, A. Sadatrafiey, F. Grün, et B. Blumberg, « Tocotrienols activate the steroid and xenobiotic receptor, SXR, and selectively regulate expression of its target genes », *Drug Metab. Dispos.*, vol. 32, n° 10, p. 1075–1082, 2004.
- [185] M. M. Tabb *et al.*, « Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 45, p. 43919–43927, 2003.
- [186] D. Kluth, A. Banning, I. Paur, R. Blomhoff, et R. Brigelius-Flohé, « Modulation of pregnane X receptor-and electrophile responsive element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 42, n° 3, p. 315–325, févr. 2007.
- [187] L. B. Moore *et al.*, « St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, n° 13, p. 7500–7502, 2000.
- [188] I. Dussault, M. Lin, K. Hollister, E. H. Wang, T. W. Synold, et B. M. Forman, « Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 36, p. 33309–33312, 2001.
- [189] T. M. Willson et S. A. Kliewer, « PXR, CAR and drug metabolism », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, n° 4, p. 259–266, avr. 2002.
- [190] S. Harmsen, I. Meijerman, R. F. Maas-Bakker, J. H. Beijnen, et J. H. M. Schellens, « PXR-mediated P-glycoprotein induction by small molecule tyrosine kinase inhibitors », *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, vol. 48, n° 4–5, p. 644–649, mars 2013.
- [191] T. W. Synold, I. Dussault, et B. M. Forman, « The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux », *Nat. Med.*, vol. 7, n° 5, p. 584–590, 2001.
- [192] C. Zhou *et al.*, « The dietary isothiocyanate sulforaphane is an antagonist of the human steroid and xenobiotic nuclear receptor », *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, n° 1, p. 220–229, 2007.
- [193] A. Takeshita, M. Taguchi, N. Koibuchi, et Y. Ozawa, « Putative role of the orphan nuclear receptor SXR (steroid and xenobiotic receptor) in the mechanism of CYP3A4 inhibition by xenobiotics », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 36, p. 32453–32458, 2002.
- [194] H. Li *et al.*, « Novel Yeast-based Strategy Unveils Antagonist Binding Regions on the Nuclear Xenobiotic Receptor PXR », *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n° 19, p. 13655, mai 2013.
- [195] I. Fuchs *et al.*, « Effect of the CYP3A inhibitor ketoconazole on the PXR-mediated induction of CYP3A activity », *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 69, n° 3, p. 507–513, mars 2013.
- [196] B. C. Das *et al.*, « Synthesis of novel ketoconazole derivatives as inhibitors of the human Pregnane X Receptor (PXR; NR1I2; also termed SXR, PAR) », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, n° 14, p. 3974–3977, juill. 2008.
- [197] M. Venkatesh *et al.*, « In Vivo and In Vitro Characterization of a First-in-Class Novel Azole Analog That Targets Pregnane X Receptor Activation », *Mol. Pharmacol.*, vol. 80, n° 1, p. 124, juill. 2011.

