



HAL
open science

Approche radiosensibilisatrice de carbènes-Or associés aux irradiations dans des modèles cellulaires humains de tumeur prostatique

Judith Eguida

► **To cite this version:**

Judith Eguida. Approche radiosensibilisatrice de carbènes-Or associés aux irradiations dans des modèles cellulaires humains de tumeur prostatique. Cancer. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC123 . tel-04574180

HAL Id: tel-04574180

<https://theses.hal.science/tel-04574180>

Submitted on 14 May 2024

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ,
AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT

THÈSE

PRESENTÉE À L'UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

BIOLOGIE SANTÉ – SPECIALITÉ : GÉNÉTIQUE, PHYSIOLOGIE, PATHOLOGIES,
NUTRITION, MICROBIOLOGIE, SANTÉ, INNOVATION

DATE PRÉVUE DE SOUTENANCE : 1^{er} JUIN 2021

PAR

JUDITH EGUIDA

**Approche radiosensibilisatrice de carbènes-Or associés aux irradiations
dans des modèles cellulaires humains de tumeur prostatique**

RAPPORTEURS : Dr ANNE DEVIN, IBGC, Bordeaux
Dr NICOLAS FORAY, INSERM UMR1296, Lyon
Pr WALID RACHIDI, CEA, Grenoble

EXAMINATRICE: Dr AMALIA TROUSSON, GReD, Clermont-Ferrand

CO-ENCADRANTE : Dr ISABELLE BALANDIER, LPCplus, Clermont-Ferrand

DIRECTEUR DE THÈSE : Pr PATRICK VERNET, LPCplus, Clermont-Ferrand

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais exprimer ma gratitude envers les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie particulièrement le Professeur **Walid RACHIDI** d'avoir accepté de présider le jury. Je remercie également les rapporteurs : le Docteur **Anne DEVIN**, le Docteur **Nicolas FORAY**, ainsi que le Docteur **Amalia TROUSSON** en tant qu'examinatrice. Je vous remercie pour votre temps, votre analyse critique, pour nos échanges et vos différentes pistes à l'issue de la présentation de mes travaux.

J'aimerais également adresser mes sincères remerciements à mon Directeur de thèse, le Professeur **Patrick VERNET** pour m'avoir confié ce projet de thèse, mais également pour sa disponibilité, son aide et sa confiance. Je te remercie pour tes conseils, ta pédagogie, tes connaissances théoriques comme techniques, ton humanité et ton optimisme, qui ont permis le bon déroulement de ces travaux. Je te remercie pour l'autonomie que tu m'as donnée, ce qui m'a beaucoup apporté sur le plan professionnel mais aussi humain. Je te remercie également de m'avoir permis de valoriser mes études par des communications scientifiques. J'aimerais enfin te remercier pour le temps que tu as consacré dans la correction des diverses présentations ainsi que dans celle de mon manuscrit.

Toute ma gratitude va aussi vers ma co-encadrante, le Docteur **Isabelle BALANDIER**. Je tiens vivement à te remercier pour tes conseils, ton aide sur des questions théoriques comme pratiques, ton esprit critique et ta réactivité. Également, ton humanité, ton énergie et ton optimisme m'ont permis de tenir face aux différentes péripéties rencontrées pendant cette thèse. Merci aussi pour le temps que tu as consacré à la correction du manuscrit, mais aussi de toutes les présentations que j'ai pu faire.

J'aimerais remercier le Directeur du LPCplus, le Professeur **Dominique PALLIN** pour son accueil et aussi pour ses actions afin que ma thèse se déroule dans les meilleures conditions possibles.

J'aimerais remercier le LABEX PRIMES (ANR-11-LABX-0063) de l'Université de Lyon, qui a soutenu ce travail dans le cadre du programme "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) opéré par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

J'aimerais remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, le Docteur

Emmanuel CHAUTARD et le Docteur **Samuel LE GOFF** pour leur temps mais aussi pour l'intérêt et l'attention portés sur mes travaux ainsi que sur leur bon déroulement. Vos conseils et actions ont permis de déverrouiller certaines situations, et m'ont permis d'acquérir bien de notions théoriques et pratiques et d'aiguiser mes compétences d'analyse et de réflexion.

Un grand merci à ma marraine au LPCplus, le Docteur **Nicoleta PAUNA**. Merci d'avoir accepté d'être ma marraine. Merci pour tes conseils, ta positivité et tes actions. Tu m'as permis de tenir bon dans les moments difficiles et tes conseils m'ont permis de grandir sur plusieurs plans.

J'aimerais remercier le Docteur **Federico CISNETTI** et le Docteur **Arnaud GAUTIER** de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), pour leur participation à ces travaux. Merci de m'avoir fourni la molécule étudiée. J'aimerais également remercier le Professeur **Serge ALZIARI** et le Professeur **Gérard MONTAROU** pour leur disponibilité et leurs conseils d'expert. Toute ma gratitude au Docteur **Lydie COMBARET**, au Docteur **Isabelle JOUAN**, au Docteur **Ludovic BONHOMME** et au Docteur **Emmanuel BUSATO** pour leurs conseils et leur aide en Biostatistique. Merci à **Siet VAN DEN WILDENBERG** pour son aide dans la modélisation de certains de mes résultats. Merci à **Dominique BONNET** pour son temps et son aide lorsque mon matériel informatique m'a laissée tomber. J'aimerais également remercier le Docteur **Charles WHITE** du GReD pour son aide en Immunofluorescence. Merci à **Frédéric CHANDEZ** pour son aide dans le développement du logiciel d'analyse d'images de microscopie. Je tiens également à remercier **Hermine BILLARD** pour sa disponibilité, sa formation et ses conseils sur la cytométrie en flux. J'aimerais remercier le Docteur **Maud BOYET** et **Jean-Luc PIRO** du Laboratoire Magmas et Volcans, de m'avoir permis de réaliser mes expériences d'ICP-MS. Enfin, j'aimerais remercier le Professeur **Claude BEAUDOIN** et le Docteur **Pierre VAL** du GReD de m'avoir permis de réaliser des tests et ainsi de trier nos différentes cibles pour des expériences d'analyses protéiques. Merci à tous pour votre réactivité et vos conseils lors de nos différents échanges.

J'aimerais remercier toute l'équipe Radiobiologie - Intégrité des Génomes du LPCplus et plus particulièrement **Mathilde CHERON** et **Guillaume RIVRAIS** pour m'avoir épaulée lors de cette aventure. Merci pour votre aide, votre disponibilité, votre réactivité, votre esprit d'équipe et votre engagement. Merci également au Docteur **Frederic MOREL** pour sa disponibilité et son aide.

Merci à M. **Carlos D'ALMEIDA** de m'avoir accordé cette bourse d'études qui fut un des catalyseurs de cette merveilleuse aventure.

Je tiens également à remercier mon ancien maître de stage, le Docteur **Vincent HANOUX**. Je te remercie pour ta rigueur dans le travail et pour avoir valorisé les résultats issus de mon stage de deuxième année de Master par la publication d'un article.

Merci à **Amandine** (la blonde), **Amandine** (la brune), **Hoda, Layal, Lia** pour les pauses café/thé/ infusion qui étaient plus que des pauses. Merci à **Alice, Christophe, Marie-Eline, Benjamin, Loïc, Vanida, Marie-Helene, Marius, Simonc, Michel** et **Martine LACHENAL, Sixtine, M. Philippe DELAUNAY, Gaby**, et ma belle-famille pour votre soutien. Merci pour ces petites parenthèses et votre curiosité qui m'ont permis de voir mon sujet de thèse sous d'autres angles.

Un grand merci à ma famille : **mes parents, Jean-Luc, Merveille, Déborah, Pépé** et **Mémé IWOU**, mes **tatas** et **tontons**. Malgré la distance, vous avez toujours su être près, de diverses manières, pour me soutenir et m'encourager. Cet accomplissement est aussi le vôtre. Merveille, je te remercie pour tes encouragements et tes conseils. Nos discussions sur nos sujets respectifs furent très constructives. À mes parents qui m'ont appris l'amour du travail, la persévérance, la rigueur, la curiosité et qui m'ont donné cette part d'humain : merci !

Mon cher et tendre époux, Jordane, je ne saurais te remercier pour ta patience, ton soutien et ton encouragement sans failles. Tu as su m'aider à me relever, me booster dans les moments difficiles et me pousser encore plus tout le long de cette aventure. Merci pour ton optimisme et de me supporter. Nous avons pu ensemble voir l'évolution de cette thèse, mais aussi de notre vie ; cette dernière menant à la naissance de nos enfants Eliam et Naomie, mes collaborateurs des nuits blanches. Grâce à vous, j'ai su tenir. Je vous aime. Cette réussite, c'est aussi à vous que je la dois.

« *Ati deka me wona ave o* » (Seul, un arbre ne peut former une forêt).

Proverbe africain (cité en Éwé).

Liste des communications

Une partie des travaux a été présentée lors des congrès suivants :

- **Communications orales** :

- **Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE, Clermont-Ferrand (Octobre 2020)**

“Cellular and mitochondrial disturbances associated with X-rays radiations after prostate cancer cells incubation with Gold carbenes.”

- **Journée du GdR Mi2B, Nantes (Novembre 2019)**

“Le ciblage mitochondrial par des carbènes-or augmente-t-il les effets des irradiations X dans des cellules tumorales prostatiques? ”

- **Journée du Cancéropôle Grand Ouest – Niches et cancers, Nantes (Novembre 2017)**

“Le ciblage de la mitochondrie permet-il la radiosensibilisation de cellules tumorales prostatiques ? ”

- **4ème Edition du Colloque International de la Recherche Translationnelle en Nutrition Humaine (ICTRHN), Clermont-Ferrand (22-23 Juin 2017)**

“Mitochondria: new targets for human prostate cancer cells radiosensitization?”

- **Posters:**

- **Colloque International Marie Sklodowska-Curie, Paris (12 Octobre 2018)**

“A combination of gold carbenes and X-Rays is associated with cellular and mitochondrial dysfunctions in prostate cancer cells.”

- **Colloque du réseau Meetocondrie, Pornichet (27-30 Mai 2018)**

“Cellular and mitochondrial disturbances associated with X-rays irradiations after prostate cell exposure to gold carbenes.”

- **Ecole d'Eté - Groupe Français de Chimie Bio-Inorganique (FrenchBIC), Carry-Le-Rouet et Marseille (17-21 Septembre 2017)**

Thème : Méthodes d'études des métaux en biologie, de la molécule à la cellule.

- **Colloque du réseau Meetocondrie, Hossegor (14-17 Mai 2017)**

“Does mitochondria targeting with gold carbene complexes or nanoparticles radiosensitize prostate tumour cells?”

Résumé

La radiothérapie est l'une des options thérapeutiques les plus utilisées pour le cancer localisé de la prostate. Cette approche présente toutefois des limites avec le développement de radorésistance, mettant en échec ce traitement dans presque la moitié des cas. Les mécanismes de la radorésistance du cancer de la prostate mettent en jeu l'implication des voies de signalisation PI3K-Akt, PTEN, de l'autophagie, mais également des altérations des génomes nucléaire et mitochondrial, allant jusqu'à des atteintes du métabolisme. Plusieurs de ces paramètres sont associés à la mitochondrie et à son métabolisme. Cet organe joue un rôle central non seulement dans la tumorigénèse prostatique mais également dans l'acquisition de la radorésistance.

Contrecarrer les phénomènes de radorésistance constitue un enjeu majeur des stratégies radiothérapeutiques actuelles. La quantité de dose délivrée aux organes cibles est limitée. Le rehaussement local des doses cherche à radiosensibiliser les tumeurs. Il repose en partie sur l'utilisation d'éléments radiosensibilisateurs à haut numéro atomique comme l'or. Notre approche a consisté à utiliser des composés organométalliques type carbène-or capables de cibler la mitochondrie grâce à leurs caractéristiques, tout en amplifiant potentiellement les effets des irradiations par la présence du métal. L'analyse conduite en parallèle sur deux lignées cellulaires prostatiques, LNCaP et PC3, montre une internalisation cellulaire du carbène et une localisation préférentiellement mitochondriale. Ce composé présente une cytotoxicité intrinsèque, aboutissant à l'arrêt de la prolifération cellulaire. L'utilisation de faibles concentrations de carbène, inférieures à l'IC₅₀, en combinaison aux irradiations X, a permis de diminuer la survie et la croissance cellulaires, en partie par la perturbation des voies de mort cellulaire, ainsi que des paramètres mitochondriaux tels que le potentiel de membrane ou la chaîne respiratoire.

L'ensemble des résultats converge vers un effet radiosensibilisateur du ciblage mitochondrial par le carbène-or, vraisemblablement *via* l'altération en premier lieu des mitochondries, renforçant l'effet des irradiations.

Mots-clés : Cancer de la prostate; Radiothérapie; Mitochondrie; Carbène-Or; Radiosensibilisation.

Abstract

Radiation therapy is one of the most widely used treatment options for localized prostate cancer. However, this approach encounters limits with the development of radioresistance, which defeats this treatment in almost half of the cases. This local recurrence is the major obstacle to radiation therapy. The discovery of the radioresistance mechanisms in prostate cancer highlights the involvement of the PI3K-Akt, PTEN signaling pathways, autophagy, but also of nuclear and mitochondrial genomes alterations and metabolism alterations. The involvement of mitochondria in some of these disordered functions highlights the central role of this organelle not only in the tumorigenesis of prostate cancer but also in its progression and in the acquisition of radioresistance.

Counteracting the phenomena of radioresistance is a major issue in current radiotherapeutic strategies. The amount of dose delivered to the target organs is limited. The local increase in doses seeks to radiosensitize the tumors and relies in part on the use of high atomic number radiosensitizing elements such as gold. Our approach consisted in using organometallic compounds such as gold carbenes that present the dual advantage of targeting the mitochondria thanks to its characteristics and potentially amplifying the effects of radiations due to the presence of gold. The parallel analysis on two prostate cell lines LNCaP and PC3 shows cellular internalization of the carbene and its mitochondrial localization. This compound exhibits intrinsic cytotoxicity, resulting in the arrest of cell proliferation. The use of low concentrations of carbene, lower than the IC₅₀ in combination with X-rays allowed to decrease cell survival and cell growth, in part by the disruption of cell death pathways and mitochondrial parameters such as membrane potential or the respiratory chain.

All the results converge towards a radiosensitizing effect of mitochondrial targeting by gold carbene, probably through the primary alteration of the mitochondria, which reinforces the effect of irradiations.

Keywords: Prostate cancer; Radiation therapy; Mitochondria; Gold carbene; Radiosensitization.

Table des matières

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	37
<i>Chapitre I</i> : Le cancer de la prostate	39
I. La prostate: anatomie et physiologie	39
A. Localisation et structure	39
B. Fonction.....	43
C. Une glande prostatique existerait-elle chez la femme ?	43
D. Morphogénèse et développement de la prostate	44
1. Origine embryologique et étapes de développement de la prostate	44
2. Régulation hormonale de la prostate	46
E. Pathologies prostatiques non cancéreuses	51
1. Les prostatites	51
2. L'hypertrophie Bénigne de la Prostate (HBP).....	52
II. Le cancer de la prostate.....	54
A. Généralités – Incidence, prévalence et mortalité/ épidémiologie	54
B. Tumorigénèse, progression du cancer de la prostate et échappement tumoral : stades d'évolution	59
1. Les bases moléculaires du cancer de la prostate : les mécanismes de l'initiation et de la progression du cancer de la prostate	60
a. Altérations génétiques et épigénétiques impliquées dans la progression du cancer de la prostate	60
i. Les oncogènes	60
ii. Les gènes suppresseurs de tumeur	61

iii. Altération des gènes régulant la prolifération et l'apoptose.....	62
iv. L'altération de AR.....	63
v. Les fusions Tmprss2-ERG	64
vi. Les altérations épigénétiques.....	64
b. Processus majeurs régulant la tumorigénèse prostatique	65
i. L'inflammation.....	65
ii. Le stress oxydant.....	65
iii. La sénescence cellulaire	65
iv. Les télomères.....	66
v. La réactivation des voies développementales.....	67
2. Les étapes de la carcinogénèse prostatique	67
a. L'atrophie inflammatoire proliférative	67
b. La néoplasie intra-épithéliale (PIN)	68
c. Le carcinome	69
d. La dissémination métastatique	69
i. La Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	69
ii. Le rôle du stroma et du microenvironnement	71
iii. La colonisation métastatique.....	73
C. Facteurs de risque et d'agressivité.....	74
1. Les facteurs endogènes ou intrinsèques	76
a. L'âge	76

b. Les facteurs génétiques et épigénétiques.....	77
2. Les facteurs exogènes et facteurs d'agressivité.....	78
D. Diagnostic du cancer de la prostate.....	80
1. Symptômes	80
2. Dépistage	81
a. Détection précoce	81
b. Autres biomarqueurs du cancer de la prostate.....	84
c. Imagerie	88
i. L'échographie.....	88
ii. L'IRM (Imagerie à Résonance Magnétique)	89
iii. La tomodensitométrie (scan) et scintigraphie	89
iv. La tomographie par émission de positons (TEP scan)	89
E. Classification des cancers de la prostate.....	91
1. Classification TNM	91
2. Le score de Gleason.....	92
3. La classification de d'Amico.....	94
<i>Chapitre II : Cancer de la prostate et métabolisme</i>	<i>96</i>
I. Voies métaboliques impliquées et modifiées dans le cancer de la prostate	96
A. Le métabolisme des cellules saines et des cellules tumorales.....	96
1. Énergétique d'une cellule saine.....	96
2. Les altérations métaboliques des cellules tumorales	97
B. Le métabolisme des cellules prostatiques saines et tumorales	99

1. Le métabolisme énergétique.....	99
2. Le métabolisme lipidique	102
II. La mitochondrie	105
A. Structure et dynamique.....	106
B. Quelques fonctions de la mitochondrie	111
1. Le métabolisme cellulaire.....	111
2. L'apoptose	116
C. L'ADN mitochondrial	121
III. Les maladies et dysfonctionnements mitochondriaux	122
A. Dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial et pathologies	123
B. Les mutations de l'ADN nucléaire	125
C. Les mutations de l'ADN mitochondrial	125
D. Délétions et systèmes de réparation de l'ADNmt	130
1. Réparation des bases endommagées.....	131
2. Réparations de cassures simple brin (SSBR)	132
3. Réparations de cassures double-brin	133
4. Réparation des mésappariements	134
E. Systèmes de réparation et cancer	134
<i>Chapitre III : Les voies thérapeutiques du cancer de la prostate</i>	<i>136</i>
I. Les types de prise en charge et de traitements du cancer de la prostate.....	136
A. Le traitement différé.....	137
B. Traitement local et loco-régional.....	138

1. Prostatectomie totale	139
2. Radiothérapie.....	140
a. Radiothérapie externe	140
b. Curiethérapie	142
c. HIFU	143
d. Cryothérapie	143
C. Traitements systémiques	144
1. Hormonothérapie	144
a. Agonistes et antagonistes de la LHRH.....	145
b. Anti-androgènes	145
c. Anti androgènes de seconde génération	147
2. Chimiothérapie	148
D. Traitements ciblant l'os.....	149
E. Nanomédecine	151
II. La radiothérapie : effets des radiations ionisantes	151
A. Effets physiques	152
1. L'effet photoélectrique	153
2. L'effet Compton	154
3. La production de paires	155
4. La diffusion de Thomson-Rayleigh.....	156
5. La réaction nucléaire	156
B. Effets physico-chimiques	156

1. Effets physico-chimiques directs.....	157
2. Effets physico-chimiques indirects.....	157
C. Effets biologiques/ Effets cellulaires des rayonnements ionisants.....	157
1. Dommages à l'ADN et systèmes de réparation des lésions à l'ADN radio-induites	158
2. Autres cibles	160
a. La mitochondrie.....	161
b. Dommages oxydatifs des protéines	162
c. Dommages oxydatifs des lipides	163
3. Atteinte du cycle cellulaire	165
a. Régulation du cycle cellulaire	165
b. Effets des rayonnements ionisants sur le cycle cellulaire	166
4. Mort cellulaire radio-induite.....	168
III. Rayonnements ionisants et hadrons	170
IV. Les phénomènes de radiorésistance.....	170
A. Généralités.....	170
B. Cancers de la prostate et radiorésistance	170
1. Voies de signalisation impliquées	171
a. Les cellules souches cancéreuses.....	171
b. La différenciation neuroendocrine	171
c. La transition épithélio-mésenchymateuse.....	171
d. Akt	172
e. Les systèmes de réparation des dommages à l'ADN.....	172

f. Stress oxydant	173
2. Implication de la mitochondrie.....	174
V. Stratégies de radiosensibilisation.....	175
A. Les marqueurs de prédiction de la radiorésistance.....	175
1. Signature génique	175
2. Marqueurs du stress oxydant	176
3. Marqueurs du microenvironnement	177
B. La radiorésistance : de nouvelles cibles pour la contrer.....	178
1. Stratégies associées à la réparation de l'ADN.....	178
a. PARP-1	178
b. Dbait	179
2. Autres stratégies thérapeutiques	179
a. État de l'art	179
b. Les éléments à haut numéro atomique	180
c. Nanotechnologies et cancers : Généralités	180
3. Radiosensibilisation : notre approche.....	181
a. État de l'art	181
b. Mode d'action de la combinaison métaux-irradiations	181
c. Ciblage mitochondrial et radiosensibilisation par les carbènes et métallocarbènes	182
MATERIEL ET MÉTHODES	189
I. Culture cellulaire et traitements.....	191

A. Entretien des cellules.....	191
B. Caractéristiques du carbène.....	191
1. Détermination de l'IC ₅₀ (half maximal inhibitory concentration).....	192
2. Détermination du GI ₅₀ (half maximal growth inhibition)	192
3. Effet potentialisateur du carbène	193
C. Internalisation et localisation sub-cellulaire du carbène	193
II. Analyse de la viabilité cellulaire	194
A. Survie cellulaire.....	194
B. Clonogénicité.....	194
III. Analyse des effets cellulaires et subcellulaires par cytométrie en flux	195
A. Analyse de la mort cellulaire.....	195
B. Analyse du cycle cellulaire.....	196
C. Analyse du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$).....	197
IV. Analyses sur les acides nucléiques	198
A. Extraction d'ADN	198
B. Southern Blot.....	198
V. Analyses sur les protéines	200
A. Extraction des protéines totales.....	200
B. Fractionnement cellulaire	200
C. Western blot.....	200
VI. Analyses statistiques.....	202

RÉSULTATS	203
I. Caractérisation du carbène	205
A. Détermination de l'IC ₅₀	205
B. Détermination de la GI ₅₀	206
C. Mise en évidence de l'internalisation du carbène et de sa distribution subcellulaire	208
II. Réponses cellulaires de la combinaison du carbène aux irradiations	212
A. Effets sur la viabilité et la prolifération cellulaires	213
1. Test de survie clonogénique	213
2. Test MTT.....	220
B. Effets sur la mort cellulaire	229
1. Analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux	230
2. Western blot.....	245
C. Effets sur le cycle cellulaire	247
III. Réponses mitochondriales aux différents traitements	258
A. Effets sur le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)	258
B. Biogenèse mitochondriale	265
C. Effets sur l'expression de protéines de la chaîne respiratoire	266
1. Analyse globale	267
2. Analyse de l'accumulation de la protéine Rieske, sous-unité du complexe III	269
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	271
I. Choix des composés organométalliques.....	273

II. Choix du type de radiations ionisantes et des doses d'irradiation	274
III. Impacts cellulaires et mitochondriaux de nos traitements	274
A. Impact du carbène seul	274
B. Impact des irradiations	276
C. Le carbène radiosensibilise-t-il les deux lignées cellulaires prostatiques ? ...	276
PERSPECTIVES	281
I. Acquisition de données comparatives plus larges entre les modèles cellulaires.	283
II. Étude mécanistique des réponses cellulaires aux carbènes et aux irradiations combinées	284
III. Approfondissement des réponses mitochondriales	285
IV. Ouverture à d'autres types de rayonnements	285
ANNEXES	287
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	305

Table des figures

FIGURE 1 : ILLUSTRATION DE L'ANATOMIE ET DE LA STRUCTURE ZONALE DE LA PROSTATE HUMAINE.....	40
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES COMPOSANTS CELLULAIRES D'UN ACINUS PROSTATIQUE HUMAIN.....	40
FIGURE 3 : COUPE TRANSVERSALE DE LA PROSTATE MONTRANT LES GLANDES PERI-URETRALES.	42
FIGURE 4 : SCHEMA REPRESENTANT L'ORGANISATION GENERALE DU TISSU PROSTATIQUE.....	42
FIGURE 5 : MORPHOGENESE DE LA PROSTATE HUMAINE.	45
FIGURE 6 : SIGNALISATION DES RECEPTEURS AUX ANDROGENES DANS LES CELLULES PROSTATIQUES SAINES..	46
FIGURE 7 : MEDIATION DE L'EFFET DES ANDROGENES SUR L'EPITHELIUM PROSTATIQUE AU COURS DU DEVELOPPEMENT.	48
FIGURE 8 : LOCALISATION ET ACTIONS DES STEROÏDES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA PROSTATE.	50
FIGURE 9 : HBP ET CANCER DE LA PROSTATE.	53
FIGURE 10 : CAUSES DE MORTALITE DANS LE MONDE EN 2017.	54
FIGURE 11 : ESTIMATION DU TAUX D'INCIDENCE DES CANCERS DANS LE MONDE, TOUT AGE ET SEXE CONFONDU.....	55
FIGURE 12 : ESTIMATION DU TAUX D'INCIDENCE STANDARDISE SUR L'AGE DES CANCERS DANS LE MONDE EN 2020.....	55
FIGURE 13 : ESTIMATION DU TAUX D'INCIDENCE DES CANCERS SURVENANT CHEZ L'HOMME DANS LE MONDE EN 2020.	55
FIGURE 14 : ESTIMATION DU TAUX DE MORTALITE STANDARDISE SUR L'AGE DUE AUX CANCERS DANS LE MONDE EN 2020.....	56
FIGURE 15 : ESTIMATION DU TAUX DE MORTALITE DUE A UN CANCER SURVENANT CHEZ LES HOMMES DANS LE MONDE EN 2020.....	56
FIGURE 16 : CAUSES DE MORTALITE EN FRANCE EN 2017.	57
FIGURE 17 : ESTIMATION DU TAUX D'INCIDENCE DE CANCERS SURVENANT CHEZ LES HOMMES EN FRANCE EN 2020, PLAÇANT LE CANCER DE LA PROSTATE A LA PREMIERE PLACE.	58
FIGURE 18 : ESTIMATION DU TAUX DE MORTALITE DUE A UN CANCER SURVENANT CHEZ LES HOMMES EN FRANCE.....	58
FIGURE 19 : LES ETAPES DE LA PROGRESSION DU CANCER DE LA PROSTATE.....	60
FIGURE 20 : L'ACTIVATION D'AKT MEDIE LA TUMORIGENESE ET LA RESISTANCE THERAPEUTIQUE A TRAVERS PLUSIEURS MECANISMES.	62
FIGURE 21 : LES DIFFERENTES ARCHITECTURES DES PIN MISES EN EVIDENCE DANS LE CANCER DE LA PROSTATE.	68
FIGURE 22 : MECANISMES ET ACTEURS IMPLIQUES DANS LE DEROULEMENT DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.....	71
FIGURE 23 : PRINCIPAUX SITES METASTATIQUES DU CANCER DE LA PROSTATE.	74

FIGURE 24: "HALLMARKS" DES CANCERS.	75
FIGURE 25: SCINTIGRAPHIE ET PET SCAN.	90
FIGURE 26: LES DIFFERENTS GRADES DE CANCER DE LA PROSTATE SELON LE SCORE DE GLEASON MODIFIE ET VALIDE PAR L'OMS LORS DE L'EDITION DE CLASSIFICATION DES TUMEURS EN 2016.	94
FIGURE 27: EFFET WARBURG.	98
FIGURE 28: METABOLISME PARTICULIER DES CELLULES PROSTATIQUES.	100
FIGURE 29: STRUCTURE D'UNE MITOCHONDRIE.	107
FIGURE 30: LES CINQ VOIES MAJEURES D'IMPORT DE PROTEINES MITOCHONDRIALES.	109
FIGURE 31: DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE.	111
FIGURE 32: CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE.	113
FIGURE 33: CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES SUBITS PAR UNE CELLULE RENTRANT EN APOPTOSE.	117
FIGURE 34: ACTIVATION DE L'APOPTOSE VIA SES VOIES EXTRINSEQUE ET INTRINSEQUE.	118
FIGURE 35: L'ADN MITOCHONDRIAL HUMAIN EST UN ADN CIRCULAIRE COMPORTANT UN BRIN LOURD ET UN BRIN LEGER.	122
FIGURE 36: PATHOLOGIES ET MUTATIONS DE L'ADNMT.	127
FIGURE 37: REPARATION DES DOMMAGES A L'ADN PAR BER (BASE EXCISION REPAIR).	132
FIGURE 38: LA PROSTATECTOMIE TOTALE.	139
FIGURE 39 : COURBES DE DISTRIBUTION DE DOSE DES FAISCEAUX DE PHOTONS ET DE PROTONS EN FONCTION DE LA PROFONDEUR DU TISSU.	141
FIGURE 40: CERCLE VICIEUX »DANS LES METASTASES OSSEUSES MONTRANT L'IMPLICATION DE RANK ET DE RANKL.	150
FIGURE 41: PREDOMINANCE DES EFFETS PHYSIQUES DES RAYONNEMENTS X.	153
FIGURE 42: EFFET PHOTOELECTRIQUE.	154
FIGURE 43: DIFFUSION COMPTON.	155
FIGURE 44: PRODUCTION DE PAIRES.	155
FIGURE 45: LA DIFFUSION DE THOMSON-RAYLEIGH.	156
FIGURE 46 : DOMMAGES A L'ADN.	159
FIGURE 47: LES ETAPES DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.	164
FIGURE 48: SCHEMA DU CYCLE CELLULAIRE ET DE SA REGULATION.	166
FIGURE 49: LES VOIES DE SIGNALISATION D'INDUCTION DE LA MORT CELLULAIRE PAR LES CARBENES.	185
FIGURE 50: DIVERS ACTEURS IMPLIQUES ET INTERCONNECTES DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA RESISTANCE THERAPEUTIQUE DU CANCER DE LA PROSTATE.	186
FIGURE 51: STRUCTURE DU CARBENE FC-IX-19.	191
FIGURE 52 : ANALYSE DE L'APOPTOSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.	196
FIGURE 53: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE LA DISTRIBUTION DES CELLULES DANS LES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE.	197
FIGURE 54: MESURE DU POTENTIEL DE MEMBRANE MITOCHONDRIAL PAR CYTOMETRIE EN FLUX.	198

FIGURE 55: DETERMINATION DE L'IC ₅₀ SUR LA LIGNEE LNCAP (N=4).....	205
FIGURE 56: EFFET DU CARBENE SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE.	207
FIGURE 57: ANALYSE PAR ICPMS DE L'ACCUMULATION DE L'OR PAR LES CELLULES LNCAP ET PC3.	209
FIGURE 58: ANALYSE DE LA PURETE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES ; N=3.	210
FIGURE 59: ANALYSE PAR ICPMS DE LA REPARTITION SUBCELLULAIRE DE L'OR.....	210
FIGURE 60: ANALYSE DE LA SURVIE CLONOGENIQUE SUR LA LIGNEE CELLULAIRE PC3.....	214
FIGURE 61: SURVIE CLONOGENIQUE SUR PC3.....	216
FIGURE 62: SURVIE CLONOGENIQUE SUR PC3: EFFETS DE LA DUREE DU MAINTIEN DU CARBENE A 0,5µM (A) OU 4µM (B) DANS LE MILIEU DE CULTURE SUR LA SURVIE CELLULAIRE.	218
FIGURE 63: EFFETS DU CARBENE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE A 24 (A), 96 (B) ET 120 HEURES (C).	221
FIGURE 64: EFFETS DES IRRADIATIONS SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE A 48 (A), 72 (B), 96 (C) ET 120 HEURES (D).	223
FIGURE 65: EFFETS DE LA COMBINAISON CARBENE (0,5µM) /IRRADIATIONS SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE A 48 (A), 72 (B), 96 (C) ET 120 HEURES (D).	226
FIGURE 66: EFFETS DE LA COMBINAISON CARBENE (2µM) /IRRADIATIONS SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE A 48 (A), 72 (B), 96 (C) ET 120 HEURES (D).	227
FIGURE 67: EFFETS DE LA COMBINAISON CARBENE (4µM) /IRRADIATIONS SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE A 48 (A), 72 (B), 96 (C) ET 120 HEURES (D).	228
FIGURE 68: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DU CARBENE SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES PC3 A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	232
FIGURE 69: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DU CARBENE SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).....	233
FIGURE 70: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DES IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES PC3 A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).....	234
FIGURE 71: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DES IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	235
FIGURE 72: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DE LA COMBINAISON DU CARBENE A 4µM AUX IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES PC3 A 72H (A) ET 96H (B).	236
FIGURE 73: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DE LA COMBINAISON DU CARBENE A 2,4µM AUX IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	237
FIGURE 74: ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DES PROPORTIONS RELATIVES DES POPULATIONS DE CELLULES PC3 EN APOPTOSE PRECOCE, TARDIVE ET NECROSE SUITE AU TRAITEMENT CARBENE A 2µM (A) ET 4µM (B).	238
FIGURE 75: ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DES PROPORTIONS RELATIVES DES POPULATIONS DE CELLULES LNCAP EN APOPTOSE PRECOCE, TARDIVE ET NECROSE SUITE AU TRAITEMENT CARBENE A 1,2µM (A) ET 2,4µM (B).....	239

FIGURE 76: ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DES PROPORTIONS RELATIVES DES POPULATIONS DE CELLULES PC3 EN APOPTOSE PRECOCE, TARDIVE ET NECROSE EN PRESENCE DE DMSO (A) OU SUITE AUX IRRADIATIONS A 2 (B) ET 5GY (C).....	240
FIGURE 77: ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DES PROPORTIONS RELATIVES DES POPULATIONS DE CELLULES LNCAP EN APOPTOSE PRECOCE, TARDIVE ET NECROSE EN PRESENCE DE DMSO (A) OU SUITE AUX IRRADIATIONS A 2 (B) ET 5GY (C).....	241
FIGURE 78: ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DES PROPORTIONS RELATIVES DES POPULATIONS DE CELLULES PC3 EN APOPTOSE PRECOCE, TARDIVE ET NECROSE SUITE AUX COMBINAISONS DES IRRADIATIONS A 5GY AVEC 0,5µM (A), 2µM (B) ET 4µM (C).....	242
FIGURE 79: ÉVOLUTION AU COURS DU TEMPS DES PROPORTIONS RELATIVES DES POPULATIONS DE CELLULES LNCAP EN APOPTOSE PRECOCE, TARDIVE ET NECROSE SUITE AUX COMBINAISONS DES IRRADIATIONS A 5GY AVEC 0,5µM (A), 2µM (B) ET 4µM (C).	243
FIGURE 80: ANALYSE PAR WESTERN-BLOT DES EFFETS DU CARBENE EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'UNE IRRADIATION DE 2GY, SUR LE COMPORTEMENT DES FORMES LC3-I ET LC-II DE CELLULES PC3.	246
FIGURE 81 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE 3 HEURES DE CARBENES SUR LES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE DES CELLULES PC3 (A) ET LNCAP (B).	248
FIGURE 82: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DU CARBENE SUR LE CYCLE CELLULAIRE DANS LES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).....	250
FIGURE 83: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DES IRRADIATIONS SUR LE CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES PC3 A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	251
FIGURE 84: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DES IRRADIATIONS SUR LE CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).....	253
FIGURE 85 : ÉVOLUTION DU CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES PC3 AU COURS DU TEMPS.....	255
FIGURE 86: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DU CARBENE SUR LA DEPOLARISATION DE LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE DES CELLULES PC3 EXPRIMEE EN PROPORTION (%) DE CELLULES DEPOLARISEES PAR RAPPORT A LA POPULATION TOTALE A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	259
FIGURE 87 : ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DU CARBENE SUR LA DEPOLARISATION DE LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE DES CELLULES LNCAP EXPRIMEE EN PROPORTION (%) DE CELLULES DEPOLARISEES PAR RAPPORT A LA POPULATION TOTALE A 0H (A) ET A 96H (B).	260
FIGURE 88 : ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DU POTENTIEL DE MEMBRANE MITOCHONDRIAL DANS LES CELLULES PC3 AU COURS DU TEMPS, A) EN ABSENCE DE TRAITEMENT CARBENE OU IRRADIATION (TEMOIN DMSO), B) EN PRESENCE DE CARBENE 4µM ; C) ET D) SUITE A UNE IRRADIATION 2 ET 5GY RESPECTIVEMENT ; E) ET F) SUITE AU DOUBLE TRAITEMENT.	261
FIGURE 89: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DU POTENTIEL DE MEMBRANE MITOCHONDRIAL DANS LES CELLULES LNCAP AU COURS DU TEMPS, A) EN ABSENCE DE TRAITEMENT CARBENE OU IRRADIATION (TEMOIN DMSO), B) EN PRESENCE DE CARBENE 2,4µM ; C) ET D) SUITE A UNE IRRADIATION DE 2 ET 5GY	

RESPECTIVEMENT ; E) ET F) SUITE AU DOUBLE TRAITEMENT.	263
FIGURE 90: ANALYSE PAR WESTERN-BLOT DES EFFETS DU CARBENE EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'UNE IRRADIATION DE 2GY, DE L'ACCUMULATION DE PGC-1A DANS DES CELLULES PC3.	266
FIGURE 91 : ANALYSE PAR WESTERN-BLOT DES EFFETS DU CARBENE 2μM, D'UNE IRRADIATION DE 2GY OU 5GY OU DE LA COMBINAISON, SUR L'ACCUMULATION DE SOUS-UNITES REPRESENTATIVES DE 5 COMPLEXES : CI (NDUFB8, CII (SDHB), CIII (UQCRC2), CIV (COXII), CV (ATP5A) DANS DES CELLULES PC3 ENTRE 0H ET 96H.	268
FIGURE 92: ANALYSE PAR WESTERN-BLOT DES EFFETS DU CARBENE EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'UNE IRRADIATION DE 2GY, SUR L'ACCUMULATION DE LA PROTEINE RIESKE (CELLULES PC3).	270

Liste des tableaux

TABLEAU 1: CORRELATION DU TAUX DE PSA ET DES RISQUES DE DEVELOPPER UN CANCER DE LA PROSTATE SELON LES DONNEES DE L'EAU (MOTTET ET AL., 2017).	82
TABLEAU 2: CLASSIFICATION TNM DU CANCER DE LA PROSTATE D'APRES LA REVISION 2016 DE L'AJCC.....	92
TABLEAU 3: ÉVALUATION DU RISQUE DE RECIDIVE DU CANCER DE LA PROSTATE SELON LA CLASSIFICATION DE D'AMICO.	95
TABLEAU 4: METABOLISME PARTICULIER ET ALTERATIONS METABOLIQUES DES CELLULES PROSTATIQUES AU COURS DE LA TUMORIGENESE ET DE LA PROGRESSION TUMORALE.....	102
TABLEAU 5: LES DIFFERENTS TRAITEMENTS DU CANCER DE LA PROSTATE EN FONCTION DE SON ETENDUE AU MOMENT DU DIAGNOSTIC.	137
TABLEAU 6: NOMBRE DES DIFFERENTS TYPES DE LESIONS PAR GRAY ET PAR NOYAU.....	158
TABLEAU 7: PRINCIPAUX PRODUITS D'OXYDATION DE QUELQUES ACIDES AMINES.....	163
TABLEAU 8: LES DIFFERENTS COMPLEXES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE.....	165
TABLEAU 9: LISTE DES SONDÉS UTILISEES POUR LE SOUTHERN BLOT.	199
TABLEAU 10: LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES (WB: WESTERN BLOT; IF: IMMUNOFLUORESCENCE).	201
TABLEAU 11: LISTE DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES.	202
TABLEAU 12: CYTOTOXICITE DU CARBENE FC-IX-19. DETERMINATION DES IC ₅₀ A 48 HEURES PAR TEST MTT DANS LES LIGNEES LNCAP ET PC3.....	206
TABLEAU 13: ANALYSE PAR TEST DE CLONOGENICITE DE L'EFFET DU CARBENE SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE.	207

Liste des annexes

ANNEXE 1: EFFETS DU CARBENE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DE 24 A 120 HEURES. LES CELLULES PC3 ONT ETE ENSEMENCEES ET TRAITEES SELON LE PROTOCOLE DECRIT.	289
ANNEXE 2 : EFFETS DES IRRADIATIONS SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DE 24 A 120 HEURES.	290
ANNEXE 3: EFFETS DES COMBINAISONS AVEC 0,5 μ M DE CARBENE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DE 24 A 120 HEURES.	291
ANNEXE 4: EFFETS DES COMBINAISONS AVEC 2 μ M DE CARBENE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DE 24 A 120 HEURES. LES CELLULES PC3 ONT ETE ENSEMENCEES ET TRAITEES SELON LE PROTOCOLE DECRIT. ...	292
ANNEXE 5: EFFETS DES COMBINAISONS AVEC 4 μ M DE CARBENE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DE 24 A 120 HEURES. LES CELLULES PC3 ONT ETE ENSEMENCEES ET TRAITEES SELON LE PROTOCOLE DECRIT. ...	293
ANNEXE 6: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DU CARBENE SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES PC3 A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	294
ANNEXE 7: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DES IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES PC3 A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	295
ANNEXE 8: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DE LA COMBINAISON DU CARBENE A 0,5 μ M AUX IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES PC3 A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	296
ANNEXE 9: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DE LA COMBINAISON DU CARBENE A 2 μ M AUX IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES PC3 A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	297
ANNEXE 10: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DE LA COMBINAISON DU CARBENE A 4 μ M AUX IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES PC3 A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	298
ANNEXE 11: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DU CARBENE SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	299
ANNEXE 12: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DES IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	300
ANNEXE 13: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DE LA COMBINAISON DU CARBENE A 0,5 μ M AUX IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	301
ANNEXE 14: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DE LA COMBINAISON DU CARBENE A 1,2 μ M AUX IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	302
ANNEXE 15: ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES EFFETS DE LA COMBINAISON DU CARBENE A 2,4 μ M AUX IRRADIATIONS X SUR LA MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES LNCAP A 0H (A), 24H (B), 48H (C), 72H (D) ET 96H (E).	303

Liste des abréviations

5

53BP1: *P53 binding protein 1*

A

ADN: *Acide désoxyribonucléique*

ADNmt: *ADN mitochondrial*

ADNn: *ADN nucléaire*

ADP: *Adénosine diphosphate*

AFM: *Atomic Force Microscopy*

AFU : *Association Française d'Urologie*

AIF: *Apoptosis Inducing Factor*

AMACR: *α-Methylacyl Coenzyme A
Racémase*

AMPc: *Adénosine monophosphate
cyclique*

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

APAF: *Apoptotic peptidase activating
factor*

APE: *Apurinic/Apyrimidinic endonuclease*

AR : *Androgen Receptor*

ARN: *Acide ribonucléique*

ARNr: *ARN ribosomique*

ARNt: *ARN de transfert*

ARSi: *Androgen Receptor Signaling
Inhibitor*

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*

ATP: *Adénosine triphosphate*

ATR: *ATM and Rad3 related protein*

B

Bad: *Bcl-2-associated agonist of cell death*

Bak: *Bcl-2 - homologous antagonist/ killer*

BamH1: *Bacillus amyloliquefaciens H
restriction enzyme*

Bax: *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2 protein*

BER: *Base excision repair*

BET: *Bromure d'éthidium*

BMP: *Bone Morphogenetic protein*

BNIP3: *Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa
protein-interacting protein 3*

BRCA: *Breast Cancer*

BSA: *Bovine serum albumin*

C

CAB: *Complete or combined androgen
blockade*

CAPK: *Ceramide activated protein kinase*

CCCP: *Carbonyl cyanide m-chlorophenyl
hydrazone*

CDB: *Cassure double-brin*

CDC: *Cell division cycle*

CDK: *Cycline dependent-kinase*

CDKi: *CDK inhibitor*

CerS: *Ceramide synthase*

CHEK: *Checkpoint Kinase*

COX: *Cytochrome c oxidase*

CRPC: *Castration-resistant prostate*

cancer

CSB: *Cassure simple brin*

CSC: *Cellule souche cancéreuse*

CTC: *Cellule tumorale circulante*

CX3CL1 : *C-X3-C Motif Chemokine
Ligand*

CXCL: *Chemokine (C-X-C motif) ligand*

CXCR: *Chemokine (C-X-C motif) receptor*

adénine dinucléotide

FASN: *Fatty acid synthase*

FDG: *FluoroDéoxylGlucose*

FFIP: *Fixation au formol et inclusion dans
la paraffine*

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

FISH: *Fluorescent in situ hybridization*

FSC: *Forward scatter*

FSH: *Follicle stimulating hormone*

D

DDT: *Dichlorodiphényltrichloroéthane*

DHT : *5 α -dihydrotestostérone*

DMSO: *Diméthylsulfoxyde*

Drp1: *Dynamain-related protein*

E

EAU: *European Association of Urology*

ECBU : *Examen cyto bactériologique des
urines*

EGF-R : *Epidermal Growth Factor
Receptor*

EN2: *Engrailed 2*

EPR: *Enhanced permeability and retention*

ERG: *E-twenty six - related gene*

ETS : *E-twenty six*

F

FADH: *Flavine adénine dinucléotide*

FADH₂: *Forme réduite de la flavine*

G

GI₅₀: *Half maximal growth inhibitory
concentration*

GnRH: *Gonadotropin releasing hormone*

GSH: *Glutathion*

GSTP1 : *Gutathione S-transférase 1*

GTPase: *Guanosine triphosphatase*

Gy: *Gray*

H

H2AX: *Histone 2A, member X*

HAS : *Haute Autorité de la Santé*

HBP: *Hyperplasie bénigne de la prostate*

HDL: *High density lipoprotein*

HGF: *Hepatocyte growth factor*

HGPIN: *High grade PIN*

HIF: *Hypoxia inducing factor*

HIFU: *High intensity focused ultrasound*

HK: *Hexokinase*

HR: *Homologous recombination*

HSP: *Heat-shock protein*

I

IA: *Intelligence artificielle*

IAP: *Inhibitor of apoptosis*

IC₅₀: *Half maximal inhibition concentration*

ICCF: *Institut de Chimie de Clermont-Ferrand*

IL: *Interleukine*

IMC: *Indice de masse corporelle*

INCa : *Institut National du Cancer*

IP: *Iodure de propidium*

IRM: *Imagerie par résonance magnétique*

ISUP: *International Society of Urological pathology*

J

JC-1: *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolycarbocyanine iodide*

K

keV: *Kilo électron-volt*

KLK: *Kallikréines*

L

LC3: *microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3*

LGPIN: *Low grade PIN*

LH: *Luteinizing hormone*

LHRH: *Luteinizing hormone releasing hormone*

LMDS: *Locally multiply damaged sites*

LNCaP: *Lymph node Carcinoma of the prostate*

LP-BER: *Long patch BER*

M

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*

MELAS: *Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes*

MeV: *Méga électron-volt*

MFN: *Mitofusine*

MIA: *Mitochondrial import and assembly*

MIM: *Mitochondrial import*

MMP: *Métalloprotéinase*

MMR: *Mismatch repair*

MTT: *Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium*

N

NAD⁺: *Nicotinamide adénine dinucléotide*

NADH: *Forme réduite du NAD⁺*

NER: *Nucleotide excision repair*

NFκB: *Nuclear factor-kappa B*

NHC: *N-heterocyclic carbene*

NHEJ: *Non-homologous end-joining*

NUR: *NADH - ubiquinone oxydoreductase*

O

OGG: *8-oxoguanine DNA glycosylase*

OMS: *Organisation Mondiale de la Santé*

OriH: *origine de réplication du brin H*

OriL: *origine de réplication du brin L*

ORL: *Oto-rhino-laryngologie*

OXPHOS: *Oxidative phosphorylation*

P

PAM: *Presequence translocase-associated motor*

PARP: *poly(ADP-ribose) polymerase*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCA3: *Prostate cancer antigen 3*

PCB: *Polychlorobiphényles*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PDE4D7: *c-AMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D*

PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*

PGC-1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PHI: *Prostate health index*

Pi: *Phosphate inorganique*

PI3K: *Phosphatidylinositolbisphosphate 3-kinase*

PIA: *Proliferative Inflammatory Atrophy*

PIN: *Prostate Intraepithelial Neoplasia*

PINK1: *PTEN-induced putative kinase 1*

pRb : *protéine du rétinoblastome*

PSA : *Prostate Specific Antigen*

PTEN : *Phosphatase and Tensin homolog*

R

RANK: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B*

RANKL: *Receptor activator of nuclear*

factor kappa-B ligand

RCMI: *Radiothérapie conformationnelle par modulation d'intensité*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

RT: *Rétrotranscription*

S

SAM: *Sorting and assembly machinery*

SDS: *Sodium dodécyl sulfate*

SEM: *Standard Error of the Mean*

SER: *Sensitizing enhancement ratio*

SF: *Surviving fraction*

SLC: *Solute carrier*

SMase: *Sphingomyélinase*

SMS: *Sphingomyéline synthases*

SOD : *Superoxyde dismutase*

SP-BER: *Short patch BER*

SPECT: *Single Photon Emission Computed Tomography*

SRD5A2 : *5 α -réductase de type 2*

SSC: *Side scatter*

STAT5: *signal transducer activator of transcription 5*

STS: *Staurosporine*

SUR: *Succinate - ubiquinone oxydoreductase*

SVF: *Sérum de veau foetal*

T

TEL: *Transfert d'énergie linéique*

TEM: *Transition épithélio-
mésenchymateuse*

TEP: *Tomographie à Émission de
Positons*

Tfm : *Testicular feminized mouse/mice*

TGF- β : *Transforming growth factor β*

TIM: *Translocase of the inner membrane*

TMPRSS-ETS: *TransMembrane PRotease
Serine 2-E-Twenty Six*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TNM: *Tumor, Node, Metastasis*

TOM: *Translocase of the outer membrane*

TrXR: *Thiorédoxine réductase*

TSP1: *Thrombospondine 1*

U

UCCR: *Ubiquinol cytochrome c
oxydoreductase*

UQ: *Ubiquinone*

V

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

Z

Z: *Numéro atomique*

ZIP: *Zrt and Irt-like Protein 1*

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Le cancer de la prostate

I. La prostate: anatomie et physiologie

A. Localisation et structure

La prostate est une glande exocrine de l'appareil uro-génital mâle. Sous l'influence de la testostérone, sa taille, de celle d'un pois à la naissance, double à l'adolescence et atteint celle d'une noix à l'âge adulte (15 à 20 g et 3 à 4 cm de long). Elle devient progressivement hypertrophiée après l'âge de 50 ans. Elle a la forme d'une châtaigne et sa partie inférieure est nommée « l'apex » alors que sa partie supérieure est appelée la « base ». C'est la principale glande accessoire du système reproducteur mâle. La prostate adulte est une structure canalaire hétérogène avec des régions proximale, centrale et distale bien définies (Lee et al., 1990). Chez l'homme, elle est formée d'une masse unique située sous la vessie, en arrière du pubis et en avant du rectum (Timms, 2008) ; elle entoure l'urètre de sa partie supérieure à son extrémité (**Figure 1A et B**). Elle est délimitée au niveau de sa base, dans sa partie ventrale par la vessie et dans sa partie dorsale par les canaux déférents et les vésicules séminales. Ces dernières ne sont rencontrées que chez les mammifères herbivores et l'homme, les mammifères carnivores ayant habituellement une prostate mais pas de vésicules séminales. La prostate permet le passage de quatre conduits à travers la prostate : l'urètre prostatique, les deux conduits éjaculateurs et l'utricule prostatique (**Figure 1A et B**). Sur le plan structurel, elle est composée de deux principaux compartiments : un épithélium différencié, entouré de stroma (**Figure 2**) (Barron & Rowley, 2012) . Le premier permet la contraction de la glande et le second, sous l'influence des androgènes, sécrète des facteurs de croissance qui stimulent la prolifération et la différenciation de cellules souches et intermédiaires, conduisant à la formation de cellules luminales définitives qui composent l'épithélium prostatique. Ces deux compartiments s'influencent réciproquement via différentes voies de signalisation, leur permettant d'assurer un bon développement et l'homéostasie de la prostate (Verze et al., 2016). Trois types cellulaires composent la prostate : les cellules luminales, les cellules basales et les cellules neuroendocrines, très minoritaires. Les cellules luminales, formant la principale population, sont très différenciées et sont responsables de la sécrétion du PSA (Prostate Specific Antigen) et du liquide prostatique. Les cellules basales sont quant à elles indifférenciées et sont situées entre les cellules luminales et la membrane basale. Enfin, les cellules neuroendocrines, sont au contact de la membrane basale et sont nécessaires à la viabilité et la croissance des cellules

luminales (Barron & Rowley, 2012).

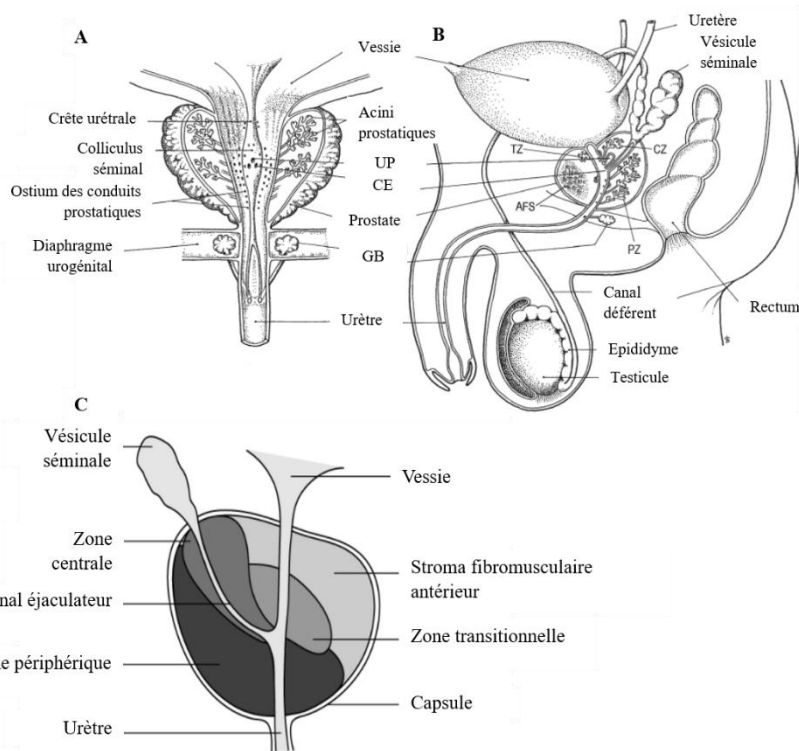


Figure 1 : Illustration de l'anatomie et de la structure zonale de la prostate humaine.

Coupes frontales (A) et sagittales (B) de l'appareil urogénital mâle montrant la prostate et les structures associées (CE : canal éjaculateur ; GB : glande bulbo-urétrale ; UP : utricule prostatique). Les zones anatomiques décrites par McNeal sont indiquées : AFS : stroma fibromusculaire antérieur ; CZ : zone centrale ; PZ : zone périphérique ; TZ : zone transitionnelle. Modifiée d'après (Timms, 2008). (C) : zones de la prostate ; modifié d'après <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/prostate-cancer/the-prostate/?region=qc>

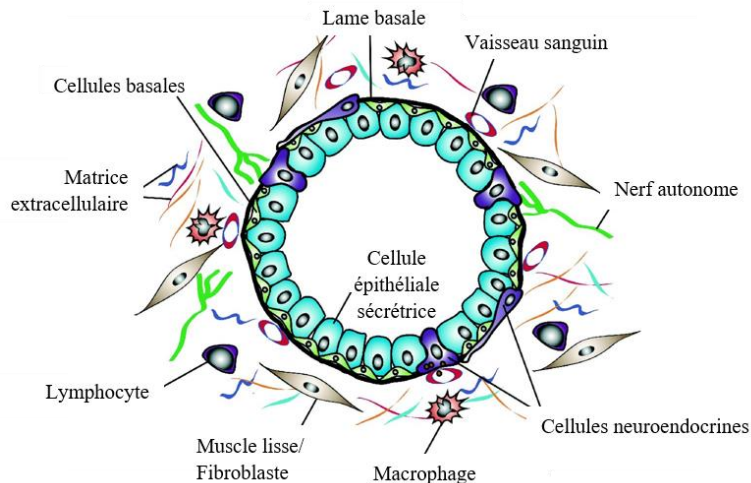


Figure 2 : Représentation schématique des composants cellulaires d'un acinus prostatique
Représentation schématique des composants cellulaires d'un acinus prostatique humain.
Modifiée d'après Barron and Rowley, 2012.

Plusieurs modèles de l'anatomie de la prostate ont été proposés sur une période de 50 ans, mais le modèle actuel incluant le concept de zones dans la prostate est celui proposé par Mc Neal dans les années 1980. Ainsi, chez l'homme, il est possible de distinguer différentes zones anatomiques : une zone transitionnelle, une zone centrale, une zone périphérique et un stroma fibromusculaire antérieur (**Figure 1**) (McNeal, 1981):

- Zone périphérique : elle constitue la plus grande partie de la prostate (80%). C'est dans cette région que se développent la plupart des cancers de la prostate ainsi que les prostatites. Elle se situe dans la zone postérieure de la prostate et est proche du rectum, permettant d'être facilement palpable lors d'un toucher rectal.
- Zone transitionnelle : c'est la partie centrale de la glande ; elle entoure la portion de l'urètre qui traverse la prostate (urètre prostatique). Cette zone est souvent touchée par l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP ; augmentation de son volume due à l'âge). Cette pathologie touche environ 50% des hommes âgés entre 50 et 60 ans et environ 90% des hommes de plus de 80 ans. Elle se caractérise par des troubles urinaires car la prostate devenue trop volumineuse comprime l'urètre.
- Zone centrale : c'est la zone se trouvant derrière la zone transitionnelle et qui entoure les canaux éjaculateurs, qui unissent les vésicules séminales à l'urètre prostatique. Elle est très peu touchée par les cancers de la prostate.
- Stroma fibromusculaire antérieur : situé à l'avant de l'urètre, il s'agit d'un épaissement du tissu qui entoure l'apex de la prostate. Il est formé de fibres musculaires et de tissu conjonctif fibreux. Il est également rarement touché par les cancers de la prostate.

D'un point de vue clinique, la prostate est souvent décrite comme un ensemble de trois lobes : deux lobes latéraux gauche et droit séparés par une scissure centrale, palpable lors d'un toucher rectale et un lobe central, situé dans la partie supérieure de l'urètre prostatique. Ce dernier se projetterait dans la vessie chez les hommes âgés. Ces lobes ne correspondent pas histologiquement aux structures définies dans la prostate saine mais sont généralement liés à une hypertrophie pathologique de la zone transitionnelle et des glandes péri urétrales (**Figure 3**).

La prostate comprend des lobules qui sont des unités fonctionnelles formées de glandes tubulo-alvéolaires, au nombre de 30 à 50 (**Figure 4**). On distingue des acini et les canaux où est le liquide prostatique est respectivement produit et excrété.

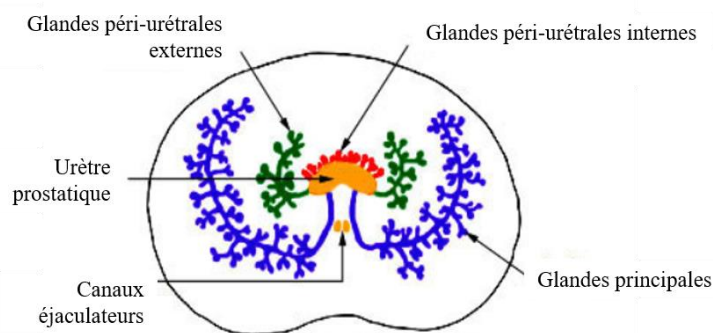


Figure 3: Coupe transversale de la prostate montrant les glandes péri-urétrales.

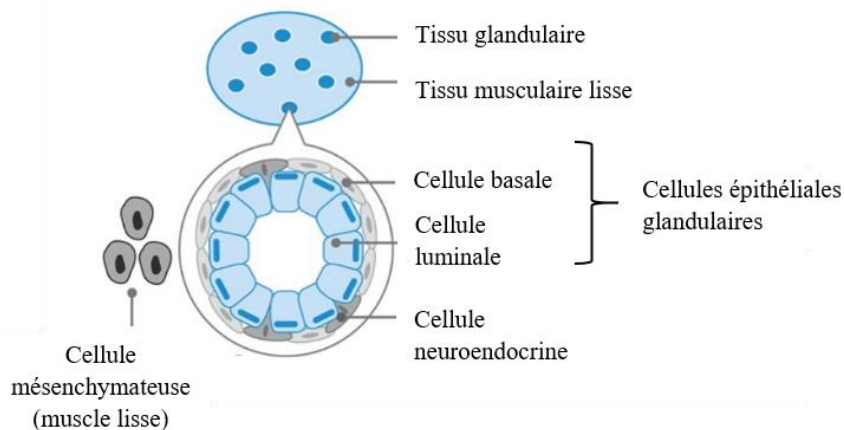


Figure 4: Schéma représentant l'organisation générale du tissu prostatique.

D'un point de vue structurel, il est composé de deux principaux compartiments: un épithélium, et un stroma. La prostate est formée de 30 à 50 glandes tubulo-alvéolaires formant des lobules. Trois types cellulaires composent la zone glandulaire : les cellules lumineuses, les cellules basales et les cellules neuroendocrines. Modifié à partir de « Prostate Cancer UK: <https://prostatecanceruk.org/prostate-information/further-help/rare-prostate-cancer> ».

B. Fonction

La fonction principale de la prostate est de produire, stocker et sécréter par ses cellules épithéliales luminales, du liquide prostatique, qui représente un cinquième à un tiers du liquide séminal. Le reste est sécrété par les vésicules séminales. Le mélange des spermatozoïdes produits par les testicules et du liquide séminal forme le sperme. Le fluide prostatique contient plusieurs facteurs qui contrôlent l'éjaculation et régulent certaines protéines dont le rôle est d'activer la maturation des spermatozoïdes. En effet, en étant expulsés dans la première fraction de l'éjaculat, le fluide prostatique et le liquide séminal joueraient un rôle protecteur des spermatozoïdes en favorisant leur survie, leur pouvoir fécondant et leur résistance contre les agents pathogènes (Kelly et al., 1991; Sitaram & Nagaraj, 1995). On trouve également dans le liquide prostatique, du citrate, des ions Zn^{2+} (Bedwal & Bahuguna, 1994) et des kallikréines (une sous-famille de sérine protéases) dont le rôle est de maintenir le sperme sous forme liquide, d'assurer le cycle de coagulation et la motilité des spermatozoïdes (Kalinska et al., 2016). Une de ces protéines est le PSA, une glycoprotéine à activité sérine protéase. Il s'agit d'une enzyme spécifique sécrétée par la prostate sous la dépendance des androgènes. D'un point de vue physiologique, les protéines sécrétées par la prostate se retrouvent dans le sang à concentration minime. Cette concentration se retrouve augmentée dans des cas de dérèglements ou de pathologies prostatiques (inflammation, prolifération bénigne ou maligne) (Lilja et al., 2008). Ce dernier point reste tout de même controversé en ce qui concerne le PSA. La prostate permet également d'éviter le mélange des urines et du sperme pendant l'éjaculation en obturant l'urètre et empêche aussi la remontée des urines dans les vésicules séminales lors de la miction. Elle est également impliquée dans la transformation d'environ 5% de la testostérone en dihydrotestostérone. Quant à elles, les cellules du stroma ont pour rôle principal d'assurer un microenvironnement adéquat à l'épithélium prostatique, en assurant l'homéostasie ou la régénération de la glande. Plusieurs sources de données indiquent également que le stroma pourrait avoir un rôle central dans les processus inflammatoires de la prostate (Nieto et al., 2014; Verze et al., 2016). En effet, la prostate est la cible de plusieurs maladies qui pourraient affecter la fertilité mâle à différents moments de la vie d'un homme.