- [198] S. C. Chai, M. T. Cherian, Y.-M. Wang, et T. Chen, « Small-molecule modulators of PXR and CAR », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1859, n° 9, p. 1141, sept. 2016.
- [199] S. Mani, W. Dou, et M. R. Redinbo, « PXR antagonists and implication in drug metabolism », *Drug Metab. Rev.*, vol. 45, n° 1, p. 60-72, févr. 2013.
- [200] C. Zhou, N. King, K. Y. Chen, et J. L. Breslow, « Activation of PXR induces hypercholesterolemia in wild-type and accelerates atherosclerosis in apoE deficient mice », *J. Lipid Res.*, vol. 50, n° 10, p. 2004-2013, 2009.
- [201] D. Lütjohann *et al.*, « Influence of rifampin on serum markers of cholesterol and bile acid synthesis in men. », *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 42, n° 6, p. 307-313, 2004.
- [202] J. M. Eiris *et al.*, « Effects of long-term treatment with antiepileptic drugs on serum lipid levels in children with epilepsy », *Neurology*, vol. 45, n° 6, p. 1155-1157, 1995.
- [203] S. P. Saini *et al.*, « A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification », *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, n° 2, p. 292-300, 2004.
- [204] J. Sonoda, W. Xie, J. M. Rosenfeld, J. L. Barwick, P. S. Guzelian, et R. M. Evans, « Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR) », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, n° 21, p. 13801-13806, 2002.
- [205] M. Wagner *et al.*, « CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice », *Hepatology*, vol. 42, n° 2, p. 420-430, 2005.
- [206] Y. Zhai, H. V. Pai, J. Zhou, J. A. Amico, R. R. Vollmer, et W. Xie, « Activation of pregnane X receptor disrupts glucocorticoid and mineralocorticoid homeostasis », *Mol. Endocrinol.*, vol. 21, n° 1, p. 138-147, 2007.
- [207] S. Kodama, R. Moore, Y. Yamamoto, et M. Negishi, « Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene », *Biochem. J.*, vol. 407, n° 3, p. 373-381, 2007.
- [208] Y. Konno, M. Negishi, et S. Kodama, « The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism », *Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 23, n° 1, p. 8-13, 2008.
- [209] Y. Uno *et al.*, « Characterization of six base pair deletion in the putative HNF1-binding site of human PXR promoter », *J. Hum. Genet.*, vol. 48, n° 11, p. 594-597, 2003.
- [210] J. Lamba, V. Lamba, S. Strom, R. Venkataramanan, et E. Schuetz, « Novel single nucleotide polymorphisms in the promoter and intron 1 of human pregnane X receptor/NR1I2 and their association with CYP3A4 expression », *Drug Metab. Dispos.*, vol. 36, n° 1, p. 169-181, 2008.
- [211] R. D. Patel, B. D. Hollingshead, C. J. Omiecinski, et G. H. Perdew, « Aryl-hydrocarbon receptor activation regulates constitutive androstane receptor levels in murine and human liver », *Hepatology*, vol. 46, n° 1, p. 209-218, 2007.
- [212] N. Iwazaki *et al.*, « Involvement of hepatocyte nuclear factor 4alpha in transcriptional regulation of the human pregnane X receptor gene in the human liver », *Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 23, n° 1, p. 59-66, 2008.
- [213] J. M. Pascussi *et al.*, « Differential regulation of constitutive androstane receptor expression by hepatocyte nuclear factor4a isoforms », *Hepatology*, vol. 45, n° 5, p. 1146-1153, 2007.
- [214] A. Misawa *et al.*, « Methylation-associated silencing of the nuclear receptor 1I2 gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 22, p. 10233-10242, 2005.
- [215] W. Habano *et al.*, « Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells », *BMC Cancer*, vol. 11, p. 81, 2011.

- [216] M. Yang et J. Y. Park, « DNA methylation in promoter region as biomarkers in prostate cancer », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 863, p. 67-109, 2012.
- [217] S. Takagi, M. Nakajima, T. Mohri, et T. Yokoi, « Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4 », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 15, p. 9674–9680, 2008.
- [218] Y. Fujita *et al.*, « MiR-148a Attenuates Paclitaxel Resistance of Hormone-refractory, Drug-resistant Prostate Cancer PC3 Cells by Regulating MSK1 Expression », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 25, p. 19076-19084, juin 2010.
- [219] S. R. Pondugula, C. Brimer-Cline, J. Wu, E. G. Schuetz, R. K. Tyagi, et T. Chen, « A phosphomimetic mutation at threonine-57 abolishes transactivation activity and alters nuclear localization pattern of human pregnane x receptor », *Drug Metab. Dispos.*, vol. 37, n° 4, p. 719–730, 2009.
- [220] X. Ding et J. L. Staudinger, « Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 69, n° 5, p. 867-873, mars 2005.
- [221] H. Masuyama, H. Inoshita, Y. Hiramatsu, et T. Kudo, « Ligands have various potential effects on the degradation of pregnane X receptor by proteasome », *Endocrinology*, vol. 143, n° 1, p. 55–61, 2002.
- [222] H. Masuyama, N. Suwaki, Y. Tateishi, H. Nakatsukasa, T. Segawa, et Y. Hiramatsu, « The pregnane X receptor regulates gene expression in a ligand-and promoter-selective fashion », *Mol. Endocrinol.*, vol. 19, n° 5, p. 1170–1180, 2005.
- [223] W. Cui, M. Sun, N. Galeva, T. D. Williams, Y. Azuma, et J. L. Staudinger, « SUMOylation and Ubiquitylation Circuitry Controls Pregnane X Receptor Biology in Hepatocytes », *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, vol. 43, n° 9, p. 1316-1325, sept. 2015.
- [224] D. Pasquel *et al.*, « Acetylation of lysine 109 modulates pregnane X receptor DNA binding and transcriptional activity », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1859, n° 9, p. 1155-1169, 2016.
- [225] S. R. Pondugula, P. Pavek, et S. Mani, « Pregnane X Receptor and Cancer: Context-Specificity is Key », *Nucl. Recept. Res.*, vol. 3, juin 2016.
- [226] Y. Niu *et al.*, « Activated pregnane X receptor inhibits cervical cancer cell proliferation and tumorigenicity by inducing G2/M cell-cycle arrest », *Cancer Lett.*, vol. 347, n° 1, p. 88-97, mai 2014.
- [227] N. Ouyang *et al.*, « Pregnane X receptor suppresses proliferation and tumourigenicity of colon cancer cells », *Br. J. Cancer*, vol. 102, n° 12, p. 1753–1761, 2010.
- [228] H. Wang *et al.*, « Pregnane X receptor activation induces FGF19-dependent tumor aggressiveness in humans and mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 121, n° 8, p. 3220, août 2011.
- [229] Y. Chen, Y. Tang, S. Chen, et D. Nie, « Regulation of drug resistance by human pregnane X receptor in breast cancer », *Cancer Biol. Ther.*, vol. 8, n° 13, p. 1265, juill. 2009.
- [230] E.-Q. Qiao et H.-J. Yang, « Effect of pregnane X receptor expression on drug resistance in breast cancer », *Oncol. Lett.*, vol. 7, n° 4, p. 1191, avr. 2014.
- [231] C. Raynal *et al.*, « Pregnane X Receptor (PXR) expression in colorectal cancer cells restricts irinotecan chemosensitivity through enhanced SN-38 glucuronidation », *Mol. Cancer*, vol. 9, p. 46, 2010.
- [232] A. Basseville *et al.*, « Irinotecan induces steroid and xenobiotic receptor (SXR) signaling to detoxification pathway in colon cancer cells », *Mol. Cancer*, vol. 10, p. 80, 2011.