C. Une glande prostatique existerait-elle chez la femme ?

Depuis 2002, les glandes para-urétales ont été officiellement renommées « prostate féminine » par le *Federative International Committee on Anatomical Terminology*. Cependant,

les fonctions physiologiques de ces glandes ne sont pas encore connues mais comme chez l'homme, elles produisent du PSA dont la concentration augmente en cas de cancer (Zaviacic and Ablin, 2000). La production par ces glandes d'un fluide présentant les caractéristiques des sécrétions prostatiques, au moment de l'orgasme féminin, a été observée chez certaines femmes (Wimpissinger et al., 2007).

D. Morphogénèse et développement de la prostate

1. Origine embryologique et étapes de développement de la prostate

Le développement de la prostate relève d'un processus coordonnant signalisations endocrine, paracrine, autocrine, juxtacrine ainsi que des facteurs de transcription. Les conduits génitaux et les vésicules séminales dérivent du mésonéphros mais contrairement à ces derniers, la prostate a pour origine le sinus urogénital (Prins & Putz, 2008).

Cinq étapes sont nécessaires au développement de la prostate : la détermination, l'initiation et le bourgeonnement, la morphogénèse des branches, la différenciation et enfin, la maturation (**Figure 5**). Chez l'homme, ces processus se déroulent pendant les deuxième et troisième trimestres de grossesse et prennent fin à la naissance. En effet, autour de la 8^{ème} semaine, la production de testostérone par les testicules fœtaux et sa liaison aux récepteurs des androgènes (AR : *Androgen Receptor*), induit la formation de la prostate qui s'initiera autour de la 10^{ème} semaine de gestation, contrairement aux rongeurs chez lesquels la prostate rudimentaire à la naissance, se développe durant les 15 premiers jours de vie. En effet, chez une souche de souris ayant une durée totale de gestation de 19 jours, la croissance initiale des bourgeons se produit entre 16,5 et 17,5 jours post fécondation (E16,5–17,5) (Sugimura et al., 1986) alors que chez le rat, elle se produit à E18,5, avec une durée de gestation de 21 jours (Hayashi et al., 1991).

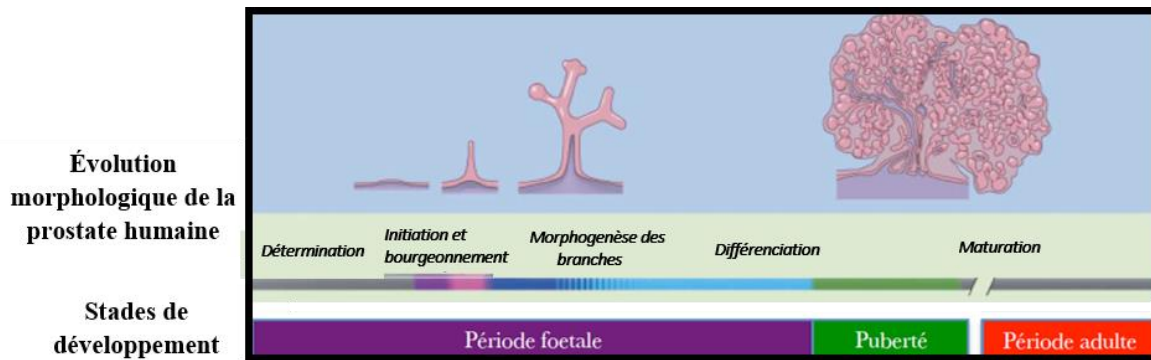


Figure 5: Morphogenèse de la prostate humaine.

Représentation des différents stades de développement de la prostate de la période fœtale à l'âge adulte. Modifiée d'après Prins and Putz, 2008.

Ainsi, chez l'homme, l'excroissance initiale des bourgeons prostatiques à partir du sinus uro-génital, se produit en réponse à la liaison de la 5α -dihydrotestostérone AR localisés dans le tissu mésenchymateux (Shannon & Cunha, 1983; Timms, 2008). Ces excroissances sont d'abord sous forme de solides cordons de cellules épithéliales, puis subissent une élongation, et une morphogenèse intensive de branchement dans les stades tardifs de la croissance fœtale. Durant la période post-natale, les canaux forment une lumière et l'épithélium revêtant les acini, se différencie et synthétise les produits de sécrétion sous l'influence des androgènes (Timms, 2008).

Les androgènes ont un rôle clé dès le développement embryonnaire comme expliqué précédemment : ils ont un rôle majeur dans la différenciation des canaux de Wolff, de la prostate et des organes génitaux masculins. Ils agissent sur les cellules stromales, stimulant la production de facteurs de croissance nécessaires au renouvellement et au maintien des cellules épithéliales, mais également directement sur les cellules luminales, permettant le maintien de leurs fonctions différenciées telles que la production de sécrétions (Litvinov et al., 2003). En effet, les cellules épithéliales luminales expriment fortement AR, tandis que peu de cellules basales sont positives pour le récepteur (Prins et al., 1991). De plus, lors de la différenciation des cellules épithéliales, seules les cellules luminales expriment AR (Prins & Birch, 1995), ce qui conforte l'implication des androgènes dans la fonction de sécrétion exercée par les cellules épithéliales (Cooke et al., 1991).

2. Régulation hormonale de la prostate

La prostate est un organe sensible aux hormones et subit de multiples régulations qui sont tout autant complexes. Nous nous limiterons volontairement de façon succincte à l'implication des androgènes. En effet, la détermination et l'initiation du développement de la prostate humaine sont entièrement dépendantes des androgènes produits par les testicules du fœtus (**Figure 6**) (Isaacs & Isaacs, 2004). Des expériences ont démontré que le développement de l'épithélium prostatique nécessite un mésenchyme capable de répondre aux androgènes, ce qui n'est pas nécessairement requis dans l'épithélium lui-même (Shannon & Cunha, 1983).

L'effet des androgènes est médié par leur liaison à l'AR. Ce dernier est un membre de la superfamille des facteurs de transcription et appartient à la sous-famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes (Liao & Fang, 1970).

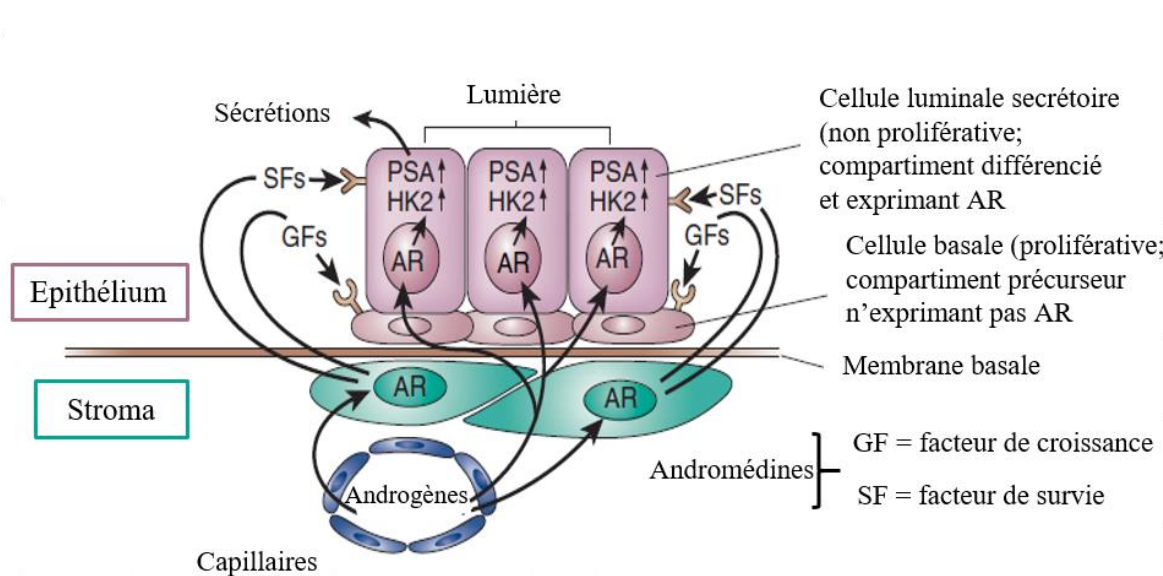


Figure 6: Signalisation des récepteurs aux androgènes dans les cellules prostatiques saines.

La croissance et le maintien de l'épithélium prostatique dépendent des andromédines, qui sont peptides solubles (facteurs de croissance ou de survie). La production de ces dernières est induite par la liaison des androgènes à leur récepteur dans les cellules du compartiment stromal. Ces molécules peuvent ensuite diffuser à travers la membrane basale pour atteindre le compartiment épithélial. Présents dans ce dernier, les cellules épithéliales expriment AR, contrairement aux cellules basales. Modifié d'après Isaacs & Isaacs, 2004.

La testostérone, principale hormone masculine circulante, est majoritairement synthétisée par les cellules de Leydig au niveau des testicules. Dans les années 1970, la 5 α -dihydrotestostérone (DHT) était connue comme l'androgène responsable du développement de la prostate (Wilson & Gloyna, 1970). La DHT est synthétisée dans l'épithélium prostatique à partir de la testostérone par la 5 α -réductase de type 2 (SRD5A2) et il a été démontré que les AR possèdent plus d'affinité pour la DHT par rapport à la testostérone (Galbraith & Duchesne, 1997). Les testicules ne représentent pas le seul lieu de synthèse des stéroïdes. En effet, la glande surrénale, les ovaires, le placenta et le cerveau sont également capables de sécréter de la déhydroépiandrostérone (DHEA), un précurseur inactif de la DHT.

Différentes études illustrent clairement l'implication des androgènes ainsi que de leur récepteur dans l'homéostasie et la physiologie de la glande prostatique. Ainsi, une castration chirurgicale ou chimique (par administration d'anti-androgènes par exemple) de rongeurs dans des périodes critiques de la vie fœtale conduit à une inhibition du développement de la prostate (Price, 1936). Cependant, l'étendue de l'inhibition dépend de la durée d'administration des anti-androgènes (Timms, 2008). Afin d'étudier cela, Cunha s'est servi d'une culture de sinus uro-génitaux murins issus de mâles dont le bourgeonnement de la prostate s'initie à E17 *in vivo* (Cunha, 1973). Les sinus uro-génitaux récupérés de souris E12-13, donc avant la production de testostérone à E14, ne produisirent pas de bourgeons prostatiques lorsqu'ils furent mis en culture 6 à 8 jours en l'absence d'androgènes. Cependant, les sinus uro-génitaux récupérés à E14 ou E15, c'est-à-dire, après le début de la production de testostérone *in vivo*, et mis en culture pendant 6 jours sans androgènes produisirent des canaux respectivement dans 15% et 53% des tissus. À E16, 100% des explants produisirent des bourgeons prostatiques alors qu'ils furent cultivés en l'absence d'androgènes. En utilisant un protocole similaire sur des rats mâles, Lasnitzki et Mizuno obtinrent des résultats comparables (Lasnitzki & Mizuno, 1977). Ceci indique que malgré le fait de sa nécessité pour la détermination de la prostate ainsi que pour un nombre et une longueur maximale des conduits durant l'initiation, le bourgeonnement peut se produire dans une large mesure, même en l'absence de testostérone. Cependant, des expériences de privation androgénique par castration chirurgicale ou pharmacologique ont montré à l'âge adulte une involution des épithélium génitaux et notamment celui de la prostate (Litvinov et al., 2003). Ainsi, la réduction des niveaux intra prostatiques de DHT chez le rat entraîne, par apoptose, une perte massive des cellules épithéliales assurant l'activité de sécrétion.

D'autres études sur des souris mutantes tfm (testicular feminized mouse/mice) qui

possèdent un AR non-fonctionnel et une insensibilité complète aux androgènes montrent qu'elles présentent une absence de prostate (Cunha & Lung, 1978). De plus, des études sur ces souris ont montré une action paracrine des androgènes du mésenchyme vers l'épithélium : en effet, des bourgeons épithéliaux et des canaux étaient formés même avec une signalisation androgénique restreinte au mésenchyme du sinus uro-génital (Cunha et al., 2004; Lasnitzki & Mizuno, 1980) (**Figure 7**). Cependant, Foster et Cunha remettent en cause la présence absolue de DHT dans l'induction des bourgeons après l'étape de détermination étant donné que la testostérone et des androgènes synthétiques non réductibles étaient capables d'induire des nombres de bourgeons équivalents à ceux de la DHT (Foster & Cunha, 1999).

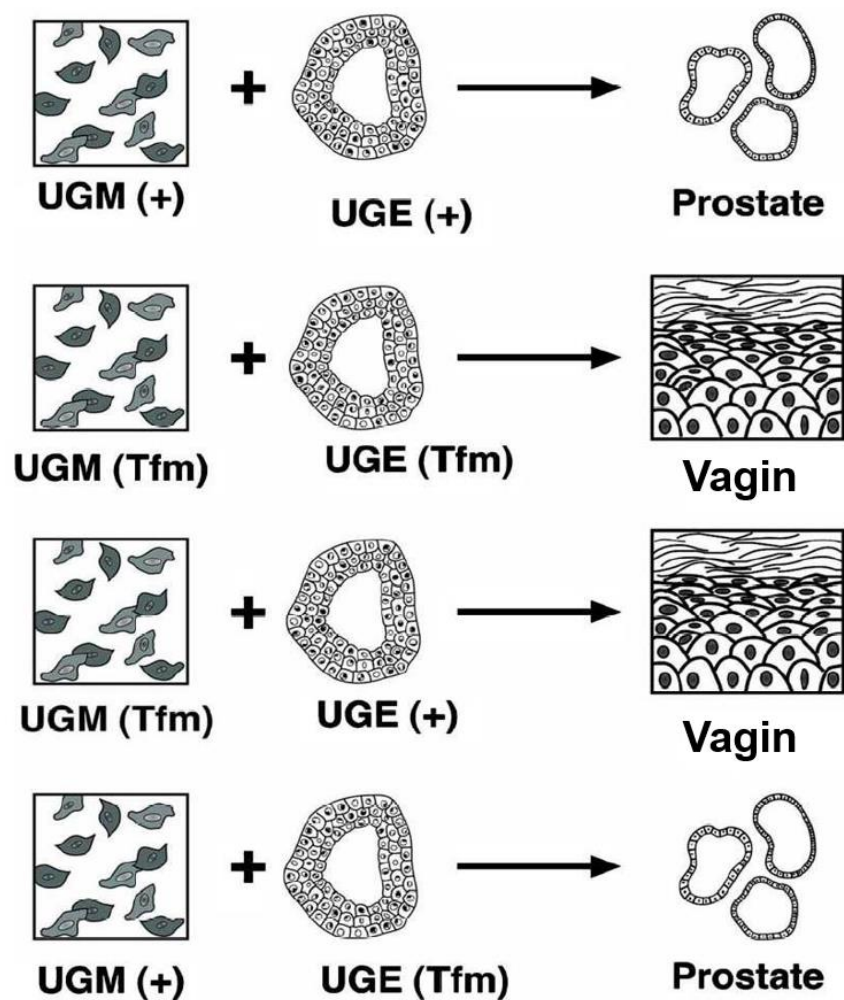


Figure 7: Médiation de l'effet des androgènes sur l'épithélium prostatique au cours du développement.

Développement du tissu prostatique en fonction de combinaison variées de greffes provenant de mésenchyme (UGM) et d'épithélium (UGE) de souris mâles sauvages (+) ou Tfm (testicular feminized mouse), montrant l'importance de la signalisation androgénique dans le mésenchyme pour le développement de la prostate. D'après (Cunha et al., 2004).

La mise en évidence de l'absolue nécessité de AR pour le développement de la prostate vient de l'observation de l'absence de la prostate chez des souris ou humains avec des récepteurs complètement dysfonctionnels (Bardin et al., 1973; Brown, 1995). En effet, chez les hommes atteints d'un syndrome de déficit en 5 α -réductase, il a été observé une absence totale de morphogénèse de la prostate avec un développement normal des vésicules séminales et du canal déférent qui donnent dans un vagin fermé (Siiteri & Wilson, 1974). A été corrélé à cela, une diminution de la production de PSA. De même, le traitement de rattes gestantes avec un inhibiteur de la 5 α -réductase de f14–22 a oblitéré la formation de bourgeons prostatiques, une conséquence qui pourrait être inversée avec l'administration concomitante de DHT (Wilson & Lasnitzki, 1971). Cependant, l'épithélium basal et les cellules stromales restent peu affectés. En effet, AR est fortement exprimé dans le mésenchyme des sinus uro-génitaux avant et pendant la morphogénèse prostatique alors que son expression au niveau de l'épithélium est induite après bourgeonnement et morphogénèse des branches (Prins & Birch, 1995; Shannon & Cunha, 1983). Des études menées par Cunha confortent cela : ce sont les AR présents dans le mésenchyme et non les AR épithéliaux qui sont responsables de la morphogénèse prostatique (Cunha et al., 1987; Cunha & Chung, 1981).

Ont été également mis en évidence, des rôles clés d'autres stéroïdes tels que les œstrogènes, et les rétinoïdes dans le développement de la prostate (Huang et al., 2004; Prins et al., 2001; Prins & Korach, 2008). En effet, des récepteurs de ces stéroïdes ont été observés pendant la morphogénèse de la prostate du rat, avec une expression évoluant dans le temps et selon la région ou le type cellulaire et assez conservée entre les différentes espèces (Prins et al., 1998, 2002; Prins & Birch, 1997). Bien que ces facteurs de transcription ne soient pas essentiels au développement de la prostate, il a été proposé qu'ils seraient impliqués dans la modulation de l'expression de gènes spécifiques impliqués dans sa différenciation et son homéostasie. Un schéma résumant l'action des stéroïdes à travers des récepteurs spécifiques au cours du développement prostatique est illustré dans la **figure 8**.

Les gènes impliqués dans la régulation de la morphogénèse prostatique se divisent en trois catégories :

- Les gènes homéotiques (Hox)
- Les facteurs de transcription : Nkx3.1 ; Fox A1 et A2 ; Notch-1/Delta/Jagged

- Les ligands de signalisation secrétés et codés par un petit nombre de gènes très conservés comme les gènes de la famille Hedgehogs ; Bmps / TGF- β / Activin ; Wnts, Fgf

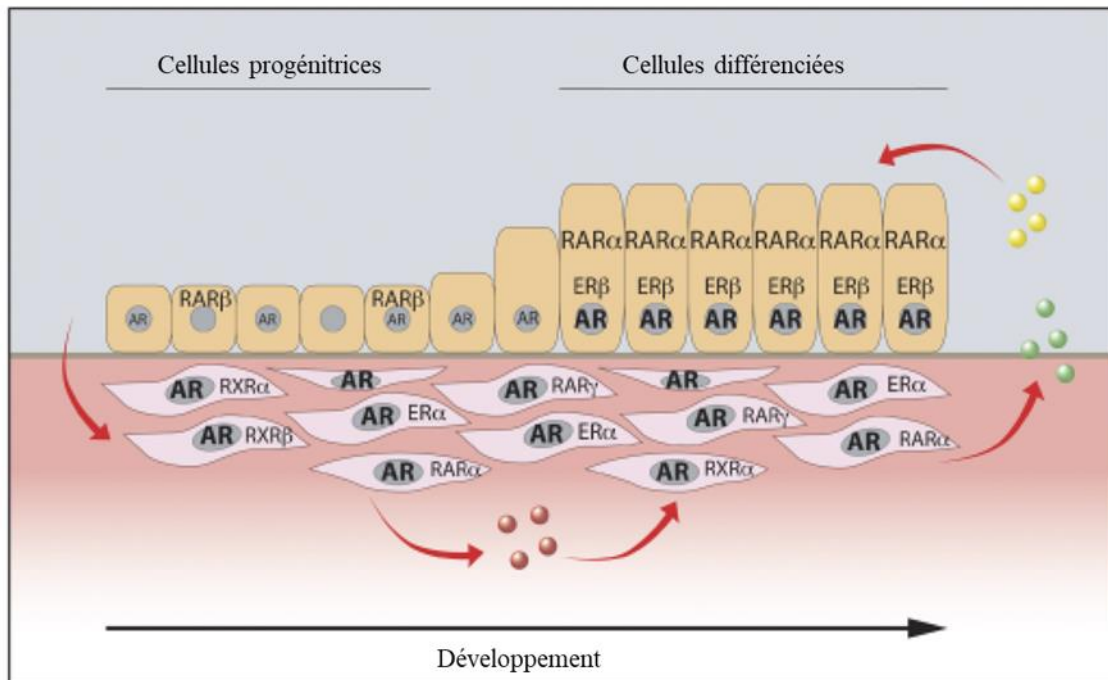


Figure 8: Localisation et actions des stéroïdes au cours du développement de la prostate.

Durant les stades périnataux précoces, AR est fortement exprimé dans les cellules mésenchymateuses alors que leur expression est quasi absente des cellules épithéliales progénitrices. Une production autocrine (ronds roses) et paracrine (ronds jaunes et verts) de facteurs de croissance par les cellules mésenchymateuses en réponse aux androgènes va induire la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. AR est surexprimé au cours de cette différenciation.

Ces molécules régulatrices permettent la communication paracrine et autocrine entre les cellules mésenchymateuses et épithéliales grâce à leurs récepteurs. Elles sont également connues pour leur implication dans des mécanismes associés au développement tumoral.

Les androgènes et leur récepteur ont un rôle fondamental dans le développement de la prostate mais aussi dans la carcinogenèse prostatique (Gelman, 2002). AR est assimilé à un proto-oncogène qui en fonctionnant dans des conditions physiologiques, contrôle à la fois le développement et la différenciation de la prostate. Cependant, au cours de la carcinogenèse, il peut subir une amplification génique et/ou des mutations « gain-de-fonction », induisant une augmentation de la survie et de la prolifération des cellules tumorales (Feldman & Feldman, 2001).

E. Pathologies prostatiques non cancéreuses

1. Les prostatites

Les prostatites sont des inflammations de la prostate dues principalement à une infection et fréquemment retrouvées chez l'homme âgé. En effet, c'est le diagnostic urologique le plus courant chez les hommes de moins de 50 ans et le troisième diagnostic le plus fréquent chez les hommes de plus de 50 ans (Khan et al., 2017). Elles peuvent être causées par une infection virale, bactérienne ou fongique, due à une biopsie de la prostate, ou la pose d'un cathéter. De plus, les infections sexuellement transmissibles (IST) peuvent également provoquer une prostatite. Enfin, des antécédents d'infections urinaires, ou une obstruction dans la vessie ou dans un canal éjaculateur sont également des facteurs de risque de développer une prostatite.

La prostatite peut être aigüe ou chronique (Thin, 1999). Lorsqu'elle est aigüe, elle est caractérisée par une crise unique et intense alors que la chronique va durer plusieurs mois. Les principaux signes sont des symptômes urinaires assez marqués comme des brûlures, des difficultés à uriner ou de fréquents besoins d'uriner, des douleurs périnéales, péniennes, abdominales, testiculaires, rectales, des douleurs à l'éjaculation, conduisant à des douleurs systémiques (fièvre, frissons, grande fatigue, nausées). La prostatite aigüe est accompagnée de signes grippaux tels que des douleurs musculaires diffuses et articulaires. Une palpation abdominale, génitale ainsi qu'un toucher rectal permettent de détecter une prostate inflammatoire chaude, douloureuse et qui a parfois augmenté de volume (Coker, 2016). L'examen cytbactériologique des urines (ECBU) permet l'identification des bactéries ou germes à l'origine de la pathologie dont les plus courants sont *Escherichia coli*, *Streptococcus D* ou encore des *chlamydiae*, gonocoques ou mycoplasmes.

Il existe quatre formes de prostatites, dont trois qui sont peu communes : les prostatites bactériennes aigües (catégories I) qui résultent d'une infection de la prostate par *E. coli* (80%) et *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Klebsiella spp* et *P. mirabilis* (20%) ; les prostatites chroniques (catégorie II) qui sont des infections récurrentes de la prostate et la prostatite chronique non bactérienne ou encore appelée le syndrome de douleur pelvienne chronique (catégorie III) qui représente à elle seule 95 % des prostatites diagnostiquées et dont l'étiologie reste inconnue. Elle peut être inflammatoire (IIIa) ou non inflammatoire (IIIb) et est traitée par des alpha-bloquants, des antalgiques, des massages de la prostate ou des antihistaminiques alors que les deux premières sont traitées par des antibiotiques. La quatrième forme, les prostatites

de catégorie IV ou prostatites inflammatoires asymptomatiques, sont très peu répandues (Khan et al., 2017). Ne causant aucun symptôme, leur diagnostic se fait lors d'examens pour la détection d'autres pathologies mais la détection de leucocytoses (présence de leucocytes dans les tissus et les sécrétions prostatiques) est essentiel pour confirmer le diagnostic (Coker, 2016; Meares & Stamey, 1968).

2. L'hypertrophie Bénigne de la Prostate (HBP)

L'Hypertrophie ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP) est une hypertrophie non cancéreuse de la prostate (**Figure 9**). Cette pathologie survient chez l'homme de plus de 50 ans et sa prévalence augmente avec l'âge : une HBP est histologiquement observée chez la moitié des hommes de plus de 50 ans, chez 80 % des hommes de plus de 60 ans et chez 100% des hommes de plus de 90 ans. L'HBP se met en place sous la forme d'un adénome au niveau de la zone transitionnelle, menant à l'augmentation de son volume indépendamment du reste de la prostate et entraînant une constriction plus ou moins importante de l'urètre, en fonction de la progression de la pathologie. Les différents symptômes sont principalement deux grands troubles urinaires (McVary, 2003):

- Les troubles irritatifs dus à une irritation de la vessie entraînant un besoin fréquent d'uriner
- Les troubles obstructifs dus au rétrécissement de l'urètre, ayant pour conséquence des difficultés à uriner et une mauvaise vidange de l'urètre

On distingue trois différents types d'HBP :

- L'HBP microscopique, correspondant à l'apparition de lésions histologiques d'HBP
- L'HBP macroscopique, correspondant à l'apparition de l'hypertrophie
- L'HBP clinique, correspondant à l'HBP microscopique ou macroscopique associée à des troubles urinaires.

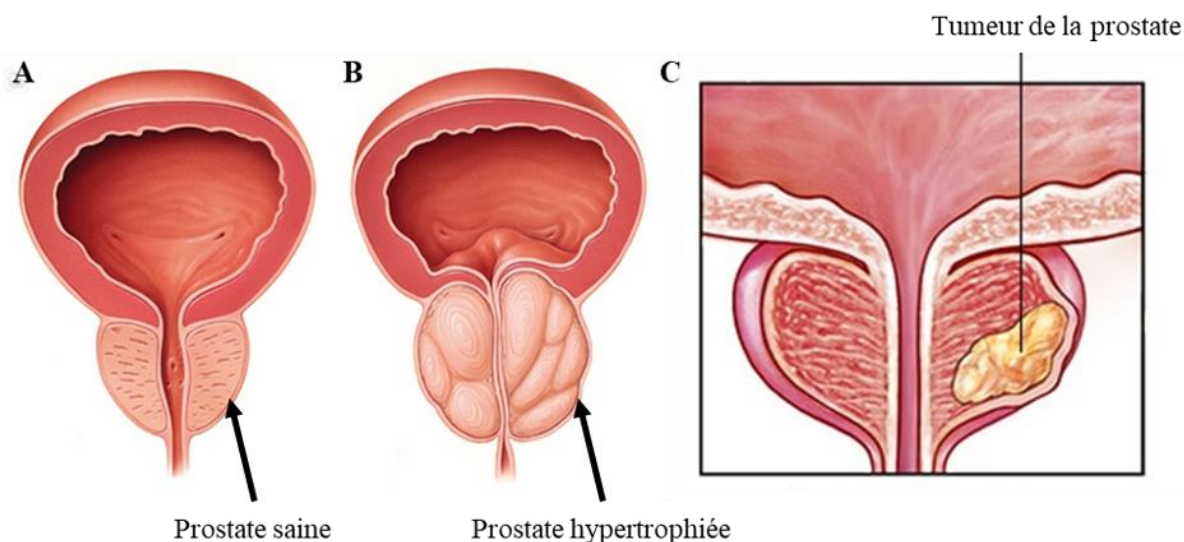


Figure 9: HBP et cancer de la prostate.

Représentation schématique d'une prostate normale (A), présentant une hypertrophie bénigne (B) et une tumeur (C). <https://urbancare.clinic/movember-beating-prostate-cancer/>; <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/prostate-cancer/symptoms-causes/syc-20353087>

Les traitements sont médicamenteux (phytothérapie, inhibiteurs de la 5 α -réductase de type I et/ou II, les α -1-bloquants) ou chirurgicaux (résection trans-urétrale) dans les cas les plus avancés. Dans ce cas, il s'agit de réaliser par endoscopie, laser, micro-ondes ou par électrovaporisation, une ablation d'une partie ou de l'intégralité de la prostate. Ces interventions peuvent avoir pour conséquences une incontinence et une éjaculation rétrograde (vers la vessie et non vers l'extérieur) (Bayne et al., 2000; Frye et al., 1998; Ishani et al., 2000; Yoo & Cho, 2012).

En France, la chirurgie de l'HBP est la deuxième opération pratiquée après celle de la cataracte (65000 actes pour l'HBP contre plus de 800 000 actes pour la cataracte, estimés en 2017) (Association Française d'Urologie (AFU) ; Haute Autorité de la Santé (HAS)). Des méta-analyses suggèrent un lien entre HBP, obésité, et diabète (Parsons et al., 2006; Sarma et al., 2009). Bien qu'il existe des études contradictoires, la consommation de viandes rouges et un régime riche en graisse semblent augmenter le risque de développer une HBP (Kristal et al., 2008).

II. Le cancer de la prostate

A. Généralités – Incidence, prévalence et mortalité/ épidémiologie

Les cancers représentent la deuxième cause de mortalité dans le monde, après les maladies cardio-vasculaires (**Figure 10**). En France, presque 3 millions de personnes de plus de 15 ans ont déjà eu au moins un cancer dans leur vie (INCa). Aux États-Unis, un américain sur trois sera touché par le cancer (Siegel et al., 2019). Le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus fréquent chez l'homme, dans le monde, derrière le cancer du poumon et le cinquième en termes de mortalité (**Figures 11 - 15**).