- [233] S. Harmsen, I. Meijerman, J. H. Beijnen, et J. H. M. Schellens, « Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 64, n° 1, p. 35-43, juin 2009.
- [234] S. Harmsen, I. Meijerman, C. L. Febus, R. F. Maas-Bakker, J. H. Beijnen, et J. H. M. Schellens, « PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 66, n° 4, p. 765-771, sept. 2010.
- [235] H.-J. Guchelaar, C. H. H. Ten Napel, E. G. E. de Vries, et N. H. Mulder, « Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: A review », *Clin. Oncol.*, vol. 6, n° 1, p. 40-48, janv. 1994.
- [236] R. Roskoski, « A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors », *Pharmacol. Res.*, vol. 100, n° Supplement C, p. 1-23, oct. 2015.
- [237] J.-L. Merlin, « Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie », *Lett. Pharmacol.*, vol. 22, n° 2, p. 51-62, 2008.
- [238] D. A. Walsh, J. P. Perkins, et E. G. Krebs, « An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle », *J. Biol. Chem.*, vol. 243, n° 13, p. 3763-3765, juill. 1968.
- [239] P. Cohen, « The origins of protein phosphorylation », *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, n° 5, p. E127-130, mai 2002.
- [240] C. Neul, E. Schaeffeler, A. Sparreboom, S. Laufer, M. Schwab, et A. T. Nies, « Impact of Membrane Drug Transporters on Resistance to Small-Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 37, n° 11, p. 904-932, nov. 2016.
- [241] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, et S. Sudarsanam, « The protein kinase complement of the human genome », *Science*, vol. 298, n° 5600, p. 1912-1934, 06 2002.
- [242] D. R. Knighton *et al.*, « Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase », *Science*, vol. 253, n° 5018, p. 407-414, juill. 1991.
- [243] S. Boutayeb *et al.*, « [Protein tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy] », *Pathol. Biol. (Paris)*, vol. 60, n° 4, p. 229-233, août 2012.
- [244] B. W. Murray et N. Miller, « Durability of Kinase-Directed Therapies--A Network Perspective on Response and Resistance », *Mol. Cancer Ther.*, vol. 14, n° 9, p. 1975-1984, sept. 2015.
- [245] M. Juchum, M. Günther, et S. A. Laufer, « Fighting cancer drug resistance: Opportunities and challenges for mutation-specific EGFR inhibitors », *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.*, vol. 20, p. 12-28, mai 2015.
- [246] S. Soverini *et al.*, « Contribution of ABL Kinase Domain Mutations to Imatinib Resistance in Different Subsets of Philadelphia-Positive Patients: By the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia », *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, n° 24, p. 7374-7379, déc. 2006.
- [247] N. Wagle *et al.*, « Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling », *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, n° 22, p. 3085-3096, août 2011.
- [248] M. K. Callahan *et al.*, « Progression of RAS-Mutant Leukemia during RAF Inhibitor Treatment », *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, n° 24, p. 2316-2321, déc. 2012.
- [249] P. Wu, T. E. Nielsen, et M. H. Clausen, « FDA-approved small-molecule kinase inhibitors », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 36, n° 7, p. 422-439, juill. 2015.

- [250] M. Bacarani, F. Castagnetti, G. Gugliotta, et G. Rosti, « A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML », *Ann. Hematol.*, vol. 94 Suppl 2, p. S141-147, avr. 2015.
- [251] Z. Eroglu et A. Ribas, « Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy », *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 8, n° 1, p. 48-56, janv. 2016.
- [252] A. Gater *et al.*, « Adherence to oral tyrosine kinase inhibitor therapies in chronic myeloid leukemia », *Leuk. Res.*, vol. 36, n° 7, p. 817-825, juill. 2012.
- [253] L. Wood, « A review on adherence management in patients on oral cancer therapies », *Eur. J. Oncol. Nurs.*, vol. 16, n° 4, p. 432-438, sept. 2012.
- [254] S. Antoun, V. E. Baracos, L. Birdsell, B. Escudier, et M. B. Sawyer, « Low body mass index and sarcopenia associated with dose-limiting toxicity of sorafenib in patients with renal cell carcinoma », *Ann. Oncol.*, vol. 21, n° 8, p. 1594-1598, août 2010.
- [255] O. Huillard *et al.*, « Sarcopenia and body mass index predict sunitinib-induced early dose-limiting toxicities in renal cancer patients », *Br. J. Cancer*, vol. 108, n° 5, p. 1034-1041, mars 2013.
- [256] M. H. M. Diekstra *et al.*, « CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms as predictors for sunitinib outcome in metastatic renal cell carcinoma », *Eur. Urol.*, vol. 68, n° 4, p. 621-629, oct. 2015.
- [257] P. Boudou-Rouquette *et al.*, « Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study », *PLoS One*, vol. 7, n° 8, p. e42875, 2012.
- [258] N. Thatcher *et al.*, « Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer) », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 366, n° 9496, p. 1527-1537, nov. 2005.
- [259] H.-J. Klümper, C. F. Samer, R. H. J. Mathijssen, J. H. M. Schellens, et H. Gurney, « Moving towards dose individualization of tyrosine kinase inhibitors », *Cancer Treat. Rev.*, vol. 37, n° 4, p. 251-260, juin 2011.
- [260] D. R. Duckett et M. D. Cameron, « Metabolism considerations for kinase inhibitors in cancer treatment », *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 6, n° 10, p. 1175-1193, oct. 2010.
- [261] T. Illmer *et al.*, « P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate », *Leukemia*, vol. 18, n° 3, p. 401-408, mars 2004.
- [262] J. Thomas, L. Wang, R. E. Clark, et M. Pirmohamed, « Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance », *Blood*, vol. 104, n° 12, p. 3739-3745, déc. 2004.
- [263] C. Hegedüs *et al.*, « Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties: Interaction of Bcr-Abl inhibitors and MDR-ABC proteins », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 158, n° 4, p. 1153-1164, oct. 2009.
- [264] J. Deng, J. Shao, J. S. Markowitz, et G. An, « ABC Transporters in Multi-Drug Resistance and ADME-Tox of Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors », *Pharm. Res.*, vol. 31, n° 9, p. 2237-2255, sept. 2014.
- [265] C. E. Geyer *et al.*, « Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, n° 26, p. 2733-2743, déc. 2006.

- [266] K. Yanase, S. Tsukahara, S. Asada, E. Ishikawa, Y. Imai, et Y. Sugimoto, « Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance », *Mol. Cancer Ther.*, vol. 3, n° 9, p. 1119-1125, sept. 2004.
- [267] Z. Shi *et al.*, « Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 22, p. 11012-11020, nov. 2007.
- [268] D. K. Hiwase, D. White, S. Zrim, V. Saunders, J. V. Melo, et T. P. Hughes, « Nilotinib-mediated inhibition of ABCB1 increases intracellular concentration of dasatinib in CML cells: implications for combination TKI therapy », *Leukemia*, vol. 24, n° 3, p. 658-660, mars 2010.
- [269] D. L. White, V. A. Saunders, S. R. Quinn, P. W. Manley, et T. P. Hughes, « Imatinib increases the intracellular concentration of nilotinib, which may explain the observed synergy between these drugs », *Blood*, vol. 109, n° 8, p. 3609-3610, avr. 2007.
- [270] H. Burger *et al.*, « Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps », *Cancer Biol. Ther.*, vol. 4, n° 7, p. 747-752, juill. 2005.
- [271] N. Anreddy, P. Gupta, R. J. Kathawala, A. Patel, J. N. D. Wurlpel, et Z.-S. Chen, « Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance », *Mol. Basel Switz.*, vol. 19, n° 9, p. 13848-13877, 2014.
- [272] M. E. Kaighn, K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, et L. W. Jones, « Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). », *Invest. Urol.*, vol. 17, n° 1, p. 16-23, 1979.
- [273] K. R. Stone, D. D. Mickey, H. Wunderli, G. H. Mickey, et D. F. Paulson, « Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145) », *Int. J. Cancer*, vol. 21, n° 3, p. 274-281, 1978.
- [274] J. Veldscholte *et al.*, « A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human INCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 173, n° 2, p. 534-540, 1990.
- [275] A. van Bokhoven *et al.*, « Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines », *The Prostate*, vol. 57, n° 3, p. 205-225, 2003.
- [276] Y. Li, S. C. Chan, L. J. Brand, T. H. Hwang, K. A. Silverstein, et S. M. Dehm, « Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines », *Cancer Res.*, vol. 73, n° 2, p. 483-489, 2013.
- [277] J. Lehár *et al.*, « Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity », *Nat. Biotechnol.*, vol. 27, n° 7, p. 659-666, juill. 2009.
- [278] T. Fujimura *et al.*, « Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer », *Urology*, vol. 74, n° 2, p. 391-397, août 2009.
- [279] M.-J. Marion, O. Hantz, et D. Durantel, « The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 640, p. 261-272, 2010.
- [280] B. Rochat, J. M. Morsman, G. I. Murray, W. D. Figg, et H. L. McLeod, « Human CYP1B1 and anticancer agent metabolism: mechanism for tumor-specific drug inactivation? », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 296, n° 2, p. 537-541, 2001.
- [281] G. Gordon Gibson, A. Phillips, S. Aouabdi, K. Plant, et N. Plant, « Transcriptional regulation of the human pregnane-X receptor », *Drug Metab. Rev.*, vol. 38, n° 1-2, p. 31-49, 2006.
- [282] S. Kumar, B. Jaiswal, S. Kumar, S. Negi, et R. K. Tyagi, « Cross-talk between androgen receptor and pregnane and xenobiotic receptor reveals existence of a novel