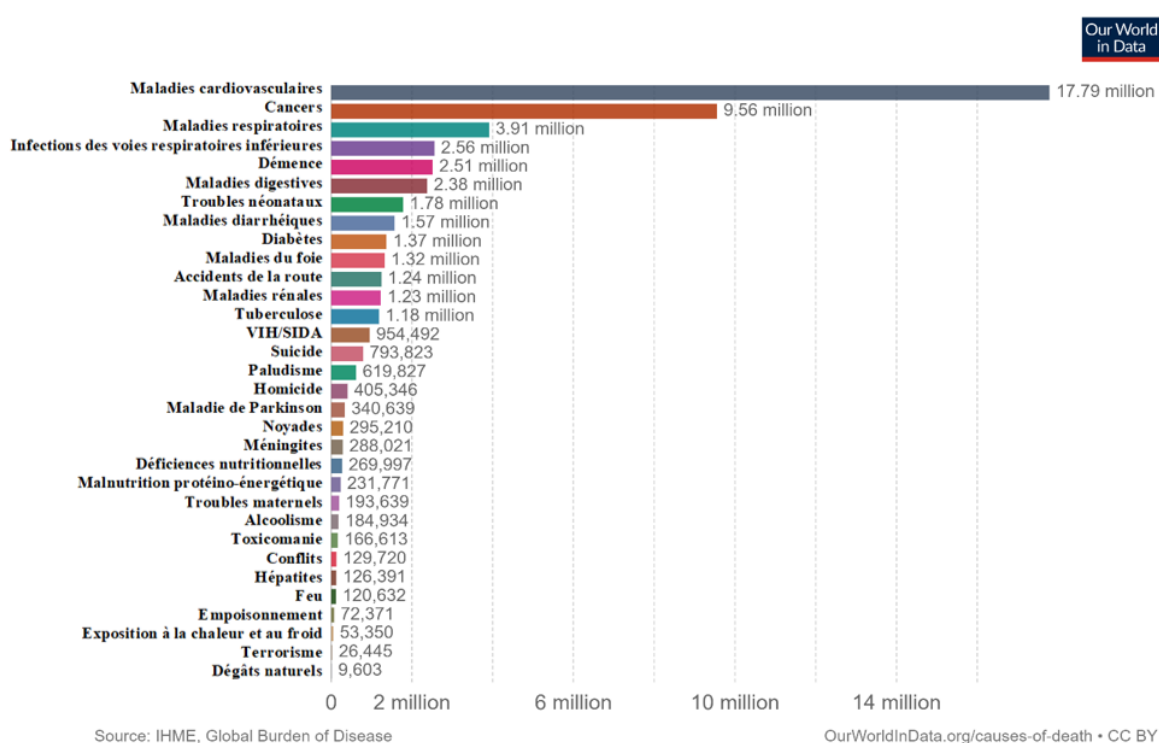


Figure 10: Causes de mortalité dans le monde en 2017.

Les données représentent le nombre de morts pour chaque cause, tout âge et sexe confondu. Modifié d'après Hannah Ritchie (2018) - "Causes of Death"; <https://ourworldindata.org/causes-of-death>.

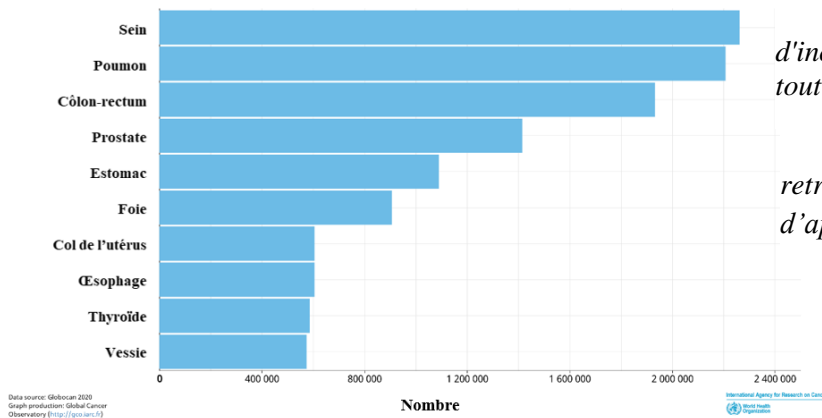


Figure 11: Estimation du taux d'incidence des cancers dans le monde, tout âge et sexe confondu.

Le cancer de la prostate se retrouve à la quatrième place. Modifié d'après GLOBOCAN 2020.

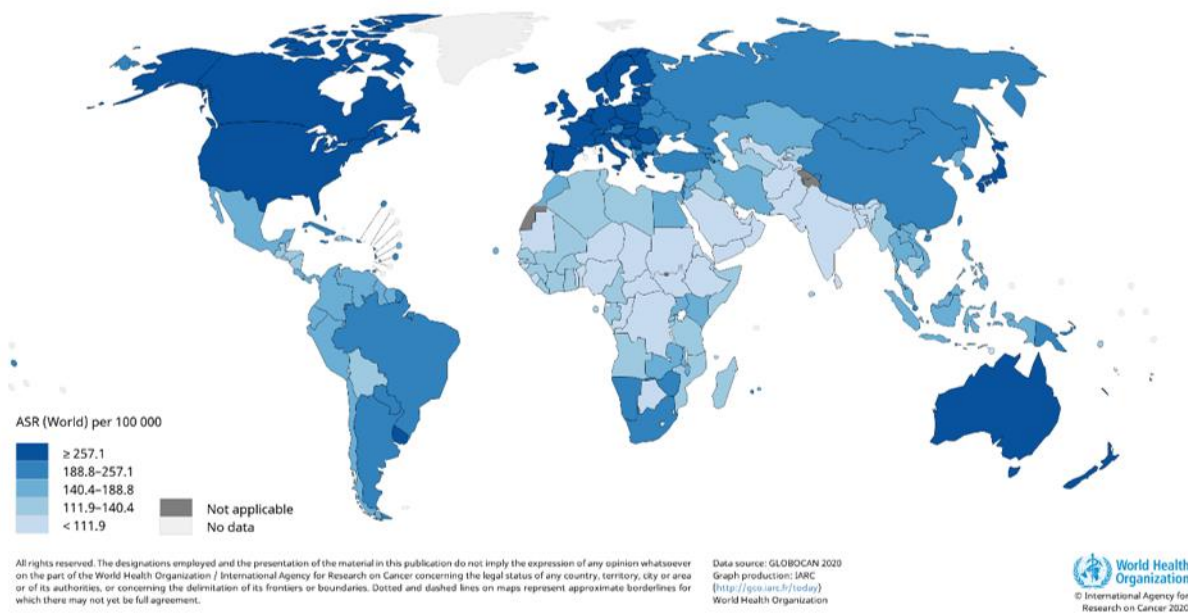


Figure 12: Estimation du taux d'incidence standardisé sur l'âge des cancers dans le monde en 2020.

D'après GLOBOCAN 2020 ; (ASR : taux spécifique à l'âge).

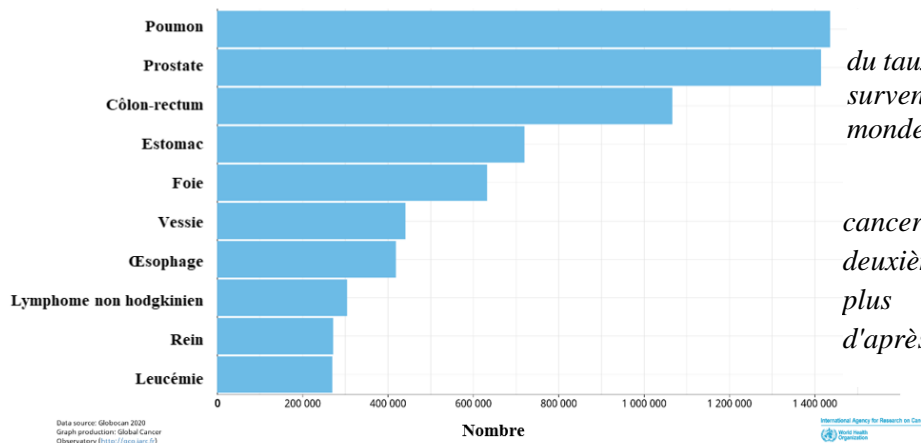


Figure 13: Estimation du taux d'incidence des cancers survenant chez l'homme dans le monde en 2020.

Dans le monde, le cancer de la prostate est le deuxième cancer touchant le plus les hommes. Modifié d'après GLOBOCAN 2020.

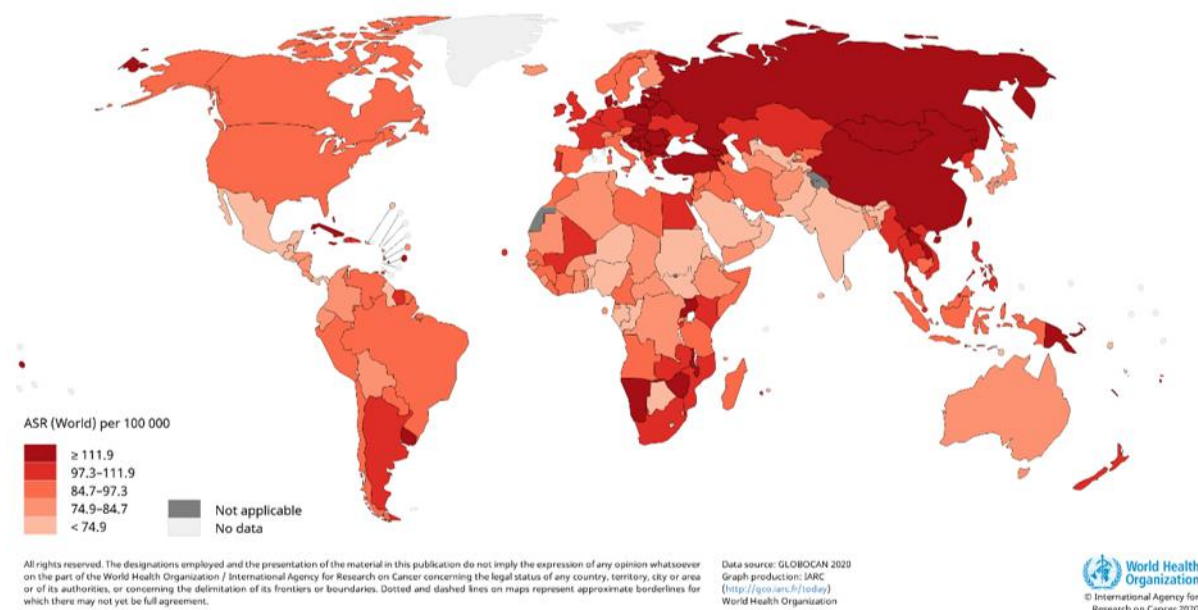


Figure 14: Estimation du taux de mortalité standardisé sur l'âge due aux cancers dans le monde en 2020.

D'après GLOBOCAN 2020 ; (ASR : taux spécifique à l'âge).

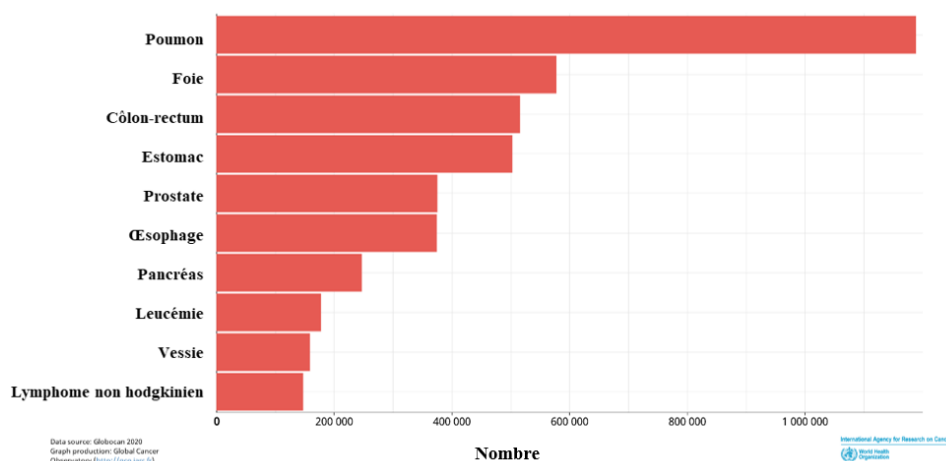


Figure 15: Estimation du taux de mortalité due à un cancer survenant chez les hommes dans le monde en 2020.

Le cancer de la prostate est le cinquième cancer le plus meurtrier. D'après GLOBOCAN 2020.

La majorité des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes (environ 95%). Ceux-ci se développent à partir des cellules épithéliales de la prostate, préférentiellement au niveau de la zone périphérique. Les autres formes de cancers de la prostate (tumeurs neuroendocrines, carcinomes des cellules basales, carcinome urothélial, tumeurs stromales prostatiques) sont beaucoup plus rares (environ 5%) et plus agressives.

Plus particulièrement, en France, d'après les dernières données épidémiologiques disponibles, les cancers sont la première cause de mortalité (**Figure 16**) et le cancer de la prostate est le cancer le plus répandu chez l'homme, devant le cancer du poumon et le cancer colorectal. En effet, il représente à lui seul près de 26% de l'ensemble des cancers incidents masculins et son incidence augmente avec l'âge : 66% des cancers survenant chez des hommes de plus de 65 ans sont des cancers de la prostate (**Figure 17**). On estime 50 430 nouveaux cas diagnostiqués en 2015 en France Métropolitaine, avec une moyenne européenne de 190 000 nouveaux cas par an. Cependant, ces chiffres subissent une relative baisse depuis quelques années (en moyenne -3.5% par an entre 2010 et 2015 en France), notamment suite à un épisode d'une forte augmentation observée en 2005, suivie d'une baisse, mais aussi grâce aux modifications de pratiques de dépistages individuels par le dosage du PSA (Tuppin, 2016).

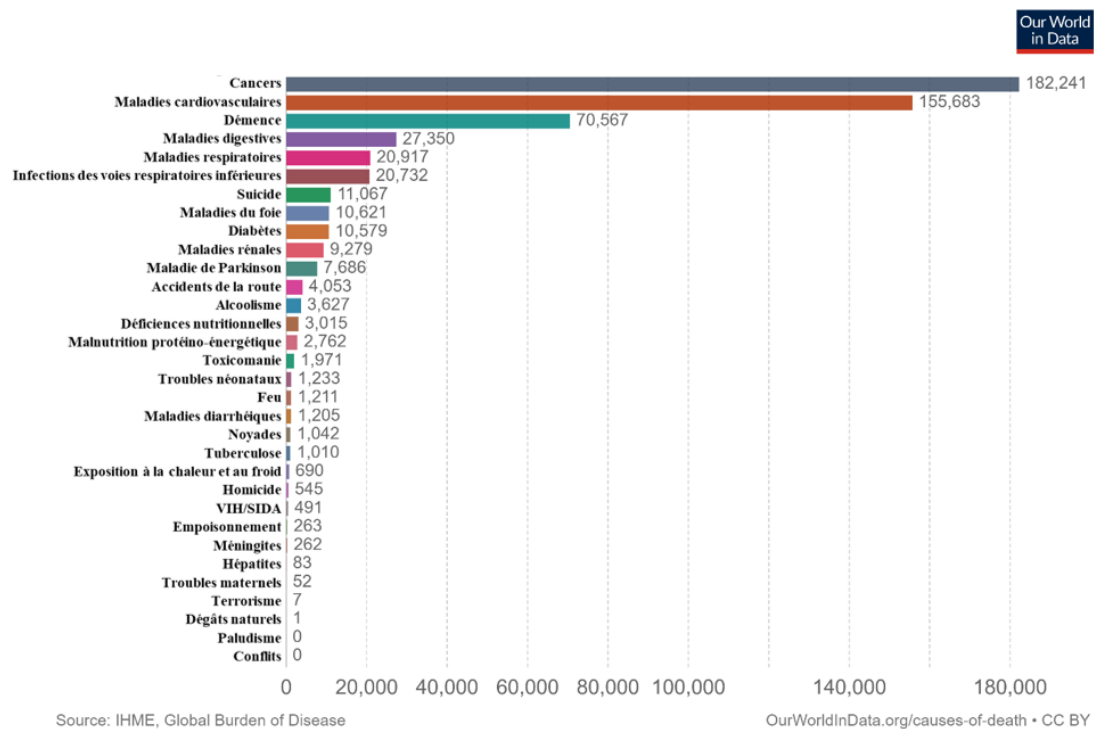


Figure 16: Causes de mortalité en France en 2017.

Les données représentent le nombre de morts pour chaque cause, tout âge et sexe confondu. Modifié d'après Hannah Ritchie (2018) - "Causes of Death"; '<https://ourworldindata.org/causes-of-death>'.

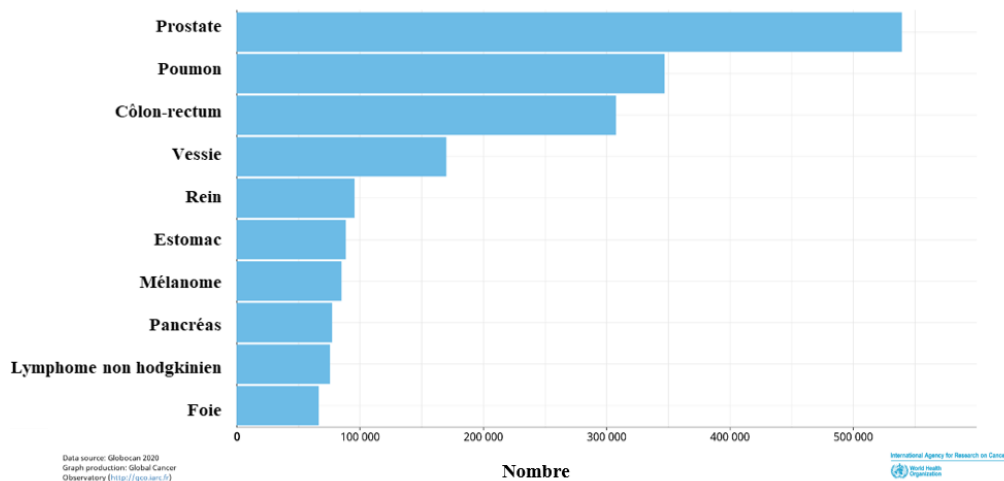


Figure 17: Estimation du taux d'incidence de cancers survenant chez les hommes en France en 2020, plaçant le cancer de la prostate à la première place.

Modifié d'après GLOBOCAN 2020.

Le cancer de la prostate se situe au troisième rang des causes de décès (8512 décès estimés en 2015), avec 79% de morts chez les hommes de plus de 75 ans (INCa) (**Figure 18**). La mortalité diminue également depuis quelques années : en moyenne -2.8% par an entre 1990 et 2018. Cette baisse s'explique d'une part par l'amélioration des traitements en ce qui concerne les cancers évolués et d'autre part par l'amélioration de l'accès au dépistage, permettant un diagnostic de certains cancers à des stades précoces, et de ce fait, curables.

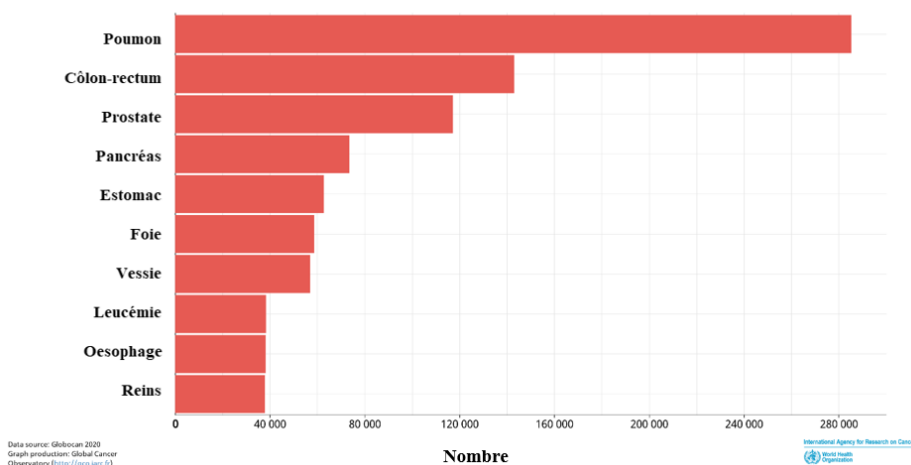


Figure 18: Estimation du taux de mortalité due à un cancer survenant chez les hommes en France.

Le cancer de la prostate est le troisième cancer le plus meurtrier en France. Les chiffres sont toutefois à la baisse depuis 1990. D'après GLOBOCAN 2020.

En France, le taux de survie nette à 5 ans pour ce cancer est de 93% et à 10 ans, de 80% (mais ce chiffre diminue lorsque le cancer est diagnostiqué chez des patients jeunes ou à un stade déjà avancé).

En termes d'incidence, il existe entre les différentes régions du monde, de grandes disparités : en effet, le taux d'incidence le plus élevé (Afro-Américains aux États-Unis) est 25 fois supérieur au taux d'incidence le plus faible (Asiatiques vivant dans leur pays d'origine) (Ferlay et al., 2015).

Toutefois, l'incidence n'est pas corrélée à la prévalence puisqu'en analysant des données d'autopsie d'hommes décédés de causes diverses dans le monde, il a été révélé des lésions cancéreuses chez 70 à 90% des hommes âgés de 80 à 90 ans, quel que soit leur appartenance ethnique ou leur origine géographique. Beaucoup d'hommes meurent avec un cancer de la prostate mais pas nécessairement à cause de ce dernier, d'où l'importance de comprendre les facteurs et mécanismes qui favorisent son agressivité (Haas & Sakr, 1997).

B. Tumorigénèse, progression du cancer de la prostate et échappement tumoral : stades d'évolution

La tumorigénèse du cancer de la prostate est un processus relativement long. Dans la plupart des cas, il s'agit d'adénocarcinomes (environ 95%), mais des formes rares telles que des carcinomes épidermoïdes à cellules squameuses ou à cellules transitionnelles, des sarcomes, des lymphomes ou des carcinomes neuroendocrines existent également. Environ 70% des cancers de la prostate se développent dans la zone périphérique, souvent dans la région postérieure (Epstein et al., 1994) et environ 20-30%, à partir de la zone transitionnelle (Bracarda et al., 2005; Sinnott et al., 2015).

Sa mise en place et sa progression sont les conséquences de plusieurs événements moléculaires et peuvent être subdivisées en quatre étapes principales : l'atrophie inflammatoire proliférative (PIA), la néoplasie intra-épithéliale (PIN), le carcinome et enfin, la dissémination métastatique (**Figure 19**) (Abate-Shen & Shen, 2000; Tomlins et al., 2007).

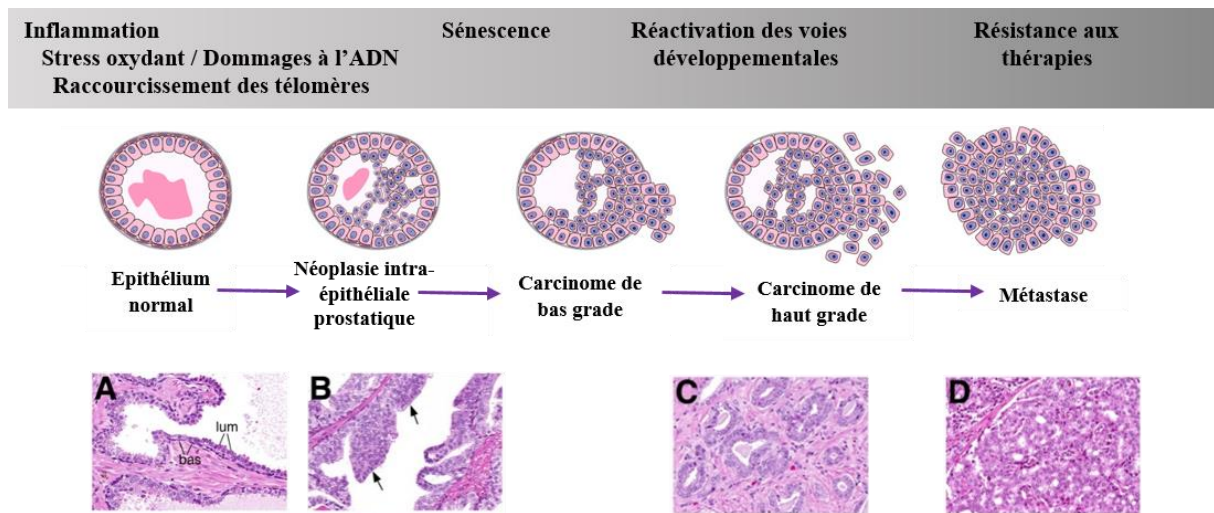


Figure 19: Les étapes de la progression du cancer de la prostate.

Modifié d'après Abate-Shen & Shen, 2000.

1. Les bases moléculaires du cancer de la prostate : les mécanismes de l'initiation et de la progression du cancer de la prostate

Certains mécanismes à la base de l'acquisition de capacités de prolifération et d'évitement de la mort cellulaire, caractéristiques de la cellule tumorale ont été mis en évidence mais ne sont toutefois pas totalement compris. Seulement quelques-uns seront abordés dans les paragraphes suivants.

a. Altérations génétiques et épigénétiques impliquées dans la progression du cancer de la prostate

i. Les oncogènes

Les oncogènes sont une catégorie de gènes impliqués dans la mise en place des cancers. Les mutations, translocations et amplifications peuvent altérer leur expression, favorisant la synthèse de protéines, appelées oncoprotéines, stimulant la division cellulaire ou inhibant la mort cellulaire, induisant ainsi la prolifération et la régulation anormales des cellules. L'expression de ces oncogènes est quasiment absente dans les cellules de la prostate saine mais ils se retrouvent surexprimés dans les cellules tumorales.

C'est le cas de bcl-2, une protéine anti-apoptotique, surexprimée dans le cancer de la prostate. Cette surexpression est le résultat de l'amplification du gène (Nupponen & Visakorpi, 1999). Sa surexpression est corrélée à la progression du cancer de la prostate (Bubendorf et al., 1996). L'augmentation de l'expression de l'oncogène c-myc a également été mise en évidence et est corrélée au score de Gleason. C'est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et dans l'apoptose des cellules de la prostate (Grandori et al., 2000). Enfin, STAT5 (signal transductor activator of transcription 5) est un facteur de survie important dans la cellule tumorale. Son activation est corrélée au grade du cancer de la prostate (Li et al., 2004).

Les oncogènes joueraient également un rôle dans l'altération du métabolisme lipidique dont nous parlerons plus tard.

ii. Les gènes suppresseurs de tumeur

Également appelés anti-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur sont des régulateurs négatifs de la prolifération. Par conséquent, leur perte de fonction par délétion ou mutation participe également au développement des cancers. L'un des plus importants dans le cancer de la prostate, gstp1 (Glutathione S-transférase 1), est impliqué dans la prévention des dommages à l'ADN en détoxifiant les cellules des produits oxydants (Nelson et al., 2001). Sa perte de fonction pourrait être la cause de l'augmentation du stress oxydant survenant au cours du vieillissement dans la prostate. PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) est également un gène suppresseur de tumeur. Ce gène est inactivé dans 30 à 70% des cancers de la prostate: la perte d'un allèle de PTEN survient dans la plupart des cancers primaires de la prostate et une délétion homozygote est retrouvée dans environ 70% des cancers avancés de la prostate (Cairns et al., 1997; Gray et al., 1995; Komiya et al., 1996; Shen & Abate-Shen, 2010; Suzuki et al., 1998; Whang et al., 1998). L'action de PTEN passe par l'inhibition de la voie de signalisation PI3K-Akt, impliquée dans la survie cellulaire, et sa perte de fonction a des impacts assez importants sur la progression tumorale (**Figure 20**). P53, un facteur de transcription capable de se lier de manière spécifique à l'ADN, est également souvent inactivé ou muté dans les cancers avancés de la prostate. Sa mutation est retrouvée dans 26% des cancers de la prostate (Navone et al., 1999; Schlechte et al., 1998). Ce gène est impliqué dans l'apoptose des cellules ayant subi des dommages à l'ADN en leur empêchant l'entrée en phase S du cycle cellulaire ; sa perte de fonction entraîne les cellules dans une croissance incontrôlée (Gao et al., 1997; Shen &

Abate-Shen, 2010). Des analyses de séquençage ont montré une co-délétion ou une co-mutation de PTEN et P53 dans des cancers de la prostate agressifs, létaux et résistants à la castration (Grasso et al., 2012). Par ailleurs, d'autres études ont montré que la perte de PTEN et de P53 conférait une faible survie pour les patients (Markert et al., 2011).

Enfin, l'inactivation par phosphorylation de pRb, mise en évidence dans plusieurs cancers dont le cancer de la prostate (Bookstein et al., 1990; Hanahan & Weinberg, 2000), entraîne une stimulation de la transcription de gènes impliqués dans la transition G1/S, et ainsi, la prolifération anarchique des cellules.

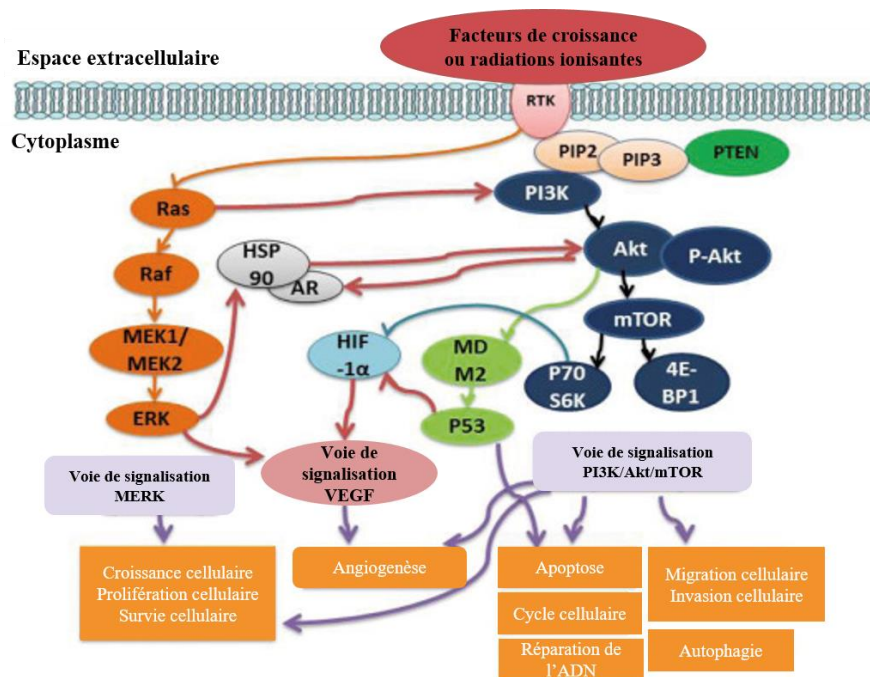


Figure 20 : L'activation d'Akt médie la tumorigénèse et la résistance thérapeutique à travers plusieurs mécanismes.

Modifié d'après (Chang et al., 2015).

iii. Altération des gènes régulant la prolifération et l'apoptose

Des conséquences des deux points abordés ci-dessus sont la prolifération anormale des cellules ainsi qu'une capacité à éviter la mort cellulaire, notamment l'apoptose. L'évitement de l'apoptose dans les cellules passerait entre autre par la surexpression de Bcl2 précédemment abordée. En effet, dans la prostate normale, son expression est limitée aux cellules basales (Hockenbery et al., 1991) , sa surexpression dans les cellules de carcinomes de la prostate

LNCaP protège ces dernières de l'apoptose induite par une déplétion androgénique (Raffo et al., 1995). De plus, un lien entre la résistance à la chimiothérapie et la surexpression de Bcl-2 a été mise en évidence, faisant de Bcl-2, une caractéristique d'un cancer de la prostate avancé et réfractaire aux hormones (McDonnell et al., 1997; Tu et al., 1995).