- modulatory action of anti-androgenic drugs », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 80, n° 7, p. 964-976, oct. 2010.
- [283] A. K. MacLeod, L. A. McLaughlin, C. J. Henderson, et C. R. Wolf, « Activation status of the pregnane X receptor influences vemurafenib availability in humanized mouse models », *Cancer Res.*, vol. 75, n° 21, p. 4573-4581, nov. 2015.
- [284] G. Gravis *et al.*, « Results from a monocentric phase II trial of erlotinib in patients with metastatic prostate cancer », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO*, vol. 19, n° 9, p. 1624-1628, sept. 2008.
- [285] J. B. Aragon-Ching *et al.*, « Final Analysis Of A Phase II Trial Using Sorafenib For Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer », *BJU Int.*, vol. 103, n° 12, p. 1636, juin 2009.
- [286] M. L. Gonzalgo, C. P. Pavlovich, S. M. Lee, et W. G. Nelson, « Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 9, n° 7, p. 2673-2677, juill. 2003.
- [287] G. J. van Steenbrugge, C. J. van Uffelen, J. Bolt, et F. H. Schröder, « The human prostatic cancer cell line LNCaP and its derived sublines: an in vitro model for the study of androgen sensitivity », *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 40, n° 1-3, p. 207-214, 1991.
- [288] P. Saxena *et al.*, « PSA regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells », *The Prostate*, vol. 72, n° 7, p. 769-776, mai 2012.
- [289] J. F. Deeken, J. H. Beumer, N. M. Anders, T. Wanjiku, M. Rusnak, et M. A. Rudek, « Preclinical assessment of the interactions between the antiretroviral drugs, ritonavir and efavirenz, and the tyrosine kinase inhibitor erlotinib », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 76, n° 4, p. 813-819, oct. 2015.
- [290] H. Ellens, M. Johnson, S. K. Lawrence, C. Watson, L. Chen, et L. E. Richards-Peterson, « Prediction of the Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction Potential of Dabrafenib and Its Major Circulating Metabolites », *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, vol. 45, n° 6, p. 646-656, juin 2017.
- [291] S. K. Lawrence, D. Nguyen, C. Bowen, L. Richards-Peterson, et K. W. Skordos, « The metabolic drug-drug interaction profile of Dabrafenib: in vitro investigations and quantitative extrapolation of the P450-mediated DDI risk », *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, vol. 42, n° 7, p. 1180-1190, juill. 2014.
- [292] A. Hamada *et al.*, « Effect of SLCO1B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 14, n° 11, p. 3312-3318, juin 2008.
- [293] R. A. Johnston, T. Rawling, T. Chan, F. Zhou, et M. Murray, « Selective inhibition of human solute carrier transporters by multikinase inhibitors », *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, vol. 42, n° 11, p. 1851-1857, nov. 2014.
- [294] M. Karlgren *et al.*, « Classification of Inhibitors of Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs): Influence of Protein Expression on Drug-Drug Interactions », *J. Med. Chem.*, vol. 55, n° 10, p. 4740-4763, mai 2012.
- [295] S. Wang *et al.*, « Afatinib reverses multidrug resistance in ovarian cancer via dually inhibiting ATP binding cassette subfamily B member 1 », *Oncotarget*, vol. 6, n° 28, p. 26142-26160, juill. 2015.
- [296] E. Speir, « Cytomegalovirus Gene Regulation by Reactive Oxygen Species: Agents in Atherosclerosis », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 899, n° 1, p. 363-374, janv. 2000.

- [297] P. Corazao-Rozas *et al.*, « Mitochondrial oxidative stress is the Achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor », *Oncotarget*, vol. 4, n° 11, p. 1986-1998, nov. 2013.
- [298] C. Planque *et al.*, « Pregnane X-receptor promotes stem cell-mediated colon cancer relapse », *Oncotarget*, vol. 7, n° 35, p. 56558-56573, juill. 2016.
- [299] R. K. Mittapalli, S. Vaidhyanathan, A. Z. Dudek, et W. F. Elmquist, « Mechanisms Limiting Distribution of the Threonine-Protein Kinase B-RaFV600E Inhibitor Dabrafenib to the Brain: Implications for the Treatment of Melanoma Brain Metastases », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 344, n° 3, p. 655-664, mars 2013.
- [300] S. Vaidhyanathan, R. K. Mittapalli, J. N. Sarkaria, et W. F. Elmquist, « Factors Influencing the CNS Distribution of a Novel MEK-1/2 Inhibitor: Implications for Combination Therapy for Melanoma Brain Metastases », *Drug Metab. Dispos.*, vol. 42, n° 8, p. 1292-1300, août 2014.
- [301] J.-G. Qiu *et al.*, « Trametinib modulates cancer multidrug resistance by targeting ABCB1 transporter », *Oncotarget*, vol. 6, n° 17, p. 15494-15509, avr. 2015.
- [302] N. R. Budha *et al.*, « Evaluation of Cytochrome P450 3A4-Mediated Drug-Drug Interaction Potential for Cobimetinib Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling and Simulation », *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 55, n° 11, p. 1435-1445, nov. 2016.

Résumé :

De plus en plus d'inhibiteurs de kinases (IKs) sont testés dans le cancer de la prostate qui représente chez l'homme un enjeu de santé publique majeur de par son incidence (1^{er} cancer) et sa mortalité (4^{ème} cancer). Les essais cliniques pour évaluer l'efficacité des IKs dans cette indication ont donné des résultats mitigés malgré la présence de leurs cibles pharmacologiques dans les tumeurs de prostate (VEGF, EGFR, CMET.), pouvant faire penser que l'inefficacité serait en partie liée à la molécule elle-même et à sa pharmacocinétique/pharmacodynamie. En effet, les IKs sont sujets à un métabolisme et un transport intense *via* des enzymes de phase I et II et des transporteurs contrôlés pour la majorité par le récepteur nucléaire PXR (*Pregnane X Receptor*, gène *NR1I2*). En plus d'être abondamment exprimé dans le foie et le long du tractus gastro-intestinal, PXR est également exprimé dans certaines tumeurs épithéliales et pourrait être impliqué dans la résistance aux chimiothérapies par augmentation du catabolisme et de l'efflux de ces agents anticancéreux. A ce jour une seule étude a révélé l'expression de PXR dans le cancer de la prostate sans en avoir évalué l'impact sur la réponse aux traitements utilisés dans cette indication. En collaboration avec le Pr G. Fromont, nous avons observé dans une cohorte de 449 patients que l'expression de PXR était plus fréquemment retrouvée dans les cancers résistants à la castration et les métastases, par rapport aux cancers cliniquement localisés dans lesquels l'expression de PXR était corrélée avec le stade TNM et le score ISUP. Ces résultats confirment donc l'intérêt d'étudier le rôle que peut jouer PXR et les gènes du métabolisme et du transport qu'il régule, dans la sensibilité aux IKs dans les cancers de la prostate.

Nous avons mesuré l'expression de PXR et de ses gènes cibles dans les lignées de cancer de la prostate 22RV1, LnCap, PC3 et DU145. Les résultats montrent une expression significative des enzymes et transporteurs responsables de la détoxification des IKs mais une faible expression de PXR liée à des phénomènes d'hyperméthylation *NR1I2* dans nos lignées. Cela nous a conduits à établir des modèles de surexpression stable de PXR dans lesquels l'agoniste SR12813 est capable d'induire l'activité transcriptionnelle de ce xénorécepteur, indiquant la compétence métabolique de ces lignées. À l'aide de ces modèles, nous avons démontré que la surexpression de PXR module la réponse à l'erlotinib, le dasatinib, le dabrafénib et l'afatinib démontrant que PXR joue un rôle fonctionnel dans la sensibilité à ces IKs. Nous avons également démontré que certains inhibiteurs avaient des propriétés agonistes de PXR, notamment le dabrafénib qui montre un effet agoniste plus marqué que le composé de référence SR12813, ce qui n'a jamais été démontré. Cette découverte originale nous a conduits à engager une collaboration pour tenter de cristalliser le complexe PXR/dabrafénib et à tester l'hypothèse que l'induction de l'activité PXR pouvait entraîner une modification du métabolisme et/ou du transport d'autres médicaments co-administrés. Or, nous avons observé dans la lignée 22RV1 un effet additif entre le dabrafénib et le tramétinib, une combinaison approuvée dans le traitement du mélanome, qui devient antagoniste lorsque PXR est surexprimé, résultat qui va effectivement dans le sens de notre hypothèse même s'il reste à démontrer que cet effet est bien lié à une altération du métabolisme de ces IKs, ce que nous sommes en train d'évaluer en dosant les métabolites de ces IKs.