La prolifération anormale et anarchique des cellules lors de la carcinogénèse est soutenue par des dérégulations au niveau des voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération cellulaires mais aussi dans l'apoptose. Ainsi, des altérations des voies de signalisation PI3K/Akt, et Myc précédemment abordés, mais aussi des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), ont été mises en évidence dans le cancer de la prostate. En effet, l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt est retrouvée dans la plupart des tumeurs solides et promeut la survie comme dit précédemment, mais également l'adhésion, la migration, l'invasion et l'angiogénèse (Bader et al., 2005; Karar & Maity, 2011). Aussi, une altération de la voie des MAPK est retrouvée dans environ 5% des tumeurs primaires et dans environ 8% des métastases (Armenia et al., 2018).

iv. L'altération de AR

Le cancer de la prostate est un cancer androgéno-dépendant (Huggins & Hodges, 1972). En effet, les androgènes sont nécessaires à la physiologie de la glande prostatique mais sont également cruciaux pour la survie des cellules tumorales. AR est un facteur de transcription régulant l'expression de gènes (EGF-R, c-myc, cavéoline-1) impliqués dans la mise en place et la progression du cancer de la prostate (Suzuki et al., 2003). En effet, ces gènes sont impliqués dans la survie, la prolifération et l'invasion cellulaire (Bernard et al., 2003; Li et al., 2001; Tørring et al., 2003, p. 1). La stabilité de AR, sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle sont augmentées suite à des mutations et des modifications post-traductionnelles (Abate-Shen & Shen, 2000; Gioeli et al., 2006). Par ailleurs, les androgènes, via leur récepteur régulent également l'apoptose des cellules prostatique en régulant négativement l'accumulation des céramides, sphingolipides (Eto et al., 2003). AR est souvent surexprimé dans les premiers stades de la tumorigénèse prostatique et est également impliqué dans les phénomènes de résistance aux thérapies (Grasso et al., 2012; Robinson et al., 2015).

L'augmentation de l'activité de AR est en partie responsable des fusions des gènes *E-twenty six* (ETS) dont nous parlerons dans le prochain paragraphe.

v. Les fusions TMPRSS2-ERG

Il s'agit de fusions entre TMPRSS2, un gène régulé par les androgènes et le plus souvent, le gène ERG (*ETS-related gene*) appartenant à la famille des facteurs de transcription ETS. Ces altérations chromosomiques sont souvent retrouvées dans les tumeurs solides humaines (Clark et al., 2007, 2008), et plus particulièrement dans le cancer de la prostate. En effet, 70% des cancers de la prostate présentent ces fusions (Petrovics et al., 2005).

L'ADN nucléaire est principalement au centre de ces dérégulations. Cependant, des dérégulations intervenant au niveau de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont également été mis en lien avec l'initiation et la progression du cancer de la prostate. Nous en parlerons dans la deuxième partie de cette introduction bibliographique.

vi. Les altérations épigénétiques

Les marques épigénétiques sont des résultats de mécanismes réversibles, transmissibles et adaptatives modifiant l'expression des gènes sans pour autant changer la séquence génomique (Bošković & Rando, 2018). Ainsi, un même génome peut s'exprimer différemment en fonction des modifications épigénétiques, ce qui explique les différences existant entre des jumeaux partageant le même génome. Les modifications épigénétiques sont induites par l'environnement (cellulaire mais également nos comportements : stress, alimentation, tabagisme). Elles se manifestent par des méthylations, acétylations sur l'ADN ou sur les protéines structurales de l'ADN (Deans & Maggert, 2015).

Des modifications épigénétiques ont été mises en évidence dans plusieurs pathologies dont le cancer, notamment les cancers solides dont le cancer colorectal où leurs rôles sont bien établis. De même, dans le cancer de la prostate, des marqueurs épigénétiques ont été associés au statut des récepteurs androgéniques et à la réponse au traitement (Saramäki et al., 2006; van Leenders et al., 2007; Wu et al., 2015). De plus, les modifications de gènes comme PTEN, Wnt ou intervenant également au niveau des télomères, précédemment abordées peuvent être les résultats d'altérations épigénétiques (Covey et al., 2007; Jafri et al., 2016; Murillo-Garzón & Kypta, 2017). Par ailleurs, l'inflammation, un processus réglant la tumorigénèse prostatique, et qui sera abordée dans le prochain paragraphe, est également liée à des modifications épigénétiques (de Santa et al., 2007).

b. Processus majeurs régulant la tumorigénèse prostatique

Ces modifications au niveau des gènes énoncées ci-dessus en plus de celles non citées (altération de la voie de signalisation des MAPK par exemple) ont pour conséquence des processus intervenant dans la mise en place et la progression du cancer de la prostate tels que l'inflammation, la sénescence, la réactivation des voies développementales etc. Ces derniers influent également en retour sur la régulation de l'expression des gènes précédemment cités.

i. L'inflammation

Le début de la carcinogénèse prostatique ainsi que sa progression sont caractérisés par un statut inflammatoire bien établi (Bardia et al., 2009; De Marzo et al., 2003, 2007; Haverkamp et al., 2008; Klein & Silverman, 2008), mis en évidence par la présence de certaines chimiokines (comme par exemple l'interleukine 5 (IL-5), *C-X3-C Motif Chemokine Ligand* (CX3CL1)). L'expression de ces dernières permet de prédire l'évolution du cancer de la prostate après une prostatectomie (Blum et al., 2008).

ii. Le stress oxydant

L'âge est le facteur le plus important dans le cancer de la prostate, du fait de son effet sur le statut d'oxydation des cellules (DeWeese et al., 2001; Khandrika et al., 2009; Minelli et al., 2009). Ce dernier paramètre serait également à la base de la carcinogénèse prostatique. Le stress oxydant est induit par une dérégulation de l'équilibre entre les espèces oxygénées réactives (ROS) créant des dommages (lipidiques, protéiques et génomiques), et les enzymes responsables de la détoxification. Comme évoqué précédemment, il a été reporté une diminution de l'expression de protéines intervenant dans la détoxification de la cellule dans le cancer de la prostate. En effet, l'expression de ces enzymes (superoxydes dismutases 1 et 2 (SOD1 et 2), est diminuée dans les phases intermédiaires (néoplasie intra-épithéliales et carcinome) ; leur diminution est corrélée à une augmentation des adduits oxydés de l'ADN (Bostwick, Alexander, et al., 2000) . De plus, la fusion des gènes précédemment abordée pourrait être une conséquence du stress oxydant (Mani et al., 2016).

iii. La sénescence cellulaire

La sénescence est un processus physiologique à l'origine du vieillissement cellulaire. La sénescence n'est pas une mort cellulaire en tant que telle : en effet, les cellules survivent

mais perdent leur capacité à se diviser par un arrêt de leur cycle cellulaire. Il se produit alors une lente dégradation des fonctions cellulaires (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Courtois-Cox et al., 2008; d'Adda di Fagagna, 2008; Evan & d'Adda di Fagagna, 2009). La sénescence a été décrite à la fois comme étant induite par des oncogènes (par la formation des ROS par exemple), mais également comme un phénomène suppresseur de tumeurs, ce qui pourrait expliquer les différences entre les cancers latents et les cancers agressifs (Calcinotto et al., 2019; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Reimann et al., 2010; Serrano et al., 1997).

La sénescence est la mort privilégiée en radiobiologie ; un des buts recherchés en radiobiologie étant d'empêcher les cellules cancéreuses de se diviser. En effet, les dommages induits à l'ADN suite à une irradiation et non réparables par la cellule vont induire l'activation constitutive de la voie ATM-P53-P21, aboutissant à un arrêt définitif du cycle cellulaire en phase G1 (Sabin & Anderson, 2011).

iv. Les télomères

Les télomères sont les extrémités des chromosomes, des régions répétitives, à priori non codantes, essentielles au maintien de l'intégrité de l'ADN. Ils raccourcissent avec l'âge, l'inflammation et les dommages à l'ADN. Des études ont montré une corrélation positive entre la présence de télomères courts et un risque élevé de développer des maladies liées à l'âge. Ainsi, même dans un contexte inflammatoire, rappelons-le, présent dans la carcinogenèse prostatique, et malgré les divisions cellulaires illimitées, induisant potentiellement un raccourcissement des télomères, les cellules échappent à la mort cellulaire tout en ayant des télomères courts mais stables, ceci par l'activité des oncogènes. Plus précisément dans le cancer de la prostate, il a été mis en évidence une anomalie de la longueur des télomères. Ceci serait un événement précoce survenant dans l'initiation de la tumorigénèse prostatique (Meeker et al., 2002, 2004). Les télomérases sont des enzymes responsables du maintien de la stabilité des télomères. L'expression du gène codant la télomérase ainsi que l'activité des télomérases sont augmentées dans la progression de la pathologie, permettant aux cellules de pouvoir se diviser indéfiniment (Jafri et al., 2016; Koeneman et al., 1998).

v. La réactivation des voies développementales

Il a été mis en évidence une reprogrammation génique dans la carcinogénèse prostatique. En effet, plusieurs études ont montré une forte expression de gènes impliqués dans l'organogénèse de la prostate (Pritchard et al., 2009; Schaeffer et al., 2008). C'est l'exemple de la voie de signalisation wnt/ β -caténine (Wang et al., 2008) toutefois controversée par la mise en évidence d'une corrélation inverse entre l'activation de cette voie et la progression du cancer de la prostate. La voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh), jouant un rôle clé dans l'organogénèse, semble également être activée, même si le mécanisme n'est pas totalement élucidé (Karhadkar et al., 2004; Sanchez et al., 2004; Yauch et al., 2008, p. 200). Enfin, l'activation de la voie de signalisation du FGF (*Fibroblast Growth Factor*), responsable de l'activation des MAPK, intervenant également dans la tumorigénèse prostatique, a été également démontrée dans la mise en place et la progression du cancer de la prostate (Acevedo et al., 2007; Memarzadeh et al., 2007).

Nombreux sont les mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de la tumorigénèse prostatique. Plusieurs mécanismes restent toutefois à élucider, mais au vu des données, les cancers et plus particulièrement dans notre cas, le cancer de la prostate, sont une résultante de ces dérèglements qui peuvent survenir concomitamment ou se suivre, faisant ainsi entrer la cellule dans une boucle ; ces différents événements pouvant être les causes et les conséquences des uns et des autres.

2. Les étapes de la carcinogénèse prostatique

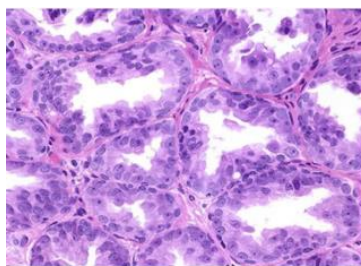
a. L'atrophie inflammatoire proliférative

Il s'agit de lésions hypertrophiques corrélées à la prolifération de l'épithélium glandulaire, une atrophie du stroma associée à de l'inflammation et une fibrose (De Marzo et al., 1999). La PIA est souvent localisée à la périphérie de la glande et il a été observé des transitions vers des stades pré-malins, ce qui suggèrerait une connexion entre PIA et cancer. Cependant, du fait de manque de données moléculaires avérés, son implication dans la cinétique de la carcinogénèse est souvent remise en question (Tomlins et al., 2007). Cette étape, proposée comme une réponse proliférative aux dommages environnementaux, reste toutefois caractérisée par une dérégulation de la balance prolifération/mort cellulaire, des anomalies moléculaires dues au stress oxydant, mais aussi, par une infiltration de cellules inflammatoires

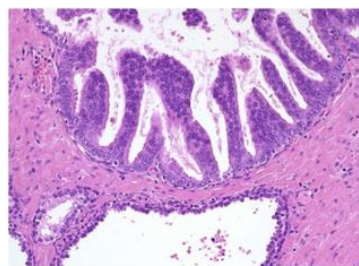
(mononucléaires et ou polynucléaires neutrophiles) à la fois dans l'épithélium et le stroma (Joshua et al., 2008).

b. La néoplasie intra-épithéliale (PIN)

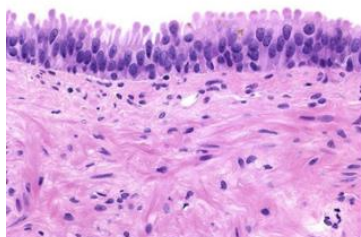
La PIN correspondrait à l'ensemble des lésions initiatrices de l'adénocarcinome prostatique : la transition entre l'épithélium sain et la PIN fait intervenir plusieurs altérations qui se mettraient en place durant cette étape (Tomlins et al., 2007). En effet, les PIN et carcinomes sont caractérisés par des similarités cytologiques et des altérations et marques génétiques communes. Cette étape est caractérisée par la désorganisation de l'épithélium, la présence d'un nucléole proéminent ainsi que l'élargissement du noyau au sein de la cellule et l'augmentation de la densité du cytoplasme, la rendant facilement identifiable. Quatre architectures différentes des PIN ont été mises en évidence : en touffe, micropapillaire, cribiforme et plate (**Figure 21**). Ces quatre formes majeures n'influent cependant pas sur le pronostic (Abate-Shen & Shen, 2000; Bostwick, Liu, et al., 2004). Les PIN peuvent également être classées en lésions de bas grade (LGPIN : *low grade PIN*) et en lésions de haut grade (HGPN : *high grade PIN*), en fonction de leurs caractéristiques histologiques et cytologiques. Les HGPN sont constituées des PIN de grade 2 et 3, souvent associés au cancer de la prostate et considérés comme facteur de risque et des lésions précancéreuses (Bostwick, Burke, et al., 2004; Bostwick, de La Roza, et al., 2003; Bostwick, Qian, et al., 2003; Joniau et al., 2005, p. 200; McNeal & Bostwick, 1986).



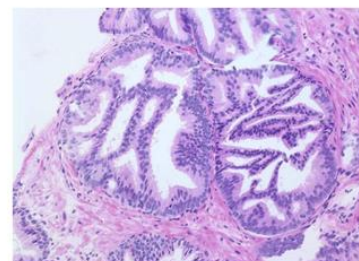
En touffe



Micropapillaire



Plate



Cribiforme

Figure 21: Les différentes architectures des PIN mises en évidence dans le cancer de la prostate.

Les différents phénotypes histologiques des PIN montrent quatre formes majeures : en touffe, micropapillaire, plate et cribiforme.

c. Le carcinome

Le carcinome et les HGPIN présentent des altérations semblables, notamment concernant les marqueurs de différenciation ainsi que les anomalies chromosomiques mais contrairement aux HGPIN, les carcinomes se caractérisent par une rupture de la lame basale. La très forte activité de prolifération des cellules épithéliales basales et luminales, induit une augmentation des sécrétions prostatiques (phosphatase acide prostatique, β -inhibine) et de marqueurs de diagnostic comme le PSA (détectable au niveau plasmatique) ainsi que des marqueurs d'agressivité. Lorsque le cancer devient plus agressif, ces cellules iront envahir le tissu de soutien ainsi que les acini adjacents et les organes voisins (vésicules séminales, vessie ou rectum), créant ainsi des métastases (Wittekind et al., 2002).

d. La dissémination métastatique

C'est le stade ultime des cancers de la prostate. La perte d'adhérence des cellules tumorales entre elles d'une part et entre elles et la matrice extracellulaire d'autres part, permet la dissémination des cellules dans les systèmes sanguins et lymphatiques, leur permettant de former d'autres tumeurs à distance de la tumeur primaire. Les métastases du cancer de la prostate sont souvent retrouvées au niveau des poumons, des glandes surrénales, du foie, des ganglions lymphatiques, des os et du cerveau. L'os reste le site préférentiel de métastases chez l'homme (environ 90% des cas) (Bubendorf et al., 2000; Salvati et al., 2005; Tantivejkul et al., 2004; Zeng et al., 2005). Plusieurs mécanismes sont à la base de la dissémination métastatique.

i. La Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

L'idée que des cellules épithéliales puissent perdre leurs caractéristiques pour acquérir celles de cellules mésenchymateuses a émergé dans les années 1980 suite aux observations d'Elizabeth Hay (Hay, 1995). La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus biologique par lequel les cellules épithéliales acquièrent la capacité de migrer et d'envahir d'autres tissus. Il s'agit en effet d'une reprogrammation génétique qui permet à des cellules épithéliales d'acquérir un phénotype mésenchymateux, perdant ainsi leur interaction cellule-cellule, leur polarité apico-basale, subissant une réorganisation du cytosquelette, un changement de forme cellulaire, acquérant des capacités à dégrader la matrice cellulaire ainsi

que des propriétés migratoires. Elles conservent toutefois certaines caractéristiques épithéliales. La TEM implique la perte d'expression de gènes responsables du phénotype épithélial (cadhérine E, occludine, claudine) et la promotion de l'expression de gènes impliqués dans le phénotype mésenchymateux (cadhérine N, vimentine, fibronectine) (Xu et al., 2009). Toutes les cellules épithéliales n'en sont cependant pas capables (Lamouille et al., 2014).

La TEM met en jeu la coopération de plusieurs voies de signalisation (PI3K/Akt, MAPK, Wnt) et des acteurs dont le TGF- β , impliqués dans la modulation de plusieurs facteurs de transcription tels que SNAIL, SLUG, TWIST impliqués dans la régulation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux (**Figure 22**) (Peinado et al., 2007). Par ailleurs, il a été démontré que la mise en place de la TEM était corrélée à une résistance à la sénescence et à l'apoptose (Thiery et al., 2009).

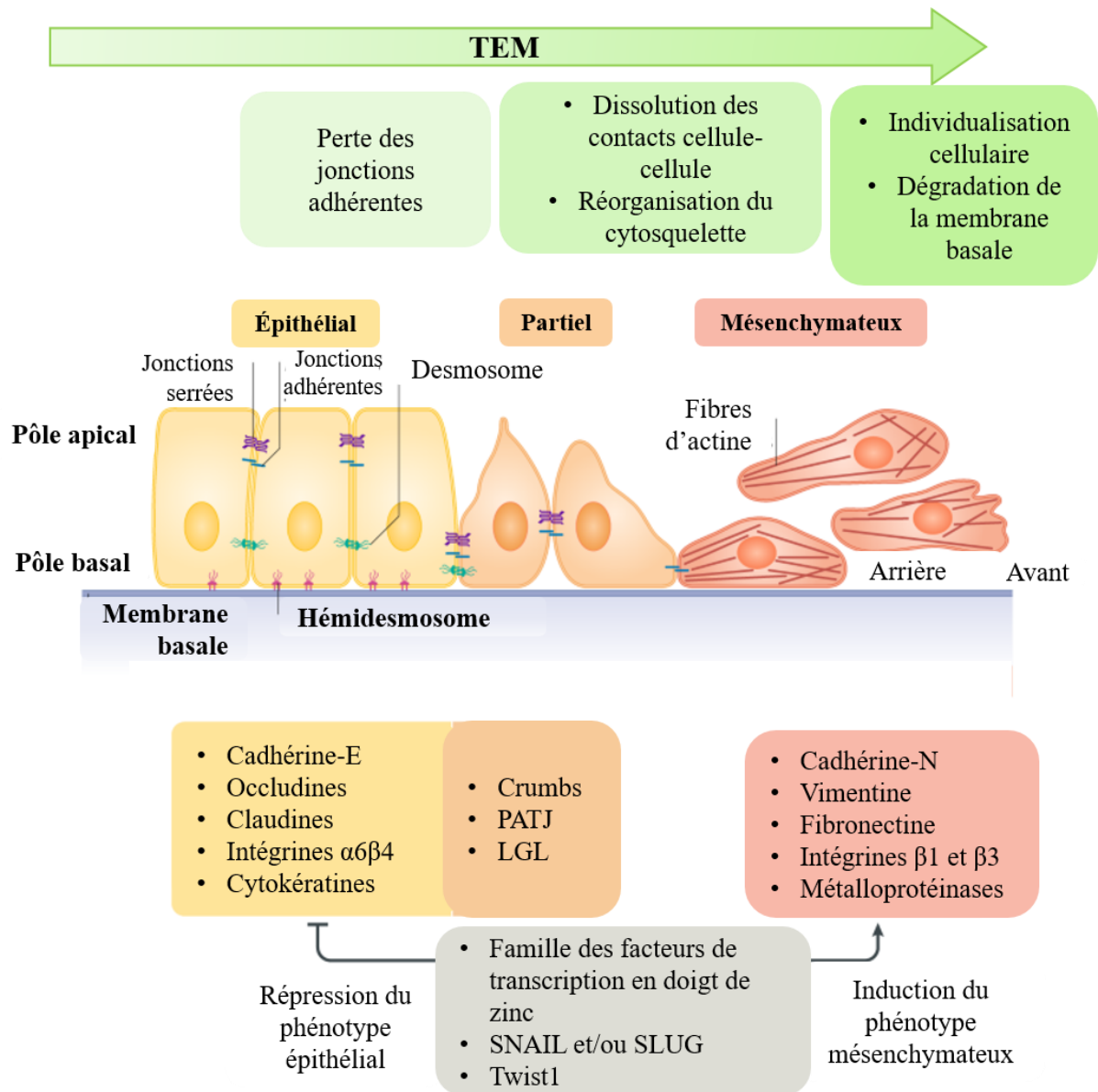


Figure 22: Mécanismes et acteurs impliqués dans le déroulement de la transition épithélio-mésenchymateuse.

PATJ: PALS1-associated tight-junction protein. LGL: Letal Giant Larvae. Crumbs et PATJ font partie du complexe Crumbs qui définit le compartiment apical et LGL fait partie du complexe Scribble qui définit le compartiment basal. Modifié d'après Dongre & Weinberg, 2019.

ii. Le rôle du stroma et du microenvironnement

Le remodelage de la matrice au niveau de sa composition et de son organisation est essentiel à la dissémination des cellules. En effet, il permet la survie et la dissémination des cellules tumorales. Ainsi, les métalloprotéinases (MMP), des sérine-protéases et les

endopeptidases zinc-dépendantes sont entre autres responsables de la dégradation de la lame basale et de la matrice cellulaire (Kessenbrock et al., 2010). MMP2 et MMP9 sont impliquées dans l'invasion et la dissémination des cancers de la prostate (Brehmer et al., 2003; London et al., 2003; Mehta et al., 2003). En effet, le microenvironnement joue un rôle non négligeable dans la physiologie des tissus sains mais aussi pathologiques : lors d'expérimentations au cours desquelles des cellules DU145, de phénotype épithélial, ont été mises en interaction avec des fibroblastes, il a été observé une modification de la matrice extracellulaire et une accélération des capacités invasives des cellules DU145. La production de protéines matricielles structurales, de facteurs de croissance et de métalloprotéinases matricielles par les fibroblastes a permis cela (Ojalill et al., 2020).

Durant la progression tumorale, le stroma devient également réactif et présente un état semblable à un tissu blessé en cours de réparation. Plusieurs voies de signalisation et de production de facteurs de croissance sont altérées au cours de ce processus, et responsables de la production de TGF- β , des cytokines, de la vimentine, favorisant ainsi l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) et la TEM (Andersen et al., 2018; Dakhova et al., 2009). L'angiogenèse est un processus essentiel à la survie des tumeurs et concomitant à leur formation. La balance existant entre la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et les facteurs anti-angiogéniques se retrouve dérégulée et en faveur de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF (également régulé par AR (Joseph et al., 1997)), PDGF, HGF. Les facteurs anti-angiogéniques (angiotensine, TSP1) quant à eux se retrouvent inhibés (Russo et al., 2012). Les MMP interviennent également dans la formation des nouveaux vaisseaux en dégradant la matrice extracellulaire, participant ainsi, également au statut inflammatoire qui se met en place lors de la tumorigénèse.

Enfin, l'infiltration des tumeurs par des cellules immunitaires permet le maintien ou la dissolution de ce microenvironnement inflammatoire (Hanahan & Weinberg, 2011). En effet, par la production de chimiokines ou de cytokines, de facteurs de croissance, des ROS, les cellules immunitaires communiquent et interagissent avec les cellules tumorales. Ainsi, par exemple, la présence de TGF- β influe sur les capacités pro et antitumorales des neutrophiles (Fridlender et al., 2009). De même, l'expression de AR par des macrophages ayant infiltré l'environnement tumoral impacte positivement l'acquisition de capacités migratoires et invasives par les cellules cancéreuses de la prostate (Cioni et al., 2020). En somme, le microenvironnement tumoral est effectivement composé de différents types de cellules, y

compris des cellules mésenchymateuses et cellules immunitaires résidentes et infiltrantes. Cette dernière catégorie de cellules regroupe les cellules de l'immunité acquise mais aussi de l'immunité innée, qui selon les facteurs environnementaux vont agir comme des facteurs pro-tumoraux en induisant une inflammation ou anti-tumoraux en activant l'immunité tumorale. La balance entre ces deux événements déterminera la progression de la carcinogenèse (Corn, 2012; Lin & Karin, 2007; Wang et al., 2017).

iii. La colonisation métastatique

C'est l'étape ultime de la dissémination métastatique. Les cellules tumorales en subissant la TEM acquièrent ainsi des capacités leur permettant de traverser les parois des vaisseaux sanguins afin de former des métastases. Le principal site de formation de métastases du cancer de la prostate est l'os (**Figure 23**). En effet, l'interaction entre la chimiokine CXCL12 et son récepteur CXCR4 induite par SLUG, permet la migration des cellules tumorales prostatiques vers l'os, ceci, par l'activation d'Akt-1 et de MMP9 (Chinni et al., 2006; Uygur & Wu, 2011).

Toutefois, toutes les cellules ayant traversé les vaisseaux ne parviennent cependant pas toutes à coloniser de site à distance de la tumeur primaire. En effet, certaines sont éliminées par le système immunitaire. Dans ce contexte, le microenvironnement a également son importance : une autre partie des cellules peuvent entrer dans un état de dormance pouvant durer plusieurs années, dû au manque de facteurs nécessaires à leur prolifération dans le nouvel microenvironnement ou par l'action de facteurs du nouvel microenvironnement qui le maintiennent dormantes. Dans l'os, plusieurs facteurs comme BMP7 (Bone Morphogenetic Protein), un membre de la superfamille du TGF- β , ou WNT5A ont été mis en évidence dans la dormance des cellules tumorales (Kobayashi et al., 2011; Ren et al., 2019).

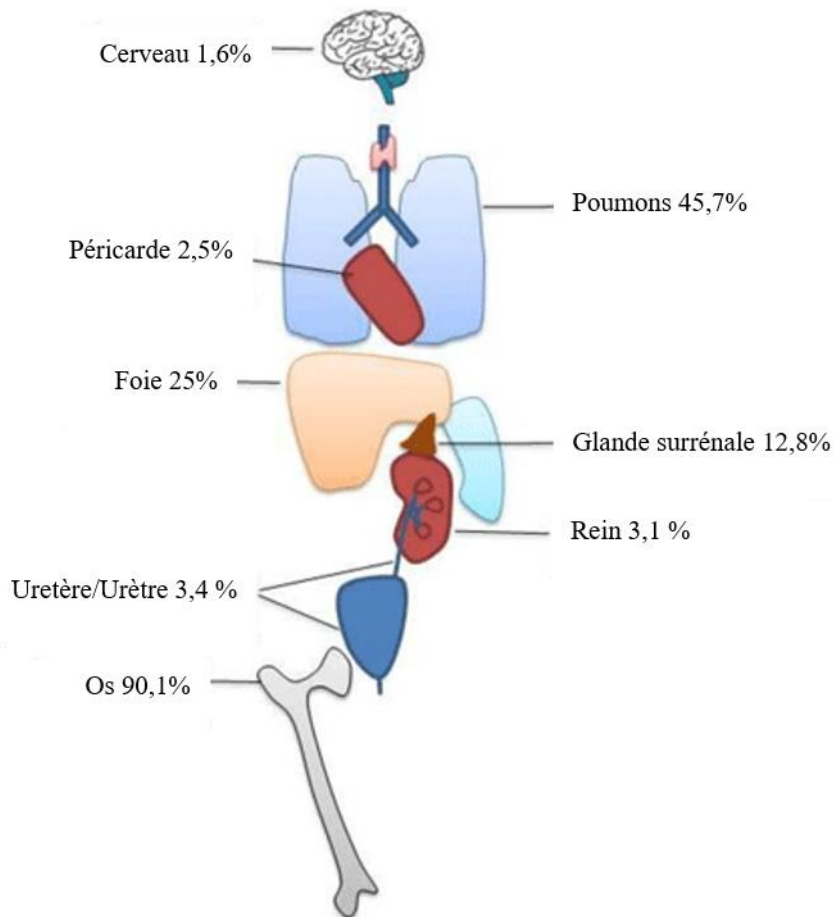


Figure 23: Principaux sites métastatiques du cancer de la prostate.

D'après Pasoglou et al.,2016.

C. Facteurs de risque et d'agressivité

Le bon fonctionnement de l'organisme est assuré entre autres, par une balance entre la survie et la mort cellulaire. Cette balance peut être influencée dans un sens comme dans l'autre par divers événements. Dans le cas des cancers, comme évoqué ci-dessus, ces événements peuvent faire intervenir des oncogènes, des altérations géniques, des anomalies dans l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, mais également des altérations épigénétiques ou encore métaboliques. L'environnement tumoral a également son importance dans le processus de tumorigénèse. Ainsi, l'accumulation progressive de ces différents événements initierait la tumorigénèse. La diversité des cancers, tant au niveau du tissu ou de l'organe touché, qu'au niveau des facteurs mis en jeu, mais également au niveau de l'individu atteint, rend cette pathologie particulièrement difficile à définir. Toutefois, six caractéristiques ou encore

« *hallmarks* » ont été déterminés et permettent de mettre en évidence des points communs entre les différents cancers (Hanahan & Weinberg, 2000). Elles regroupent :

- une autosuffisance vis-à-vis des signaux de prolifération
- une insensibilité face aux signaux antiprolifératifs
- un évitement de l'apoptose
- une induction de l'angiogenèse
- un potentiel répliatif illimité
- une capacité d'invasion des tissus et de formation de métastases

Une meilleure compréhension de la complexité des mécanismes de régulations et des différentes interactions survenant dans le microenvironnement tumoral a permis de mettre à jour les précédents points et d'en proposer quatre nouveaux :

- les dérégulations du métabolisme énergétique
- les mutations et instabilités génomiques
- l'inflammation pro-tumorale et
- la capacité d'échapper au système immunitaire

Ces *hallmarks* sont présentées dans la **Figure 24** (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

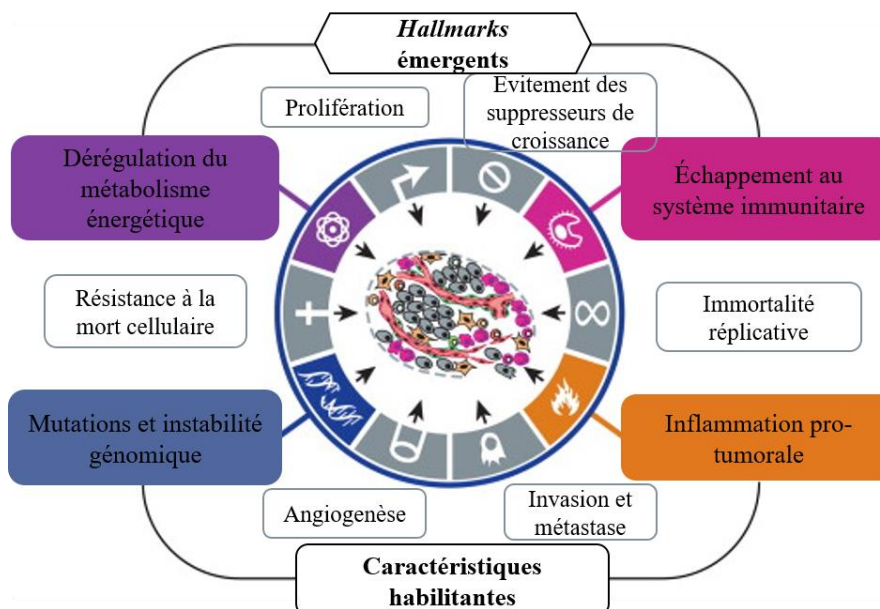


Figure 24: "Hallmarks" des cancers.

Modifié d'après Hanahan & Weinberg, 2011

D'une manière générale, la cellule tumorale provient d'une cellule saine, qui suite à des stress de diverses natures, se retrouve avec un potentiel de prolifération et de survie accrue, d'une résistance à la mort cellulaire, puis par la suite d'une capacité à migrer et envahir d'autres tissus ou organes. Ces cellules tumorales, grâce à ces dernières capacités vont ainsi former des tumeurs au-delà de l'organe ou du tissu dont elles proviennent : c'est la formation des métastases, un des signes de leur agressivité. Parmi les stress responsables de ces transformations, seuls quatre ont été clairement établis comme facteurs de risque ; ils sont intrinsèques au patient et ne peuvent donc pas être modifiés : ce sont l'âge, l'origine ethnique, les antécédents familiaux de cancers de la prostate et les prédispositions génétiques. Cependant, de nombreuses études suggèrent l'implication de facteurs dits extrinsèques, car plutôt liés à l'environnement qu'au patient et qui pourraient donc être potentiellement modifiables. L'association des facteurs génétiques et environnementaux pourrait expliquer les variations ethniques et géographiques de l'incidence des cancers de la prostate.

1. Les facteurs endogènes ou intrinsèques

a. L'âge

Il a été démontré que la survenue d'un cancer dans un tissu était corrélée de façon très significative au nombre de divisions cellulaires des cellules souches présentes dans ce tissu (Tomasetti & Vogelstein, 2015). Le risque de développer un cancer de la prostate augmente avec l'âge : en effet, alors qu'il reste exceptionnel avant 45 ans et rare avant 50 ans, il présente un pic entre 75 et 79 ans (HAS 2012). L'âge médian au diagnostic est de 71 ans environ. Cette influence du vieillissement sur l'oncogenèse prostatique est multifactorielle. Cela peut s'expliquer d'une part par l'augmentation des fréquences des cassures d'ADN, créant un environnement propice aux mutations et au développement de cancers (Bostwick, Burke, et al., 2004). Ces cassures s'expliquent par l'accumulation des espèces oxygénées réactives (ROS) qui induisent la formation d'adduits à l'ADN. D'autre part, une autre hypothèse serait la diminution du taux d'androgènes, survenant avec l'âge et entraînant des dérégulations moléculaires au niveau des cellules épithéliales (résistance à l'apoptose, transformation et différenciation cellulaires). Cette dernière hypothèse a été émise en observant une induction de la croissance tumorale suite au sevrage des androgènes dans le cadre de traitements du cancer de la prostate. Avec le temps, l'adaptation des cellules tumorales à de faibles taux d'androgènes

mène à une évolution de la tumeur vers une indépendance vis-à-vis des androgènes, et donc à des formes plus agressives et plus mortelles de la pathologie (Algarté-Génin et al., 2004).

b. Les facteurs génétiques et épigénétiques

L'origine ethnique : Les hommes africains et afro-américains présentent un risque 1,6 fois plus élevé de développer un cancer de la prostate que les hommes caucasiens (Jack et al., 2007). Les hommes d'origine asiatique, vivant dans leur pays d'origine sont moins sujets à cette pathologie. Ces différences pourraient être expliquées par plusieurs facteurs : différences génétiques, expositions aux facteurs environnementaux (Bostwick, Burke, et al., 2004).

Les antécédents familiaux de cancers de la prostate et prédispositions génétiques: On distingue deux formes de cancers de la prostate d'un point de vue épidémiologique : les cancers héréditaires et les cancers sporadiques. Les cancers héréditaires surviennent plus précocement (en moyenne 6 à 7 ans plus tôt et représentent 43% des cancers diagnostiqués avant 55 ans) et sont plus agressifs (Bratt, 2002). Les risques de développer un cancer de la prostate doublent lorsqu'il existe une parenté au premier degré avec une personne ayant développé la pathologie ; ces risques augmentent avec le nombre de ces parentés (Bruner et al., 2003; Johns & Houlston, 2003; Kiciński et al., 2011). Les risques augmentent de 19 à 24% pour les hommes dont la mère est touchée par un cancer du sein (Chen et al., 2008; Hemminki & Chen, 2005). Environ 20% des cancers de la prostate sont associés à un antécédent familial. Cependant, contrairement à d'autres types de cancers, à ce jour, aucun gène avec une forte pénétrance associée au cancer de la prostate n'a été identifié. Dans la majorité des cas, cette hérédité est polygénique (95%) et implique une combinaison défavorable de variants génétiques : en effet, plus d'une centaine de variants génétiques ont été associés à une augmentation des risques de développer un cancer de la prostate. Les cancers de la prostate à hérédité monogénique restent rares : 5 à 9% des cas (Al Olama et al., 2014; Ferlay et al., 2015).

Il est toutefois important de dissocier parmi les gènes impliqués, ceux qui confèrent un caractère héréditaire de ceux qui sont fréquemment retrouvés dérégulés, en liaison avec des facteurs exogènes et souvent associés à des cancers sporadiques. Parmi les gènes souvent incriminés dans les formes héréditaires monogéniques du cancer de la prostate se retrouvent : BRCA2, BRCA1, ATM, CHEK2, NSB1 (Cybulski, Górski, et al., 2004; Cybulski, Huzarski, et al., 2004; Leongamornlert et al., 2014). Ce dernier, ainsi qu'ATM font partie du système de réparation des cassures d'ADN double brin et CHEK2 est un régulateur de p53, un acteur

important de la cellule, impliqué dans les réparations des dommages de l'ADN. Enfin, BRCA1 et BRCA2 sont des gènes suppresseurs de tumeurs, chargés de la maintenance de l'intégrité génomique en participant entre autres à la réparation de l'ADN.

Les modifications épigénétiques précédemment abordées sont également un lien entre les facteurs endogènes et les facteurs exogènes que nous allons aborder par la suite. En effet, les facteurs environnementaux et nutritionnels ont un impact sur le maintien des marques épigénétiques, qui à leur tour vont influencer l'expression de gènes impliqués dans le développement du cancer de la prostate.

2. Les facteurs exogènes et facteurs d'agressivité

Selon plusieurs études, l'alimentation pourrait jouer en faveur ou protéger du développement du cancer de la prostate. Des études ont montré une association positive entre la consommation de la vitamine A préformée (retrouvée dans les aliments d'origine animale, les produits laitiers et les poissons), et cancers de la prostate (Paganini-Hill et al., 1987). Les hommes qui consomment beaucoup de calcium ont une probabilité plus élevée de développer un cancer avancé de la prostate, cette forte consommation de calcium inhibant la formation de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ qui a un rôle protecteur (Giovannucci, 1998, 2007; Schwartz & Hulka, 1990). En revanche, la relation entre la présence de vitamine A dans le sérum et le risque de développer un cancer de la prostate est plus incertaine (Hsing et al., 1990). Toutefois, d'autres études ont montré des résultats controversés en démontrant par exemple les effets positifs de dérivés de caroténoïdes végétaux, comme les lycopènes, sur le développement du cancer de la prostate (pour revue Matsushita et al., 2020). Néanmoins, nombreuses sont les études épidémiologiques ayant montré qu'un régime alimentaire dit « occidental » serait un facteur d'agressivité probable du cancer de la prostate (Yang et al., 2015). En effet, le microbiote intestinal contribuerait à la tumorigénèse dans certains organes, dont la prostate : en étant fortement influencé par le mode de vie (alimentation, tabagisme, alcoolisme, exercices sportifs...), mais aussi par d'autres facteurs comme l'âge ou l'héritage maternel (Rinninella et al., 2019), la composition alimentaire, en ayant un effet sur le microbiote intestinal serait impliquée dans les étapes de la carcinogenèse, y compris l'initiation, la progression et la résistance aux traitements (Dzutsev et al., 2017; Liss et al., 2018). De plus, le rôle du microbiote dans le métabolisme et l'immunité vient renforcer ces études (Hooper et al., 2012; Nieuwdorp et al., 2014) (pour revue Matsushita et al., 2020).

Parmi les éléments anti-carcinogènes, se retrouvent les molécules possédant des propriétés anti-oxydantes (compte tenu de l'implication du stress oxydant dans le développement du cancer de la prostate) telles que la vitamine E, la curcumine, les polyphénols, les phytoestrogènes. Par exemple, la consommation de soja, riche en phytoestrogènes, pourrait expliquer en partie la faible incidence de cancer de la prostate retrouvée dans les pays asiatiques ainsi que les différences entre l'incidence du cancer de la prostate dans les populations asiatiques ou noires ayant émigré aux États-Unis et l'incidence du cancer de la prostate au sein de la population native des États-Unis (Adhami et al., 2004; Adlercreutz et al., 1995; Eichholzer et al., 1996; Kheirandish & Chinegwundoh, 2011; Kimura, 2012; Kolonel et al., 2004; Sigounas et al., 1997; Stephens, 1997; Taylor et al., 1995; Teiten et al., 2010). Comme dit dans le Chapitre I.I.B (Fonctions de la prostate), la prostate concentre une teneur notable en zinc en condition physiologique. Celle-ci diminue avec l'âge et dans des cas de cancers. Les raisons restent, à ce jour, inconnues. Une complémentation en sélénium réduirait l'incidence du cancer de la prostate (Comstock et al., 1992), cependant, son utilisation en nutrition préventive reste controversée (Lippman et al., 2009).

En plus des facteurs liés à l'alimentation, l'environnement peut également avoir un impact sur la prévalence du cancer de la prostate. En effet, même si le cancer de la prostate est plus fréquent dans les populations afro-américaines, qui possèdent les plus hauts taux d'incidence, suivies par les populations caucasiennes, puis asiatiques (Lloyd et al., 2015; Torre et al., 2015), des études épidémiologiques ont montré une plus forte incidence du cancer de la prostate dans les populations asiatiques vivant aux États-Unis par rapport à celles vivant dans leur pays d'origine (Shimizu et al., 1991; Tsugane et al., 1990). L'implication de tel ou tel facteur environnemental sur le développement du cancer de la prostate reste toutefois controversée. Néanmoins, plusieurs études font ressortir qu'une forte exposition aux pesticides (dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT); heptachlore, bromure de méthyl), perturbateurs endocriniens (bisphénols, polychlorobiphényles(PCB)), influencerait sur le développement et la progression du cancer de la prostate. En effet, ces agents agiraient en modulant la signalisation des œstrogènes ou de façon plus générale, le métabolisme des stéroïdes (Alavanja et al., 2003; Driscoll & Taylor, 1980; Prins, 2008). Enfin, une accumulation significative de cadmium dans les tumeurs prostatiques en comparaison aux tissus sains ou même à des zones atteintes d'HBP, ainsi qu'une corrélation positive entre l'exposition au cadmium et le développement du cancer de la prostate ont été observées (Elghany et al., 1990; Ogunlewe & Osegbe, 1989).

Enfin, l'obésité comme facteur d'agressivité a été très étudiée dans différents cancers, et plus particulièrement, le cancer de la prostate (Fujita et al., 2019, p. 20). Est considéré comme obèse, tout individu ayant un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30kg/m² (OMS ; Obésité/WHO). Plusieurs études ont montré un lien entre l'obésité et le cancer de la prostate : en effet, une méta-analyse regroupant 13 études a montré que les patients obèses ont moins de risque de présenter un cancer local et plus de risque de présenter un cancer avancé au diagnostic (Bhindi et al., 2014; Discacciati et al., 2012). De plus, ils répondent moins bien aux différents traitements du cancer de la prostate : ainsi, dans un contexte d'obésité, il y a 21 % d'augmentation de récurrences après une prostatectomie ou radiothérapie externe par 5Kg/m² d'IMC (Cao & Ma, 2011). Le risque de décès est également augmenté de 15 à 20% par 5Kg/m² d'IMC (Cao & Ma, 2011). Le lien entre l'obésité et la progression du cancer vers un cancer agressif reste un sujet de débat dans la communauté scientifique, notamment en Europe où cette corrélation n'est pas retrouvée dans les études. Les taux d'obésité sont plus importants en Amérique du Nord qu'en Europe et en plus, les afro-américains qui présentent des cancers de la prostate plus agressifs sont davantage touchés par l'obésité (Keto et al., 2012).

Le cancer de la prostate est donc une pathologie hétérogène et multifactorielle avec des composantes intrinsèques et extrinsèques faiblement ou mal connues pour certaines. Il est clair que l'âge ainsi que certains facteurs génétiques favorisent son développement, néanmoins, les facteurs exogènes associés aux premiers ont également un impact sur son développement et sa progression. Il est donc important de mieux comprendre et d'identifier les symptômes, facteurs pronostics qui permettront sa détection le plus tôt possible et également, d'anticiper sa progression.

D. Diagnostic du cancer de la prostate

1. Symptômes

Les premiers signes sont souvent les troubles urinaires, mais ces derniers sont le plus souvent dus à une HBP, qui peut tout aussi bien coexister avec le cancer. En effet, la plupart des cancers de la prostate restent asymptomatiques. Lorsqu'ils atteignent des stades relativement avancés, les symptômes les plus souvent retrouvés sont une hématurie (présence de sang dans les urines) une obstruction des voies urinaires, une impuissance sexuelle, et des douleurs et/ou dysfonctionnements d'organes (œdèmes des membres inférieurs, douleurs osseuses) causés par la présence de métastases.

Il existe toutefois des mesures préventives qui permettent la détection de la pathologie à des stades précoces.

2. Dépistage

Le cancer de la prostate restant asymptomatique pendant très longtemps, une problématique de santé publique est de pouvoir le dépister, c'est-à-dire, le détecter avant l'apparition des symptômes. Ceci a une importance capitale dans le cas des cancers car détectées à un stade précoce, ces pathologies sont plus faciles à traiter et présentent des chances de survie plus élevées.

a. Détection précoce

L'association Française d'Urologie (AFU) propose une stratégie de détection précoce du cancer de la prostate qui repose sur la recherche de facteurs de risque familiaux et ethnique, couplée à un toucher rectal et un dosage du PSA.

Toucher rectal : Le cancer de la prostate ainsi que l'HBP se manifestant par une augmentation du volume de la prostate, cet examen permet de faire la différence entre les deux pathologies, puisque, rappelons-le, le cancer de la prostate se développe fréquemment dans la zone périphérique, facilement accessible lors d'un toucher rectal, contrairement à l'HBP qui se développe dans la zone transitionnelle. Cet examen permet donc d'analyser le volume, la consistance et la texture de la surface de la prostate. Il reste tout de même peu sensible (dans les cas de tumeurs peu développées et donc difficilement palpables) mais permet la détection de certains cancers alors que le dosage de PSA est normal (INCa: synthèse sur les bénéfices et risques d'un dépistage de cancer de la prostate par dosage du PSA).

Dosage de PSA : Un dosage de PSA est également réalisé. La fiabilité de ce marqueur reste toutefois controversée puisque le PSA manque de spécificité et présente une faible stabilité. En effet, cette analyse implique un dosage sérique du PSA total et même si les taux entre 4 et 10ng/mL sont considérés comme suspects, les valeurs normales restent actuellement mal déterminées (Lilja et al., 2007). L'European Association of Urology (EAU) atteste qu'en dessous de 4ng/mL, les risques sont faibles (**Tableau 1**) (Mottet et al., 2017). Nous aborderons le score de Gleason dans un paragraphe ci-dessous. Afin de pallier à ces problèmes, un paramètre supplémentaire tel que la densité du PSA (rapport entre taux de PSA et le volume de

la prostate déterminé par ultra-sons) pourrait aider au diagnostic du cancer de la prostate. Le rapport PSA libre/ PSA total pour les hommes ayant un taux de PSA compris entre 4 et 10ng/mL permet de diriger vers un diagnostic positif ou non : un ratio faible (inférieur à 0,23) est en faveur d'un cancer de la prostate. Ce test nécessite toutefois une attention particulière lors du prélèvement et de l'analyse, le PSA étant instable, comme précédemment évoqué, mais permettrait d'augmenter la spécificité du diagnostic et réduire ainsi le nombre de biopsies inutiles (de la Taille et al., 1997).

Tableau 1: *Corrélation du taux de PSA et des risques de développer un cancer de la prostate selon les données de l'EAU (Mottet et al., 2017).*

Taux du PSA (ng/mL)	Risque de cancer de la prostate (%)	Risque d'un score de Gleason ≥ 7 (%)
0,0 – 0,5	6,6	0,8
0,6 – 1,0	10,1	1,0
1,1 – 2,0	17,0	2,0
2,1 – 3,0	23,9	4,6
3,1 – 4,0	26,9	6,7

La cinétique du PSA, c'est-à-dire, le temps (exprimé en mois) nécessaire au doublement du taux de PSA ou sa vélocité qui correspond à l'augmentation absolue annuelle de la valeur du dosage de PSA est quant à elle utilisée pour le suivi du traitement.

L'AFU, l'INCa et la HAS recommandent le toucher rectal et le dosage de PSA, à partir de 50 ans en l'absence de facteurs de risques et dès 45 ans en présence de facteurs de risque (INCa: synthèse sur les bénéfices et risques d'un dépistage de cancer de la prostate par dosage du PSA). Cependant, dans son ensemble, le dépistage précoce pose quelques problèmes/incertitudes liés:

- Au manque de spécificité et de stabilité du PSA
- Au manque de sensibilité du toucher rectal
- Au manque d'éléments permettant, une fois le diagnostic posé, de distinguer les cancers qui resteront latents pendant plusieurs années et qui ne nécessiteront pas de traitements (environ 50% des cancers de la prostate) de ceux qui deviendront assez rapidement agressifs et qui nécessitent impérativement d'être traités, sachant que les traitements (souvent de la chirurgie ou de la radiothérapie)

présentent des effets secondaires importants, affectant la qualité de vie des patients (Thompson et al., 2004).

Néanmoins, il existe d'autres marqueurs de diagnostics et de pronostic, qui permettent de limiter ces incertitudes. Des examens histopathologiques et cytologiques se font sur des échantillons sont obtenus par biopsie transrectale, généralement précédé d'une IRM dans le but de repérer la localisation probable du cancer. La biopsie se fait à l'aiguille et est guidée par échographie. Elle se fait de l'apex vers la base et de latéral à postérieur dans la zone périphérique. Dix à douze « carottes » sont prélevées de la prostate et analysées afin de détecter la présence éventuelle de cellules cancéreuses (Rozet et al., 2016). Leur taille et leur longueur peuvent avoir des influences sur le taux de détection. Ceci n'est pas sans complication car il peut survenir suite aux biopsies une infection du tractus urogénital, voire une septicémie. Si besoin, une biopsie des vésicules séminales et de la zone de transition peut également être réalisée. Un anatomopathologiste analyse sur une coupe de tissus fixés au formol et inclus dans de la paraffine (FFIP), les échantillons collectés ou issus de prostatectomie et inclus en paraffine, suivie d'une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine.

L'analyse histologique permet de caractériser l'état du tissu et l'avancée de la pathologie:

- Lésions bénignes ou négatives
- Inflammation active
- Inflammation granulomateuse
- PIN de haut grade
- PIN de haut grade avec glande atypique, suspicion d'adénocarcinome (PINATYP)
- Glande atypique, lésions suspectant un adénocarcinome, petite prolifération acinaire atypique (ASAP), suspicion de cancer
- Adénocarcinome (en précisant le type histologique, le groupe de gradation et en cas d'extension extra-capsulaire, l'infiltration péri-nerveuse et l'invasion vasculaire).

En cas de doute, ou dans le but d'affiner le diagnostic, l'anatomopathologiste peut effectuer d'autres tests qui se basent sur des biomarqueurs dont nous parlerons dans les paragraphes suivants.

b. Autres biomarqueurs du cancer de la prostate

Ces biomarqueurs et tests permettent de confirmer les diagnostics, réduisant ainsi le sur-diagnostic et améliorant la prise en charge des patients et ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA), l'European Medicines Agency (EMA) et ont obtenu des accréditations telles que CLIA (Clinica Laboratory Improvement Amendement) ou CAP (College of American Pathologists).

Les biomarqueurs histologiques : l'AMACR (l' α -Methylacyl Coenzyme A Racémase), une enzyme mitochondriale apparait surexprimée dans le cancer de la prostate par rapport aux tissus d'HBP. Elle sert par conséquent, couplée à l'expression de la protéine p63, de biomarqueur histologique (Sreekumar et al., 2004; Xu et al., 2000). Sa détection par immunohistochimie est caractérisée par une grande sensibilité et spécificité (Sreekumar et al., 2004). La protéine p63 permet de détecter les cellules basales (Molinié et al., 2005, 2008).

Les biomarqueurs urinaires : les sécrétions prostatiques déversées dans l'urètre se retrouvent mélangées à l'urine qui est donc enrichie en biomarqueurs. Le recueil d'urines, disponible et peu invasif, fait de ces marqueurs des candidats idéaux. En effet, les urines contiennent les produits de dégradation et les sécrétions protéiques des cellules bénignes et malignes. Les marqueurs urinaires se classent en trois groupes : les marqueurs d'ADN, d'ARN et les marqueurs protéiques. Le diagnostic de la pathologie peut donc également être appuyé par des tests urinaires, notamment via la détection d'ARN fortement exprimés par les cellules tumorales prostatiques tels que PCA3 (Prostate Cancer Antigen 3). Il est spécifique de la prostate et est surexprimé dans plus de 94% des échantillons de cancer de la prostate à un taux 66 fois supérieur aux taux retrouvés dans des tissus prostatiques sains ou non prostatiques (Hessels et al., 2003). En normalisant le taux de PCA3 par rapport à celui du PSA urinaire, on obtient le score PCA3. Ce test présente une meilleure spécificité et reproductibilité que le dosage sérique du PSA total ou le ratio PSA libre / PSA total, et ce, plus particulièrement pour les patients ayant un taux de PSA compris entre 2 et 10ng/mL (Haese et al., 2008; Sokoll et al., 2008; Vlaeminck-Guillem et al., 2011).

L'AMACR, en plus de son utilisation comme biomarqueur histologique, est également détecté dans les urines. Une quantification par RT-qPCR permet de déterminer les taux de son ARNm, qui sont normalisés par rapport aux niveaux de PSA, ce qui permet de prédire un cancer de la prostate chez 70% des patients (Zielie et al., 2004).

Il est également possible de détecter dans des échantillons urinaires, des fusions de gènes type TMPRSS-ETS (TransMembrane PRotease Serine 2-E-Twenty Six). Ces gènes sont impliqués dans 50% des échantillons de tumeurs prostatiques (Scheble et al., 2010) et leurs transcrits sont retrouvés dans 35% des échantillons urinaires avec quasiment une spécificité de 100% (Hessels et al., 2007; Rostad et al., 2009; Tomlins et al., 2011). Même si leur sensibilité reste faible par rapport aux autres marqueurs, leur forte spécificité permet la détection de cancers agressifs. MLabs a développé un test urinaire, MiPS, combinant le score PCA3 et le score T2 (de la même manière, le score T2 ratio entre le taux d'ARNm des fusions TMPRSS-ETS et celui du PSA) (Salami et al., 2013). L'utilisation des deux scores plutôt que le seul score PCA3 pour la prédiction du cancer de la prostate est confortée par l'étude de Tomlins et ses collaborateurs (Tomlins et al., 2016). La combinaison des biomarqueurs PCA3 et TMPRSS-ETS est également utilisée dans un test basé sur la quantification de leurs ARN exosomiques dans des échantillons urinaires. Ce test, nommé ExoDx®, est à visée pronostique et permet ainsi de distinguer les cancers de haut grade des cancers de bas grade et des lésions bénignes (McKiernan et al., 2016).

MDxHealth a également développé un test urinaire, réalisable après un toucher rectal. Ce test consiste à analyser l'expression de marqueurs de progression DLX1 et de prolifération HOXC6, et permet ainsi de déterminer la nécessité de la réalisation d'une biopsie (van Neste et al., 2016). Il représente une aide au diagnostic non invasif pour la détection de cancers de haut grade et pourrait permettre la réduction du nombre de biopsies.

EN2 (Engrailed 2) est un facteur de transcription dont l'expression est positivement régulée dans les cellules tumorales prostatiques (LNCaP, PC3 et DU145). Des études ont montré une baisse de la croissance cellulaire suite à son inhibition par siRNA (Bose et al., 2008). Des tests urinaires ont également été mis en place afin de détecter les niveaux d'EN2 et présentent une sensibilité de 66% et une spécificité de 90% (Morgan et al., 2011).

Tests sériques de kallikréines : le test immunologique « *Prostate Health Index* (PHI) », commercialisé par Beckman Coulter combine l'analyse des trois formes du PSA (PSA total, PSA libre et [-2] proPSA, la forme la plus stable du PSA) en un seul score qui peut être utilisé pour aider à la prise de décision clinique (Catalona et al., 2011). Le PHI est calculé à l'aide de la formule suivante: $([-2] \text{ proPSA} / \text{PSA libre}) \times \sqrt{\text{PSA}}$. Il présente une sensibilité de 90% mais sa spécificité est d'environ autour de 30%.

Un autre test immunologique est quant à lui basé sur le dosage de quatre kallikréines : les PSA intacts, libres et totaux et la kallikréine-2 (KLK2). Les résultats obtenus sont associés à l'âge du patient, aux données du toucher rectal et à celles de la biopsie, afin de calculer, grâce à un algorithme, le risque de développer un cancer de haut grade. Ce test, par rapport au PHI, présente une sensibilité plus faible, 74%, mais une spécificité plus élevée : 61% (Russo et al., 2017).

Tests tissulaires de signatures moléculaires : Des analyses de microarray ont permis d'identifier 732 gènes capables de prédire la survenue d'un cancer agressif, la récurrence et la mortalité spécifique due au cancer. Une étude en a retenu dix-sept, impliqués dans divers processus biologiques du développement et de la progression du cancer de la prostate parmi lesquels, la signalisation des androgènes, la réponse du stroma, la prolifération et l'organisation cellulaire (Klein et al., 2014). Il existe des tests qui se basent sur l'expression de ces groupes de gènes afin d'établir un diagnostic et un pronostic au moment de l'analyse :

Le test Oncotype DX® GPS se base sur l'expression de 12 gènes rapportés à 5 gènes de ménage et grâce à un algorithme combinant les données d'expression et les données du patient, il permet d'établir un score de 0 à 100. Aucun des patients issus de la cohorte interrogée, avec un score < 20 n'a développé de métastase, ni de mortalité spécifique au cancer de la prostate (van den Eeden et al., 2018).

Le test Prolaris quant à lui prend en compte l'analyse de l'expression de 31 gènes impliqués dans le cycle cellulaire, à laquelle sont couplés le taux de PSA et le score de Gleason. Il permet de déterminer le risque de mortalité spécifique au cancer à 10 ans en se basant sur un score allant de 1 à 10. Lorsque le cancer est moins agressif, ce score est inférieur à 3 et supérieur à 4 dans les cas de cancers agressifs.

Decipher® est un test à valeur pronostique réalisable après prostatectomie et capable, en se basant sur l'expression de vingt-deux ARN issus de régions codantes et non codantes, d'évaluer l'agressivité et le risque de survenue de métastases (Klein et al., 2016). Il permet ainsi d'orienter les cliniciens sur le suivi adéquat du patient. En effet, une diminution de 80% de l'incidence de métastases a été observée chez les hommes à haut risque identifiés par le test et ayant reçu une radiothérapie adjuvante, comparés aux hommes qui ont reçu une radiothérapie de rattrapage. La radiothérapie sera abordée dans le chapitre III.

Ces différents tests ont été validés sur des cohortes de patients très larges mais il reste judicieux de s'interroger sur la pertinence biologique de ces signatures moléculaires, puisque, d'une part, rappelons-le, contrairement à d'autres types de cancers, il n'y a pas de gènes identifiés avec une forte pénétrance pour le cancer de la prostate et d'une autre part, les gènes ciblés dans les tests décrits ci-dessus, n'ont pas de rôles clés dans la tumorigénèse du cancer de la prostate. Toutefois, ils ont permis de réduire considérablement les recommandations de radiothérapie et de mieux orienter les cliniciens sur les traitements. Par ailleurs, au-delà de l'intérêt qu'ils apportent quant à la qualité de vie des patients, du fait d'un traitement différé lorsque le risque de développer un cancer agressif est faible, voire très faible, ces tests permettent de réaliser environ 2300\$ d'économies par patient (Albala et al., 2016; Crawford et al., 2014; Filson, 2018).

Tests sur échantillons anatomopathologiques : la perte de l'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN est une altération génique fréquemment retrouvée dans plusieurs cancers dont le cancer de la prostate. Le développement de tests cliniques robustes utilisant l'immunohistochimie et l'hybridation in situ par fluorescence (FISH) a permis de mesurer de manière reproductible la perte de protéines et de gènes PTEN à l'aide de biopsies tissulaires diagnostiques et de cellules tumorales circulantes à partir de plasma. Dans les cas de cancers de la prostate, cette altération génique est concomitamment retrouvée et de façon dose-dépendante aux fusions des gènes TMRSS2 :ERG lors de récidives après traitement local et à la survie du cancer de la prostate (Jamaspishvili et al., 2018; Xie et al., 2017; Yoshimoto et al., 2008). Même si l'ajout des données cliniques du patient augmenterait la valeur de l'utilisation de ce marqueur pour la prédiction de la survenue de métastases à 10 ans, la perte de l'expression de PTEN n'est pas pour autant utilisée, ni recommandée pour la clinique (Hamid et al., 2019).

ProMark® est un test qui analyse par immunohistochimie, huit marqueurs issus d'une étude protéomique quantitative ayant permis d'isoler 160 protéines qui permettraient de prédire l'agressivité du cancer de la prostate (Shipitsin et al., 2014). L'analyse des images permet d'obtenir un score compris entre 0 et 1 : le risque est dit « favorable » pour un score inférieur à 0,33 et « non favorable » pour un score supérieur à 0,8, en ce qui concerne l'agressivité du cancer et le risque de mortalité spécifique (Blume-Jensen et al., 2015).

D'autres tests existent et sont basés sur l'analyse de marqueurs épigénétiques (méthylation) associés au cancer ou sur l'analyse de PDE4D7, une phosphodiesterase impliquée

dans la dégradation de l'AMPc et la régulation des voies de signalisation impliquées dans la signalisation androgénique et la prolifération cellulaire (Henderson et al., 2019; van Neste et al., 2016). La quantification de l'expression de cette phosphodiesterase permet de suivre la progression du cancer après prostatectomie, étant donné que son expression est inversement corrélée avec l'agressivité du cancer de la prostate (Alves de Inda et al., 2018; Henderson et al., 2019).