L'ensemble de nos données pourraient servir de rationnel biologique dans le choix des IKs ou de leurs combinaisons à tester avec les hormonothérapies et chimiothérapies déjà utilisés dans le traitement du cancer de la prostate, afin de potentialiser la réponse tumorale.

Abstract :

More and more kinase inhibitors (KIs) are tested in prostate cancer that represents a major health issue in men with its incidence and mortality rates. Clinical trials to evaluate KIs efficacy in prostate cancer gave disappointing results despite the presence of KIs pharmacological targets in prostate tumors (VEGF, EGFR, CMET.), suggesting that inefficiency of these drugs would be at least in part linked to the inhibitor itself or its pharmacodynamics/pharmacokinetics parameters. Indeed KIs are metabolized and transported via phase I and II enzymes that are mainly controlled by the xenoreceptor PXR (*Pregnane X Receptor*, gène *NR1I2*). It is mainly expressed in liver and gastro-intestinal tract but also in epithelial tumors. PXR is also involved in the resistance to chemotherapies by increasing the catabolism and the efflux of these anticancer agents. To date only one study evaluated PXR expression in prostate cancer without evaluating its impact on treatment efficacy. In collaboration with Pr G. Fromont we analyzed a cohort of 449 prostate tumors and observed that PXR was more frequently detected in castration resistant or metastatic tumors as compared to clinically localized forms in which PXR expression was significantly correlated with TNM and ISUP Score. These results confirmed the interest to study the potential role of PXR and its target genes in the sensitivity to kinase inhibitors in prostate cancer models.

We measured the expression of PXR and its target genes in prostate cancer cell lines 22RV1, LnCap, PC3 and DU145. The results showed that enzymes and transporters involved in KI detoxification was significantly expressed in these cells whereas PXR was poorly expressed due to hypermethylation of *NR1I2* in our cells. This lead us to develop specific prostate cancer cell models stably overexpressing PXR in which transcriptional activity of PXR can be induced by its known agonist SR12813 further indicating that prostate cancer cells are metabolically competent. Using these models we showed that PXR overexpression modulates the sensitivity of 22RV1 cells to erlotinib, dasatinib, dabrafenib and afatinib, demonstrating that PXR plays a functional role in the sensitivity to KIs. We also demonstrated that several KIs were PXR agonists, including dabrafenib that displayed enhanced agonistic properties as compared to SR12813, a result that was never published before. This original finding led us to engage the cristalization of PXR/dabrafenib complex and to test whether induction of PXR could lead to an alteration of metabolism and transport of other drugs that are co-administered. In this line we have observed that in 22RV1 cells the additive effect of the combination of dabrafenib with trametinib that is already approved in the treatment of melanomas, became antagonistic when PXR was overexpressed in these cells. This result is supporting our hypothesis though we still need to demonstrate that this effect is linked to a change in drugs metabolism, which is currently under investigation by the measurement of the known metabolites of these KIs.

Altogether, our data could serve as rational basis for the choice of kinase inhibitors or their potential combinations that could be tested in further clinical trials alone or in association with hormone therapies or with chemotherapies that are currently prescribed in the treatment of advanced prostate cancers, in order to potentiate tumor response.