Cellules tumorales circulantes : la recherche de cellules tumorales circulantes (CTC) peut apparaître comme innovante et prometteuse. Les CTC sont triées à partir d'un échantillon sanguin sur la base d'une absence à leur surface du marqueur de cellules immunitaires CD45, de la présence de marqueurs de cellules épithéliales, à savoir les cytokératines (CK8/18⁺ et CK19⁺) et d'un noyau. Le seuil est fixé à 5 CTC dans un échantillon sanguin de 7,5mL: au-delà de ce seuil, le pronostic est considéré comme « défavorable » (de Bono et al., 2008; Weng et al., 2012). Un autre test repose sur la détection du variant V7 de AR au sein des CTC et permettrait de distinguer les patients susceptibles de répondre aux inhibiteurs de AR (ARSi : enzalutamide et acétate d'abiratéronne) de ceux qui n'y répondraient pas favorablement et qu'il serait préférable de traiter par chimiothérapie par exemple (Scher et al., 2016). En effet, la présence de ce variant est associée à la résistance aux ARSi (Antonarakis et al., 2014).

c. Imagerie

Lorsque les biopsies se révèlent positives suite à une suspicion de cancer de la prostate, l'imagerie se révèle être un outil qui permet de classer les tumeurs. En effet, il permet la localisation exacte de la tumeur, la détermination de ses limites et la détection d'un possible envahissement local et/ou d'une potentielle extension aux ganglions pelviens ou à distance.

i. L'échographie

Lors d'une échographie, une prostate saine présente un aspect uniforme à l'écran, alors qu'une prostate cancéreuse montre la présence de taches noires. Cependant, l'échographie n'est pas indiquée pour un bilan d'extension car elle est peu sensible et peu spécifique. Elle n'est utilisée que pour l'évaluation du volume de la prostate et la réalisation des biopsies. Dans ce contexte, elle permet une mesure précise de la taille et du poids de la prostate.

ii. L'IRM (Imagerie à Résonance Magnétique)

L'IRM est la technique d'imagerie recommandée pour les bilans d'extension. Elle présente également un intérêt avant la réalisation d'une biopsie. Elle donne de meilleures informations concernant l'extension extra-prostatique mais manque cependant de sensibilité pour justifier d'une utilisation routinière, en dehors des lésions à haut risque (score de Gleason >7). En effet, les cancers de faible agressivité ou de petites tailles sont difficilement détectables via cette technique (Renard Penna et al., 2015).

iii. La tomодensitométrie (scan) et scintigraphie

La scintigraphie permet la visualisation des lésions osseuses par l'utilisation d'un radiopharmaceutique, le méthylène diphosphonate marqué au technécium 99. Ce dernier présente une affinité pour les lésions osseuses. La scintigraphie possède une bonne spécificité mais une faible sensibilité, avec des images de faible qualité. De nos jours, la tomoscintigraphie ou le SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) qui allie les données du scan avec celles de la scintigraphie, certes, ne détecte que les lésions chez les patients avec un taux de PSA > 20ng/mL ou les patients à haut risque, mais possède une meilleure sensibilité. Le scanner osseux reste toutefois la technique la plus utilisée pour la recherche de métastases osseuses.

iv. La tomographie par émission de positons (TEP scan)

Tout comme la tomoscintigraphie, le TEP couple un scanner à l'utilisation d'un radiopharmaceutique. Le but ici est de visualiser les cellules tumorales par le biais de leur métabolisme. C'est une technique dite d'imagerie fonctionnelle qui permet de repérer avec plus de spécificité les lésions tumorales au scanner mais reste peu sensible pour les ganglions de petite taille (< 5mm) et elle est d'autant plus efficace, couplée à l'IRM (**Figure 25**). Malgré cela, le manque de données cliniques, ainsi que la disparité des résultats conduisent à ne pas recommander son utilisation pour la recherche de métastases (Renard Penna et al., 2015).

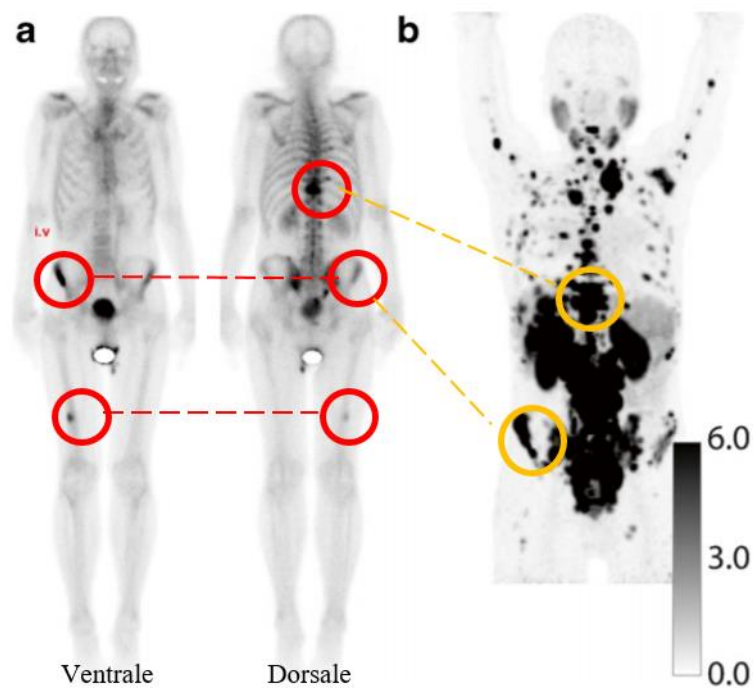


Figure 25: Scintigraphie et PET scan.

Exemple de la différence de sensibilité entre la scintigraphie (a) et le PET scan au 68Ga-PSMA (b) pour la détection de métastases osseuses chez un même patient sous hormonothérapie. Modifié d'après Pyka et al., 2016.

Finalement, il apparaît que la plupart des techniques classiques ne permettent pas d'obtenir à la fois, avec une bonne sensibilité et spécificité, assez de précisions sur une éventuelle atteinte ganglionnaire et/ou sur la présence de métastases osseuses. De plus, l'ensemble des données à prendre en compte, assez chronophage et complexe, induit une certaine subjectivité dans les décisions des cliniciens d'où la nécessité, aujourd'hui, de développer de nouvelles techniques d'imagerie. Dans ce contexte, l'intelligence artificielle (IA) pourrait permettre l'amélioration de l'efficacité et de la précision du diagnostic du cancer de la prostate.

L'IA et le « Machine Learning » ont suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années dans le domaine de la santé. Par l'utilisation d'algorithmes, ils sont capables de modéliser et de traiter l'ensemble des informations issues des analyses cliniques. Dans le cancer de la prostate, l'utilisation de l'IA s'est avérée bénéfique dans la caractérisation, le classement et le traitement de cette pathologie (Van Booven et al., 2021).

E. Classification des cancers de la prostate

Lorsque le cancer de la prostate est diagnostiqué, il est essentiel de pouvoir regrouper les patients au sein d'un groupe clinique équivalent, d'où l'intérêt de classer les tumeurs selon leurs caractéristiques histologiques, biochimiques et leur progression. Le stade (étendue) et le grade (agressivité) du cancer sont donc déterminés. Ceci permet de mieux diriger leur prise en charge, et d'augmenter les chances de réussite des traitements.

1. Classification TNM

Dans le cancer de la prostate, l'étendue est déterminée par la classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis). Il s'agit d'un système international qui permet de classer tous les cancers selon leur extension anatomique. Les trois lettres symbolisent la propagation du cancer sur le site de la tumeur primitive (T), l'infiltration éventuelle des ganglions lymphatiques voisins (N) et la présence de potentielles métastases dans d'autres organes (M). À chaque lettre est associé un coefficient basé sur des critères cliniques et qui permettent de caractériser l'envahissement tumoral. La lettre T correspond à la tumeur initiale et est cotée de T0 (pas de lésion primitive) à T4 (tumeurs plus étendues). Cette cotation dépend du volume tumoral, de l'étendue des lésions (diamètre des lésions) et de la fixation aux organes voisins. La lettre N correspond aux ganglions plus ou moins proches de la tumeur et est cotée de N0 à N3. Ce paramètre prend en compte les dimensions, nombre et éventuelles fixations des adénopathies aux tissus voisins. La lettre M correspond à l'absence (M0) ou à la présence (M1) de métastases, quel que soit leur siège, unique ou multiple (**Tableau 2**) (Salomon et al., 2010).

Tableau 2: Classification TNM du cancer de la prostate d'après la révision 2016 de l'AJCC.

Classification	Critères
Tumeur	
Tx	Tumeur ne pouvant être évaluée
T0	Absence de preuves de tumeur primaire
T1	Tumeur ne pouvant être détectée par toucher rectal ou par une technique d'imagerie, découverte fortuitement (par exemple lors d'une opération chirurgicale sans aucun lien avec le cancer)
T2	Tumeur palpable localisée uniquement dans la prostate
T2a	Tumeur atteignant au plus la moitié d'un lobe
T2b	Tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe
T2c	Tumeur se développant dans les deux lobes
T3	Tumeur se développant en dehors de la prostate
T3a	Tumeur se développant en dehors de la prostate de manière uni ou bilatérale
T3b	Extension tumorale dans les vésicules séminales
T4	Extension tumorale dans d'autres structures autres que les vésicules séminales comme par exemple: le rectum, le sphincter externe ou la vessie
Ganglions lymphatiques régionaux	
Nx	Ganglions régionaux ne pouvant être évalués
N0	Absence d'invasion des ganglions lymphatiques
N1	Atteinte tumorale des ganglions régionaux
Métastases à distance	
M0	Absence de métastases à distance de la prostate
M1	Présence de métastases à distance de la prostate
M1a	Atteinte des ganglions lymphatiques distants
M1b	Métastase osseuse
M1c	Atteinte d'autres organes avec ou sans atteinte osseuse

2. Le score de Gleason

L'analyse des échantillons histologiques de tissus prostatiques permet de déterminer le grade du cancer en utilisant le score de Gleason. Ce grade reflète les différences entre le tissu prostatique sain et le tissu prostatique tumoral et permet de prévoir la vitesse d'évolution de la tumeur : les tumeurs de grade élevé ont tendance à se développer et à progresser plus vite. Lors d'une analyse, le pathologiste attribue un grade de 1 (bien différencié) à 5 (indifférencié) à chaque zone du cancer selon l'architecture glandulaire de la tumeur. Le score de Gleason est obtenu par l'addition du grade le plus fréquent au grade le plus élevé : les scores de Gleason

vont donc de 2 à 10 et permettent de différencier les cancers de bas grade de malignité (score 2 à 4), des cancers de grade intermédiaire (score 5 à 7), des cancers de haut grade (score 8 à 10), plus agressifs et évolutifs (Bostwick, Grignon, et al., 2000; Gleason & Mellinger, 1974).

Cette classification qui existe depuis 1966, bien qu'approximative puisque dépend fortement du praticien mais aussi du fait qu'elle regroupe des cancers à pronostics très différents, reste toutefois l'outil de diagnostic le plus fiable et le plus couramment utilisé en raison de sa reproductibilité et de sa valeur pronostique efficace.

Une évolution du système de classification a toutefois été proposée en 2016 par la Société Internationale d'Uro-pathologie (ISUP) (**Figure 26**). Celle-ci réduit le nombre de catégories à 5 groupes (au lieu des 9 précédents) classés de 1 à 5 ; le groupe le plus faible étant 1. La valeur pronostique de cette classification a été validée par une étude multicentrique (Epstein et al., 2016) :

- Grade 1 (scores de Gleason ≤ 6) : 96% de survie sans rechute après une prostatectomie
- Grade 2 (score de Gleason 7(=3+4)) : c'est-à-dire les cancers avec une majorité de grade 3) : 88%
- Grade 3 (score de Gleason 7(=4+3)) : c'est-à-dire les cancers avec une majorité de grade 4, progressant plus rapidement et formant plus de métastases que les précédents) : 63%
- Grade 4 (score de Gleason 8) : 48%
- Grade 5 (scores de Gleason 9 à 10) : 26%

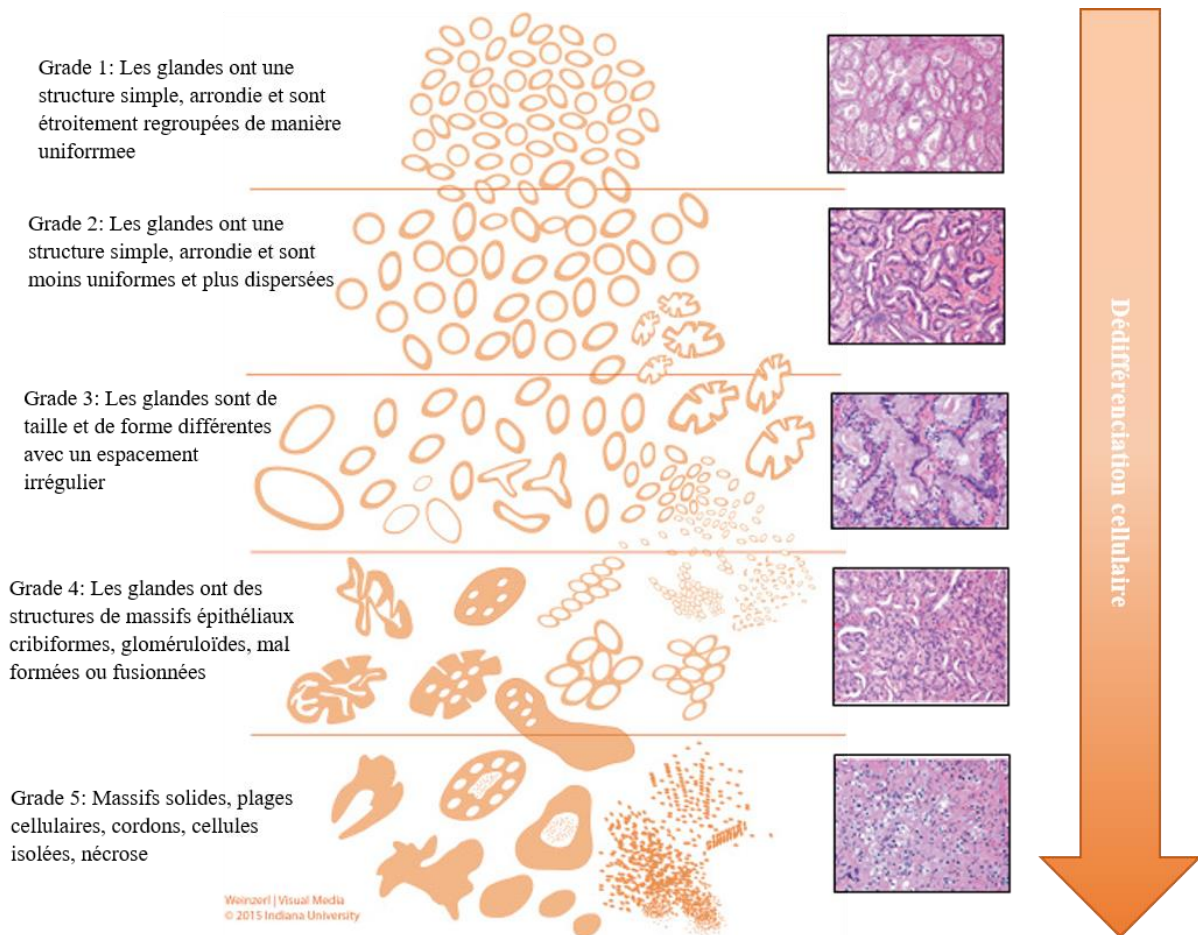


Figure 26: Les différents grades de cancer de la prostate selon le score de Gleason modifié et validé par l'OMS lors de l'édition de classification des tumeurs en 2016.

Modifié d'après Humphrey et al, 2016.

3. La classification de d'Amico

Cette classification en trois niveaux permet d'évaluer le risque de récurrence après un traitement localisé du cancer de la prostate (**Tableau 3**). La classification de d'Amico intègre la classification TNM, le taux de PSA et le score de Gleason. On distingue alors trois classes : les cancers de la prostate localisés à faible risque de récurrence, les cancers de la prostate localisés à risque intermédiaire et les cancers de la prostate localisés à haut risque de récurrence. Il permet ainsi de choisir le traitement adéquat en se basant sur un maximum d'information sur la mise en place et l'évolution du cancer (Hernandez et al., 2007). Les différents traitements du cancer de la prostate seront abordés dans la partie III.

Tableau 3: Évaluation du risque de récurrence du cancer de la prostate selon la classification de d'Amico.

Modifié d'après Hernandez et al.,2007.

Groupes	Critères	Pronostic de rechute à 5 ans
Faible risque	PSA \leq 10ng/mL + Gleason \leq 6 <u>et</u> stade clinique T1c ou T2a	< 25%
Risque intermédiaire	PSA entre 11 et 20 ng/mL <u>ou</u> score de Gleason = 7 <u>ou</u> stade clinique T2b	25-50%
Risque élevé	PSA > 20 ng/mL <u>ou</u> score de Gleason >7 <u>ou</u> stade clinique T2c	> 50%

En somme, le cancer de la prostate est une pathologie multiparamétrique dans laquelle interagissent entre autre, des altérations d'origine moléculaire mais également dues à l'environnement et au mode de vie. Un autre paramètre, le métabolisme, peut être ajouté à cette liste. Nous aborderons le lien entre métabolisme et cancer de la prostate dans la partie qui suit.

Chapitre II : Cancer de la prostate et métabolisme

I. Voies métaboliques impliquées et modifiées dans le cancer de la prostate

A. Le métabolisme des cellules saines et des cellules tumorales

Plusieurs voies de signalisations se retrouvent dérégulées lors de la mise en place et de la progression du cancer de la prostate. Les anomalies moléculaires précédemment évoquées ont une influence sur le métabolisme cellulaire (et réciproquement), ceci, dans le but d'une production rapide d'ATP et de substrats nécessaires à la croissance tumorale. Ces changements métaboliques interviennent dans quatre grandes familles de macromolécules : les glucides, les lipides, les protéines et les acides aminés. La reprogrammation de la production d'énergie de la cellule tumorale est à la fois un pilier et un tremplin pour la tumorigénèse, la progression et la résistance du cancer de la prostate (Giunchi et al., 2019).

1. Énergétique d'une cellule saine

Le métabolisme énergétique cellulaire est fortement dépendant de la balance catabolisme-anabolisme et donc des conditions thermodynamiques reliées à l'état physiologique du tissu ou organe. Au centre de ce métabolisme énergétique, en tant que carrefour métabolique apparaît le cycle de Krebs qui est un élément clé dans la production de co-facteurs réduits pour les phosphorylations oxydatives et donc la production d'ATP (pour revue, Rigoulet et al., 2020)

L'ATP est une molécule essentielle qui fournit l'énergie nécessaire au métabolisme et au bon fonctionnement de la cellule (division cellulaire, transport actif, réplication de l'ADN, transcription, traduction, migration cellulaire). L'ATP est clivée en ADP et en phosphate inorganique, par une réaction d'hydrolyse et elle est régénérée à partir de l'ADP au moyen de l'énergie libérée par l'oxydation de glucides ou de lipides. En effet, la majeure partie de l'ATP est produite au sein des mitochondries lors d'une suite de réactions enzymatiques mettant en jeu une chaîne respiratoire. Cette dernière assure un transfert d'électrons de coenzymes réduits (NADH, FADH₂), produits entre autres, au cours des réactions de β -oxydation et du cycle de Krebs à l'oxygène (respiration cellulaire). De l'ATP est également produit dans le cytosol au cours de la glycolyse par réaction de phosphorylation au niveau du substrat. Chez les plantes et bactéries photosynthétiques, la production d'ATP se fait par photophosphorylation.

Chez la plupart des mammifères, le pyruvate produit dans le cytosol par la glycolyse passe dans la mitochondrie où il subit une décarboxylation oxydative, générant ainsi de l'acétyl-CoA. Cette dernière molécule sera par la suite oxydée dans le cycle de Krebs pour, comme déjà mentionné, produire des coenzymes réduits et ainsi fournir de l'énergie à la cellule sous forme d'ATP. En condition aérobie, les cellules saines utilisent de faibles quantités de glucose pour générer du pyruvate et alimenter les phosphorylations oxydatives (glycolyse aérobie). Dans les mêmes conditions, les cellules tumorales vont présenter un fonctionnement différent.

En milieu anaérobie (comme dans les érythrocytes par exemple) ou lorsque les cellules sont incapables d'utiliser la phosphorylation oxydative lors d'une privation prolongée d'oxygène, la glycolyse est limitée au cytoplasme et aboutit à la production de lactate (ou d'éthanol chez les levures). Il s'agit d'une voie de fermentation dont le rendement énergétique est 19 fois plus faible que celui de la glycolyse aérobie. Elle est contrôlée par trois enzymes : l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase et la pyruvate kinase.

Les hexokinases catalysent la première étape essentiellement irréversible de la glycolyse en phosphorylant le glucose en glucose-6-phosphate (G-6-P). Quatre isozymes d'hexokinases existent : HK1, HK2, HK3 et HK4 (Wilson, 2003). HK1 est exprimé dans les tissus prostatiques sains et cancéreux alors que l'expression de HK2 n'est retrouvée que dans les tissus cancéreux (Wang et al., 2014). L'activité de HK2 est favorisée par l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt souvent dérégulée dans les cancers, participant ainsi aux modifications du métabolisme dans le but de faciliter la survie et la prolifération des cellules cancéreuses (Hoxhaj & Manning, 2020).

2. Les altérations métaboliques des cellules tumorales

Les cellules tumorales ont de fortes activités de croissance et de prolifération, nécessitant un apport important d'énergie. Contrairement aux cellules saines, et bien qu'étant en condition aérobie, les cellules tumorales utilisent de grandes quantités de glucose mais dirigent le pyruvate produit vers la fermentation lactique: c'est l'effet Warburg. Cette préférence de la glycolyse par rapport aux phosphorylations oxydatives permet une production d'ATP certes rapide, mais moins efficace: en effet, par unité de glucose consommé, les cellules tumorales produisent seulement 2 molécules d'ATP au lieu de 36 par les phosphorylations oxydatives. Ceci a pour conséquence une augmentation de la consommation de glucose et une diminution des phosphorylations oxydatives, en faveur d'une production de lactate par

fermentation (**Figure 27**). Il s'agit d'une caractéristique des cellules tumorales relativement bien caractérisée (Warburg, 1956; Warburg et al., 1927) et considérée comme une *hallmark* du cancer (Hanahan & Weinberg, 2011). L'utilisation de la glycolyse anaérobie par les cellules cancéreuses ne serait pas à l'origine de la tumorigénèse mais plutôt une conséquence des différents mécanismes moléculaires ou altérations géniques responsables de la transformation maligne des cellules. Toutefois, il a été montré que la production de lactate est bénéfique au maintien du microenvironnement tumoral et diminue la réponse immunitaire (Husain et al., 2013; Vaupel et al., 2019).

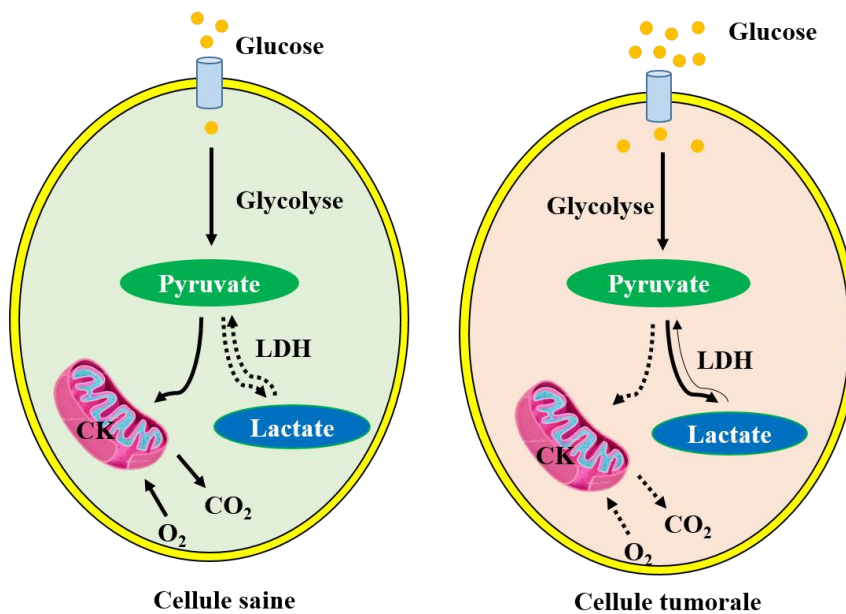


Figure 27: Effet Warburg.

En condition aérobie, le pyruvate issu de la glycolyse est utilisé pour la production d'énergie par les mitochondries dans les cellules saines. Contrairement à ces dernières, les cellules tumorales, indépendamment des conditions d'oxygénation, transforment le pyruvate préférentiellement en lactate. CK= cycle de Krebs.

Les altérations métaboliques des cellules tumorales impliquent évidemment des enzymes intervenant dans la production d'énergie. C'est par exemple le cas de l'hexokinase dont l'activité est dérégulée dans l'initiation de plusieurs types de cancers dont le cancer de la prostate. L'augmentation de son activité est essentielle à la survie et la prolifération anarchique des cellules dues induites par la perte de l'expression de Pten et p53 (Wang et al., 2014), mais également la résistance des cellules à l'apoptose. En effet, une activité élevée de l'hexokinase II a été associée à une inhibition de Bax et de Bid, deux protéines pro apoptotiques (Majewski et al., 2004; Pastorino et al., 2002). En plus d'être mise en jeu dans les mécanismes de

tumorigénèse, l'hexokinase est également impliquée dans la progression et la résistance thérapeutique de plusieurs types de cancers et sa délétion par knockout mène à une réussite thérapeutique dans des modèles murins de cancers du sein et du poumon (Anderson et al., 2017; Patra et al., 2013). Cependant, une méta-analyse montre que malgré son rôle pivot dans le développement et la progression du cancer, la signification pronostic de l'expression aberrante de l'hexokinase II dans les tumeurs solides reste incertaine car très variable selon le type de cancer (Liu et al., 2016) (pour revue, Hoxhaj & Manning, 2020).

La reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses passe également par une augmentation du métabolisme des acides aminés dont la dérégulation serait également impliquée dans l'initiation et la progression du cancer (pour revue, Li & Zhang, 2016). Ces derniers permettent la survie et la prolifération des cellules cancéreuses dans des conditions génotoxiques, oxydatives et de stress, en permettant par exemple la synthèse d'antioxydants, la conversion de l'ammoniac en urée ou encore l'activation de voies de survie. De plus, leur implication a été démontrée dans les modifications épigénétiques et l'immunité tumorale entre autres. Il a par ailleurs été mis en évidence une certaine addiction de plusieurs types de cancers à des acides aminés particuliers, faisant ainsi du ciblage du métabolisme des acides aminés, une stratégie thérapeutique (Fahrman et al., 2020; pour revue, Peng et al., 2020; pour revue, Wei et al., 2021).

B. Le métabolisme des cellules prostatiques saines et tumorales

1. Le métabolisme énergétique

Tout comme les cellules cancéreuses, les cellules épithéliales de la prostate font partie des rares cellules humaines saines à pouvoir produire de l'énergie majoritairement par la glycolyse plutôt que par le cycle de Krebs (Verze et al., 2016).

Les cellules prostatiques saines présentent un métabolisme particulier, en lien avec leurs fonctions (Cutruzzola et al., 2017; Eidelman et al., 2017). Ainsi, elles échappent aux phosphorylations oxydatives. Quant à elles, les cellules tumorales prostatiques présentent également un phénotype énergétique différent : en effet, alors que la plupart des tumeurs solides mettent en place un « switch glycolytique », les cellules tumorales prostatiques utilisent préférentiellement les lipides pour la production d'énergie. Ceci a été démontré dans les cancers précoces de la prostate ; ainsi, l'effet Warburg ne serait pas impliqué dans la pathogenèse du

cancer de la prostate (Zadra et al., 2013). Une technique d'imagerie, la TEP scan FDG (FluoroDéoxylGlucose), s'appuyant sur la capacité des cellules tumorales à capter de façon importante le glucose, permettant de distinguer les cellules tumorales en utilisant le glucose comme traceur radioactif (le 18-FDG), se retrouve inutilisable dans le cas du cancer de la prostate dans les stades précoces, du fait de sa faible activité glycolytique (Schöder & Larson, 2004; Testa et al., 2016). La choline, utilisée pour la synthèse de la membrane cellulaire, et l'acétate, un marqueur indirect de la synthèse des acides gras, seront plutôt utilisés comme traceurs dans les stades précoces du cancer de la prostate et la TEP scan FDG dans les stades avancés (**Figure 28**) (Schöder & Larson, 2004; Schuster et al., 2016). De plus, une baisse de la concentration intracellulaire de zinc a été observée lors de la transformation des cellules prostatiques saines en cellules cancéreuses (Dueregger et al., 2015; Sadeghi et al., 2015; Twum-Ampofo et al., 2016).

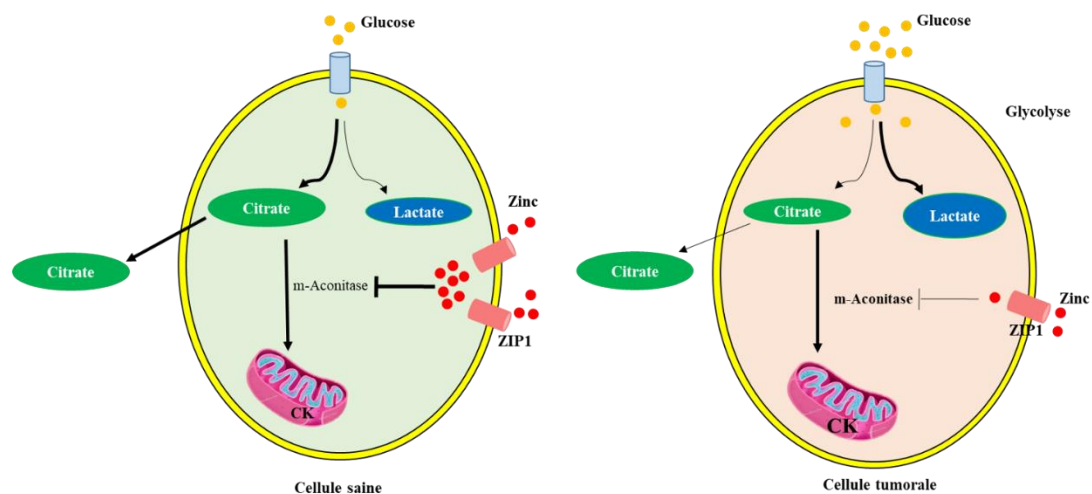


Figure 28: Métabolisme particulier des cellules prostatiques.

Dans les cellules prostatiques saines, l'accumulation de zinc inhibe fortement l'activité de l'aconitase mitochondriale (m-aconitase), empêchant l'entrée du citrate dans le cycle de Krebs et favorisant ainsi son excrétion. À l'inverse, les cellules tumorales prostatiques, à cause ou grâce à une diminution de l'accumulation du zinc, favorisent l'utilisation du citrate par le cycle de Krebs, l'inhibition de la m-aconitase étant levée. CK= Cycle de Krebs.

En effet, une augmentation de l'expression de HK2 a été observée dans les cancers avancés et résistant aux thérapies, dans des modèles murins mais également chez des patients. Cette augmentation de l'expression de HK2 est associée à une faible survie (Mathupala et al., 2001; Wolf et al., 2011). La progression du cancer de la prostate nécessite des modifications de

gènes comme des gènes suppresseurs comme PTEN et P53 (Shen & Abate-Shen, 2010). Dans ce contexte, il a été démontré dans des cellules tumorales prostatiques que la perte de PTEN et de p53 induisait une forte augmentation de HK2 (Wang et al., 2014). Dans leur étude, Wang et ses collaborateurs ont montré une forte expression de HK2 dans les cellules PC3 (déficientes en PTEN et P53) comparativement aux cellules LNCaP (déficientes en PTEN), DU145 (exprimant PTEN et un mutant de P53) et des cellules prostatiques saines (cellules RWPE exprimant PTEN et P53). Cette augmentation de l'activité de HK2 était nécessaire à la progression du cancer de la prostate.

Chez l'homme, les cellules épithéliales de la zone périphérique de la prostate ont la particularité de produire et d'excréter du citrate pour les sécrétions prostatiques. Ce citrate ne sera donc pas utilisé pour la production d'énergie. En effet, dans ces cellules la forte expression du transporteur de zinc ZIP1 induit une accumulation de zinc dans la mitochondrie (Costello et al., 2011), avec pour conséquence une inhibition de l'aconitase mitochondriale (m-aconitase) (Tsui et al., 2006), enzyme qui catalyse l'oxydation du citrate par le cycle de Krebs (Costello et al., 1997; Costello & Franklin, 1998). Cette particularité des cellules prostatiques, d'accumuler le zinc, et donc le citrate, leur permet de ralentir leurs activités métaboliques, ce qui leur confère un métabolisme particulier, moins efficace, quant à la production d'ATP.

Diverses stratégies sont mises en place par les cellules tumorales dans le but d'éviter ou de contourner la mort cellulaire. L'accumulation du zinc étant toxique pour la cellule car ayant une action pro apoptotique (Feng et al., 2002), les cellules tumorales prostatiques, dans le but d'éviter la mort cellulaire ont la capacité de diminuer leur accumulation de zinc (Costello et al., 2005), limitant ainsi l'inhibition de la m-aconitase. Ceci passe par une altération de l'expression des transporteurs du zinc de la famille SLC30 et SLC39 dont ZIP1 (Franz et al., 2013), et par conséquent, en permettant aux cellules d'utiliser du citrate par le cycle de Krebs, de favoriser la phosphorylation oxydative. La diminution de la quantité de zinc dans les tumeurs prostatiques est donc en partie à l'origine de l'inhibition de l'apoptose due à sa toxicité mais également de l'augmentation de leur métabolisme cellulaire en faveur de la respiration cellulaire. Les cellules tumorales prostatiques ont donc cette particularité, contrairement à la plupart des cellules tumorales, de ne pas se conformer à l'effet Warburg (Costello et al., 2004; Costello & Franklin, 2006) (**Tableau 4**).

Tableau 4: Métabolisme particulier et altérations métaboliques des cellules prostatiques au cours de la tumorigénèse et de la progression tumorale.

Modifié d'après Cutruzzolà et al., 2017.

	Cellules saines	Cellules tumorales	Cellules métastatiques
Phosphorylation oxydative	Inactive	Active	Inactive
Cycle de Krebs	Inactif	Actif	Inactif
Glucose	Consommé	Consommé	Consommé
Lactate	-	Consommé	Accumulé
Citrate	Secrété	Consommé	-

L'altération de la glycolyse et des phosphorylations oxydatives est à la base de l'augmentation de la glycolyse aérobie dans les tumeurs agressives. On y observe également une altération du métabolisme des acides gras, comparativement aux cellules saines (Kelly et al., 2016).

2. Le métabolisme lipidique

Comme dit précédemment, contrairement à la plupart des tumeurs solides qui mettent en place un « switch glycolytique », dans la tumorigénèse du cancer de la prostate, il a plutôt été observé une préférence des lipides comme substrat métabolique (Liu, Zuckier, et al., 2010). Le cancer de la prostate est en effet considéré comme un cancer non glycolytique, caractérisé par une augmentation de la lipogenèse aux stades précoces de la pathologie. Le métabolisme lipidique est ainsi également modifié dans le cancer de la prostate, et est associé à la progression de la pathologie, un mauvais pronostic et une faible survie (Kuhajda et al., 1994; Menendez & Lupu, 2007; Rossi et al., 2003). De plus, les dérégulations au niveau lipidique dues à des pathologies telles que l'obésité, le diabète ou encore, les syndromes métaboliques sont liées à une augmentation du risque de développer un cancer de la prostate. Toutefois, les mécanismes impliqués restent en partie inconnus (Suburu & Chen, 2012).

Les principales modifications au niveau lipidique se déroulent au niveau de la synthèse *de novo* des lipides, de la β -oxydation, des phosphorylations oxydatives et du cycle de Krebs (Giunchi et al., 2019), ayant ainsi des conséquences sur le comportement cellulaire. Les cellules tumorales sont également capables de capter des acides-gras circulants ou provenant d'adipocytes du microenvironnement, ou encore de mobiliser et de relarguer les lipides stockés dans les gouttelettes lipidiques, en plus de la lipogenèse (Gazi et al., 2007; Kuemmerle et al.,

2011; Zaidi et al., 2013). L'ensemble de ces acides-gras sont soit utilisés pour la production d'énergie par β -oxydation, soit stockés au niveau du cytoplasme, protégeant ainsi les cellules de l'oxydation, ou encore convertis en phospholipides, entrant ainsi dans la composition des membranes (Carracedo et al., 2013). Dans le cytoplasme, les acides-gras sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques ; leur accumulation est une particularité des cancers de la prostate agressifs ou métastatiques (Yue et al., 2014), mais aussi des cellules tumorales circulantes (Mitra et al., 2012). La lipogenèse se retrouve donc augmentée dans les cellules tumorales prostatiques suite à des modifications intervenant au niveau génétique, transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel, soit en aval des différents événements oncogéniques (comme par exemple la perte de PTEN, perte ou mutation de P53, BRCA1, activation de Akt) (Currie et al., 2013). Par exemple, la perte de l'expression de PTEN et l'activation de la voie PI3K/Akt sont impliquées dans l'accumulation des acides gras dans les cancers de la prostate agressifs (Yue et al., 2014). Comme évoqué précédemment, l'augmentation de l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse *de novo* de lipides est associée à un plus mauvais pronostic du cancer de la prostate et une faible survie (Menendez & Lupu, 2007; Rossi et al., 2003; Swinnen et al., 2002). Ainsi, un autre exemple serait la surexpression de FASN (*Fatty Acid Synthase*) retrouvée dans les lésions précancéreuses et tumorales, contrairement aux observations faites dans les cellules saines (Swinnen et al., 2002). Cette surexpression est corrélée à une progression de LGPIN vers HGPIN puis vers le stade carcinome invasif du cancer de la prostate (Rossi et al., 2003) et serait une acquisition métabolique obligatoire en réponse au microenvironnement des lésions pré-invasives (manque de nutriments, mauvaise oxygénation, augmentation de l'acidité) et serait maintenue dans les cancers invasifs (Menendez & Lupu, 2007). De plus, l'enzyme AMACR dont l'expression est amplifiée dans les cancers de la prostate, comme précédemment évoqué dans les biomarqueurs histologiques, est impliquée dans la β -oxydation des acides gras. Par ailleurs, l'inhibition d'enzymes impliquées dans le stockage des lipides induit une réduction de la prolifération, de la capacité d'invasion et une suppression de la croissance tumorale dans des modèles murins (Yue et al., 2014). Le rôle des androgènes dans l'activation de l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse, le métabolisme, l'absorption, la liaison, ou le transport des lipides a également été démontré (Barfeld et al., 2014; Swinnen et al., 1997, 2004).

Le tissu adipeux péri-tumoral joue également un rôle important dans la progression, l'agressivité et la dissémination du cancer de la prostate. En effet, en utilisant du milieu

conditionné issu de la culture d'explants de tissu adipeux péri-prostatique, une augmentation de la prolifération ainsi que des capacités migratoires des cellules tumorales prostatiques a été démontrée (Ribeiro et al., 2012; Sacca et al., 2012). De plus, l'agressivité du cancer de la prostate pourrait également être modulée par les taux élevés de cytokines, notamment l'IL-6, que contient le tissu adipeux péri-prostatique (Finley et al., 2009).

Les acides gras jouent un rôle important dans la synthèse et la perméabilité des membranes cellulaires, mais également dans l'homéostasie cellulaire en étant impliquées dans diverses voies de signalisation ; de plus, ils sont une grande source d'énergie pour la cellule. Ces modifications intervenant au niveau du métabolisme des acides gras sont une caractéristique des cellules tumorales prostatiques et entraînent une modification de leur comportement, une modification de la synthèse et de la composition de leurs membranes et engendrent par conséquent des modifications au niveau de la membrane cellulaire, attribuant finalement à ces cellules un phénotype lipogénique particulier.

Plus particulièrement, le rôle du cholestérol dans le cancer de la prostate a été étudié (Solomon & Freeman, 2011) (Pelton et al., 2012). Le cholestérol est un précurseur des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes chez les mammifères. C'est un composant essentiel des radeaux lipidiques de la membrane plasmique et assure donc également sa fonction et le maintien de son architecture. Une accumulation importante de cholestérol a été découverte dans les tumeurs prostatiques, focalisant la recherche sur son implication dans les cancers et plus précisément, le cancer de la prostate (Brown, 2007). Le lien entre cholestérol et cancer a été fait dans les années 1960, en observant des migrants japonais aux États-Unis. En effet, ces derniers présentaient 4 à 6 fois plus de risques de développer un cancer de la prostate, comparativement aux japonais vivant au Japon (Haenszel & Kurihara, 1968; Shimizu et al., 1991), mais similaires aux japonais nés aux États-Unis, faisant ressortir l'implication de l'environnement, mais aussi de l'alimentation riche en lipides et en cholestérol (*Western diet*) dans le développement du cancer de la prostate. Ces études ont toutefois été controversées, mais malgré cela, plusieurs études ont montré une corrélation entre de forts taux de cholestérol et l'apparition de formes agressives du cancer de la prostate (Pelton et al., 2012). Allant dans le même sens, d'autres études ont démontré la diminution du risque de survenue du cancer de la prostate ainsi que l'apparition des formes agressives en utilisant des statines (à action hypolipémiante, en inhibant l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase) (Freeman et al., 2006).

Une perturbation du métabolisme du cholestérol a été mise en évidence dans des tumeurs solides, dont le cancer de la prostate. Ces cellules tumorales présentent en plus la capacité à accumuler le cholestérol (Cruz et al., 2013; Freeman & Solomon, 2004; Krycer & Brown, 2013), ce qui démontrerait leur besoin accru en cholestérol. Cependant, les mécanismes mis en place restent méconnus (Murtola et al., 2012).

II. La mitochondrie

Le terme « mitochondrie » a été utilisé pour la première fois en 1898 par Carl Benda pour décrire des structures cellulaires omniprésentes probablement observées pour la première fois dans les années 1840 (Ernster & Schatz, 1981). La majeure partie de l'énergie nécessaire à la cellule est produite dans les mitochondries. Ce sont des organites présents dans presque toutes les cellules eucaryotes et leur nombre est très variable d'un type cellulaire à l'autre, en fonction de leur activité métabolique. Ainsi, les hématies en sont dépourvues, contrairement aux cellules musculaires ou neuronales qui peuvent en contenir plusieurs milliers. Ces organites ont la particularité de posséder leur propre ADN: l'ADN mitochondrial (ADNmt) dont la découverte a été faite en 1963 (Nass & Nass, 1963, 1963). Chez l'homme, l'ADNmt est bicaténaire et circulaire. Chaque mitochondrie en possède plusieurs copies. La plupart des protéines présentes dans la mitochondrie sont des protéines codées par le génome nucléaire et importées dans les mitochondries. Cependant, l'ADNmt code également un certain nombre de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative mais également des ARNs nécessaires à la traduction de ces protéines.

Chez l'être humain, les mitochondries proviennent de la mère. En effet, les mitochondries paternelles dérivées du spermatozoïde entrent généralement dans le cytoplasme de l'ovocyte après la fécondation et coexistent temporairement dans le zygote aux côtés d'un excès de mitochondries maternelles (environ une centaine de mitochondries d'origine paternelle contre environ 100 000 présentes dans l'ovule). Cependant, les mitochondries paternelles sont éliminées et ne sont jamais transmises à la progéniture (Ankel-Simons & Cummins, 1996). Les mécanismes à la base de ce phénomène sont mal connus mais deux hypothèses ont été proposées pour les expliquer : selon le premier modèle dit « modèle de dilution simple », l'ADNmt paternel serait tout simplement dilué par l'excès d'ADNmt maternel, ce qui le rendrait indétectable chez les progénitures (Gyllensten et al., 1991) ; selon

le second modèle dit « modèle de dégradation active », les mitochondries paternelles seraient tout simplement dégradées soit avant, soit après la fécondation, empêchant ainsi la transmission du patrimoine génétique mitochondrial paternel à la descendance. De récentes études vont plutôt dans ce sens, mettant en évidence l'ubiquitinylation de la prohibitine dans la dégradation sélective des mitochondries paternelles (Sato & Sato, 2013). Cette transmission est à la base de la génétique particulière rencontrée dans le cadre des maladies dites mitochondriales.

Des dysfonctionnements des mitochondries ont été mis en cause dans de nombreuses maladies incluant les maladies dites mitochondriales, le diabète sucré et le cancer. Ces dysfonctionnements ont des origines génétiques (au niveau nucléaire ou mitochondrial) et ont des impacts métaboliques ou créent des altérations dans la maintenance de l'ADN mitochondrial. En dehors de leur rôle de centrale énergétique de la cellule, les mitochondries sont également impliquées dans plusieurs processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, des processus dérégulés dans plusieurs pathologies. Ainsi, des mutations de l'ADNmt, ayant entre autres pour conséquence des anomalies biochimiques, ont été mis en évidence dans des pathologies telles que le diabète, le vieillissement, des maladies neurodégénératives mais aussi le cancer (Chatterjee et al., 2006; Krishnan et al., 2007; Sharma & Sampath, 2019; Whittaker et al., 2007).

A. Structure et dynamique

Les mitochondries sont, selon le type cellulaire et l'état métabolique, soit isolées, soit organisées en réseaux dont la morphologie suit une dynamique de fusion ou de fission. La mitochondrie isolée a une structure en forme de bâtonnet ou de sphère de 0,5 à 1 μm de diamètre (**Figure 29**).

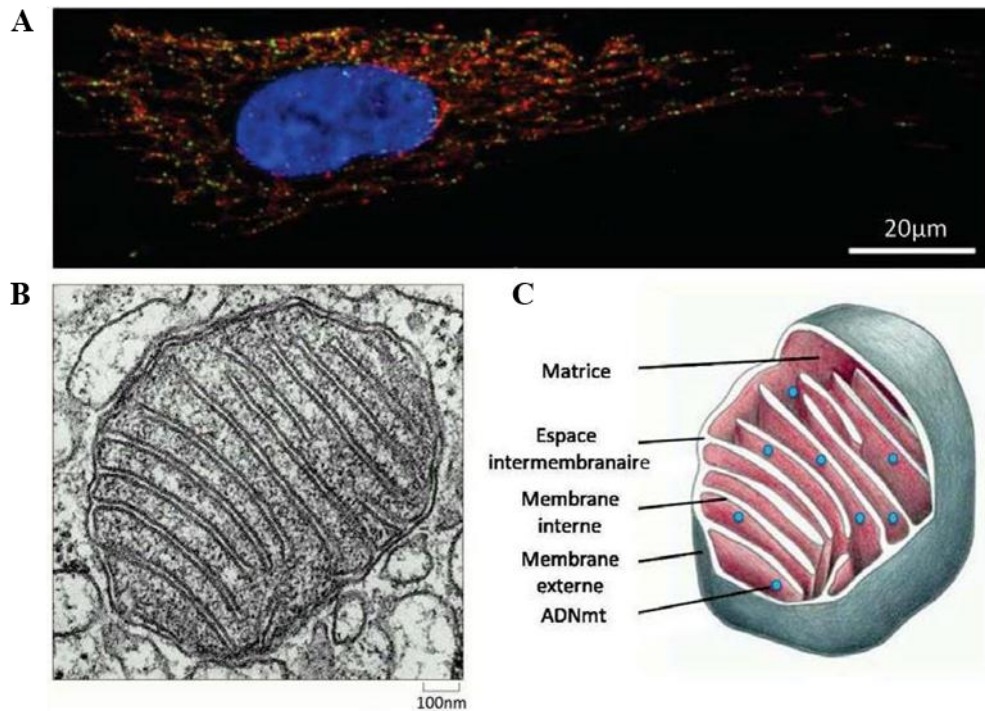


Figure 29: Structure d'une mitochondrie.

A: Observation par microscopie (épifluorescence) d'un fibroblaste humain montrant les mitochondries (grâce à un anticorps dirigé contre la protéine TOMM20 (rouge)), l'ADNmt (vert) et le noyau (ADNn marqué par DAPI: bleu). Modifié d'après Kukat et al., 2011. B: Mitochondrie de foie observée au microscope électronique. C: Schéma d'une mitochondrie. Modifiés d'après Alberts et al., 2002.

D'un point de vue structurel, la mitochondrie est délimitée par deux membranes : une membrane externe et une membrane interne (Alberts et al., 2002). Ces deux membranes ont des propriétés très différentes : la membrane externe est pauvre en protéines mais contient la porine, une protéine transmembranaire qui, en formant des canaux aqueux, permet le passage des ions et des métabolites hydrosolubles de masse molaire < 10.000 Da ; la membrane interne, contrairement à la première, est très riche en protéines mais quasiment imperméable aux ions et aux métabolites hydrosolubles. L'intérieur de la mitochondrie, délimitée par la membrane interne s'appelle la matrice. Elle contient les enzymes du cycle de Krebs mais également la plupart des enzymes responsables de l'oxydation des acides-gras. Elle contient également des ribosomes, ainsi que des ARNs de transfert spécifiques et plusieurs copies d'ADNmt (Fox, 2012). Entre les deux membranes se trouve l'espace inter-membranaire qui joue un rôle primordial dans les phosphorylations oxydatives. C'est grâce à des protéines de transport, aussi appelées « navettes », que de nombreux composés peuvent traverser la membrane interne.

L'import de protéines d'origine nucléaire se fait *via* des translocases, grâce à des signaux d'adressage mitochondrial que possèdent ces protéines (Herrmann & Neupert, 2000). Les mécanismes de reconnaissance, de translocation et de tri des protéines sont divers et sont impliqués dans la dynamique, la fonction et la biogenèse de la mitochondrie. Cinq principales voies d'import de protéines ont été mises en évidence (**Figure 30**). Elles diffèrent les unes des autres par le type de signal impliqué. La première est la voie classique des protéines portant un peptide signal en N-terminal qui leur permet d'être ciblées par les translocases. Cette voie implique des translocases de la membrane externe (TOM : *Translocase of the Outer Membrane*), de la membrane interne (TIM : *Translocase of the Inner Membrane*) et les PAM (*Presequence translocase associated motor*). Cette dernière permet l'import des protéines dans la matrice, où elles sont clivées par la MMP (*Mitochondrial Processing Peptidase*). Les quatre autres voies d'import n'impliquent pas de protéines à pré-séquence mais divers autres types de signaux de ciblage. La seconde voie d'import implique les TOM, les protéines chaperonnes TIM et TIM22. Elle permet l'import de protéines hydrophobes dans la membrane interne. Quant à elle, la troisième voie d'import est celle impliquant des tonneaux β et met en jeu TOM40, des protéines chaperonne TIM et un complexe de la membrane externe, SAM (*Sorting and Assembly Machinery*), qui permet l'insertion des protéines dans la membrane externe. La quatrième voie d'import des protéines mitochondriales concerne les protéines à motifs cystéines qui sont importées dans l'espace intermembranaire par les TOM et les MIA (*Mitochondrial Import and Assembly*). Enfin, certaines protéines de la membrane externe possèdent des segments transmembranaires hélicoïdaux. L'import et l'ancrage de ces protéines le complexe MIM (*Mitochondrial Import*) représente la cinquième voie (pour revue, Wiedemann & Pfanner, 2017).

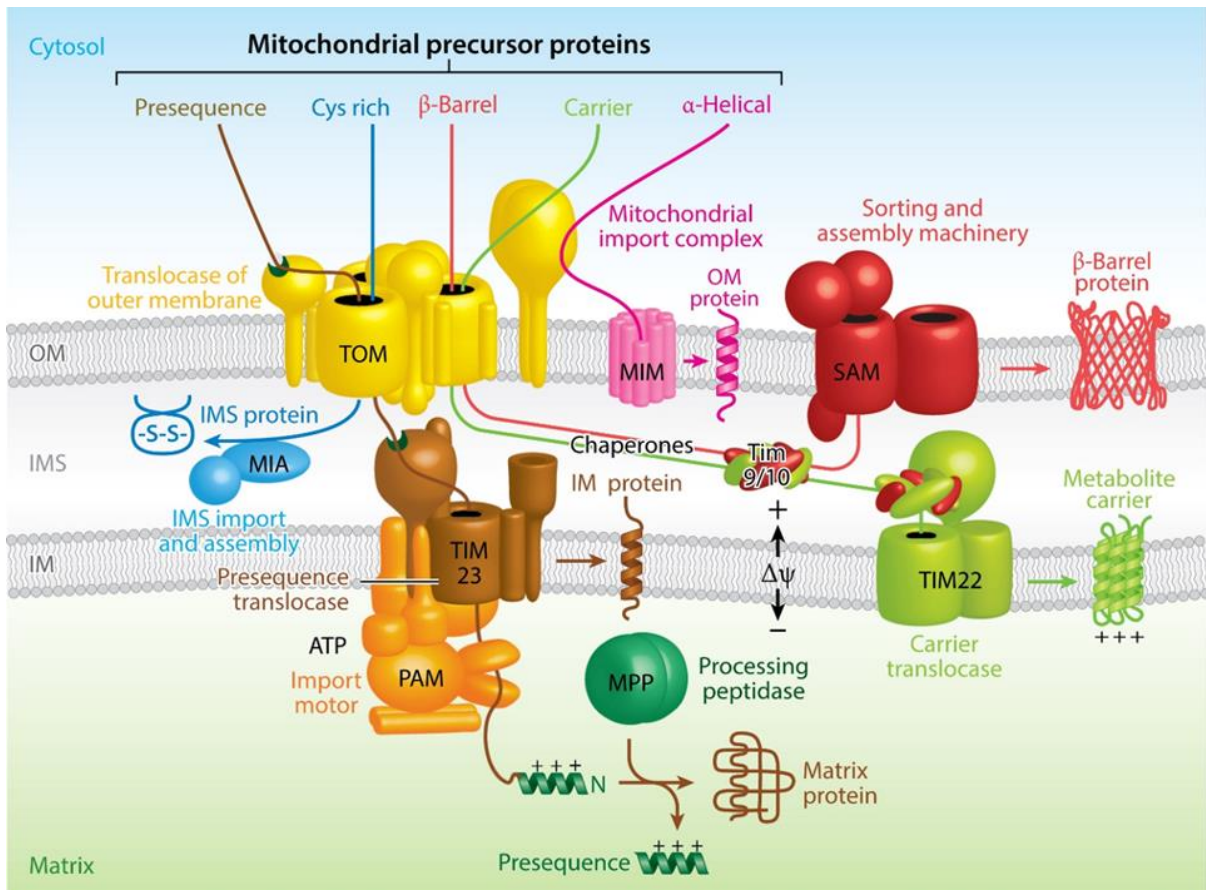


Figure 30: Les cinq voies majeures d'import de protéines mitochondriales.

D'après Wiedemann & Pfanner, 2017.

La chaîne respiratoire est localisée dans la membrane interne. Cette membrane est repliée sous forme d'invaginations appelées « crêtes mitochondriales » qui pénètrent la matrice et qui accroissent considérablement la surface de la membrane interne, permettant ainsi aux mitochondries de contenir de milliers d'exemplaires de la chaîne de transport d'électrons et d'ATP synthase. La morphologie des mitochondries, mais également des crêtes mitochondriales sont variables d'un type cellulaire à l'autre et ont une influence sur le fonctionnement de la mitochondrie (Mannella, 2006).

La dynamique du réseau mitochondrial entre en compte dans plusieurs processus dans lesquels la mitochondrie est impliquée. Par exemple, la division cellulaire nécessite des phénomènes de fission mitochondriale, afin de répartir les mitochondries dans les cellules filles. La fission mitochondriale permet également de faire le tri, d'isoler, et d'éliminer les organites

défectueux par autophagie (Twig et al., 2008). La fission mitochondriale est principalement assurée par Drp1, une protéine cytosolique, recrutée à la membrane externe des mitochondries où elle permet la constriction des membranes suivie de la fission des mitochondries. À l'inverse de la fission, en fusionnant entre elles, les mitochondries permettent une meilleure répartition des métabolites, des protéines, ainsi que de l'énergie produite. L'ADNmt existe sous différentes formes dues à des mutations : on parle d'hétéroplasmie (coexistence de copies d'ADNmt sauvage et mutés au sein d'une même mitochondrie ou au sein d'une même cellule). Les phénomènes de fusion permettent donc le mélange du contenu génétique de différentes mitochondries de la cellule, contrant ainsi des déficiences de la chaîne respiratoire qui auraient pour cause des mutations de l'ADNmt (Ishihara et al., 2015; Youle & van der Bliek, 2012). Contrairement à la fission, la fusion mitochondriale nécessite la fusion des membranes externes puis des membranes internes. Ces mécanismes sont assurés par les Mitofusines 1 et 2 (Mfn1 et Mfn2), ancrées dans les membranes externes par des domaines transmembranaires (Westermann, 2010). Les guanosines triphosphatases (GTPases), appartenant à la famille des dynamines, sont fortement impliquées dans la fission et la fusion mitochondriales. La GTPase clé de la fusion est Opa1. Elle possède huit isoformes chez les mammifères et comporte un à trois sites de clivages protéolytiques. La balance forme clivée/forme longue régule la fusion mitochondriale. L'un des sites est clivé par Oma1, ceci, uniquement lorsque les mitochondries sont dépolarisées ou présentent un autre défaut, permettant de contrôler la qualité du réseau en empêchant donc la fusion de la mitochondrie (Baker et al., 2014; van der Bliek et al., 2013). La bonne régulation de ces protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale est essentielle pour le bon fonctionnement de la cellule. En effet, des défauts de fonctionnement de ces protéines sont à la base de plusieurs pathologies (Chan, 2020) (**Figure 31**).

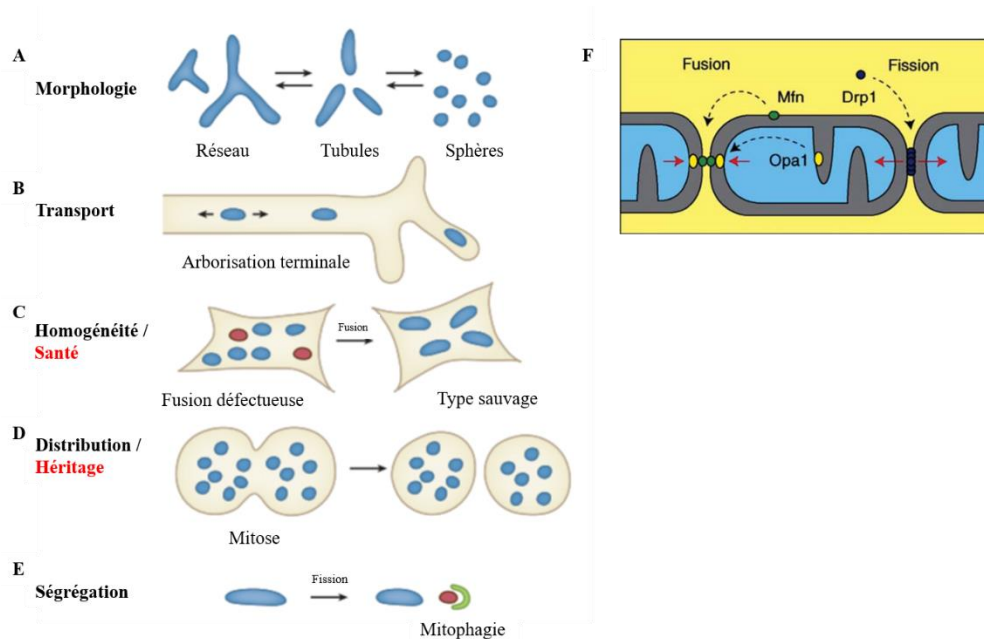


Figure 31: Dynamique mitochondriale.

Les mitochondries défectueuses sont représentées en rouge. A: la balance entre les phénomènes de fusion et de fission contrôle la forme, le nombre et la taille du réseau mitochondrial. B: La fission mitochondriale facilite le transport des mitochondries dans les axones. C: La fusion mitochondriale permet le maintien d'une population homogène pouvant tolérer des niveaux élevés de mutation de l'ADNmt. D: La fission mitochondriale permet une meilleure distribution entre les cellules filles lors de la mitose. E: La fission mitochondriale permet de générer de petits fragments de mitochondrie, détruits ensuite par mitophagie. Modifié d'après Chan, 2020. F: les acteurs de la dynamique mitochondriale: les mitofusines Mfn1/2 et Opa1 sont responsables de la fusion mitochondriale; Drp1 est quant à elle impliquée dans la fission mitochondriale. D'après Van der Blik et al., 2013.

B. Quelques fonctions de la mitochondrie

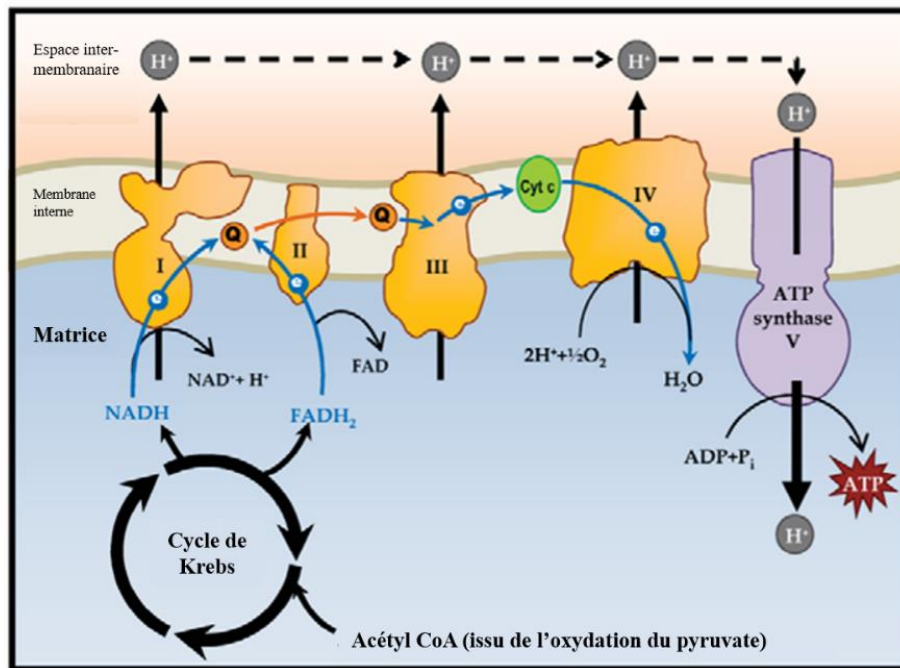
La mitochondrie est un organe clé de la cellule. En effet, elle est impliquée dans plusieurs mécanismes nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Nous nous limiterons à quelques-uns impliqués dans le cancer de la prostate et les mécanismes de résistance à la radiothérapie dans ce paragraphe.

1. Le métabolisme cellulaire

Comme évoquée précédemment, la glycolyse, le cycle de Krebs et la β -oxydation sont des voies cataboliques qui produisent du pouvoir réducteur sous forme de coenzymes réduites (NADH et FADH₂). Dans la mitochondrie, l'ATP est produite par la conversion de ce pouvoir réducteur grâce à la chaîne respiratoire et l'ATP synthase : ce sont les phosphorylations

oxydatives, permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP. Le transfert du pouvoir réducteur issu de la glycolyse du cytosol vers la mitochondrie met en jeu les porines (au niveau de la membrane externe) et deux systèmes « navettes » au niveau de la membrane interne (la navette malate-aspartate dans les tissus tels que le foie, le rein ou le muscle cardiaque ou la navette glycérolphosphate dans les muscles squelettiques ou le cerveau) (Borst, 2020; Dawson & Cooney, 1978). Les organismes aérobies synthétisent l'ATP principalement par deux voies : les réactions de phosphorylation au niveau du substrat au cours de la glycolyse qui se déroule dans le cytosol et les phosphorylations oxydatives dans les mitochondries au niveau de leur membrane interne. La phosphorylation oxydative ou respiration cellulaire permet de produire dix-sept fois plus d'ATP que la glycolyse seule pour une même quantité de glucose dégradée, faisant d'elle la source majoritaire d'énergie (Papa et al., 2012).

La chaîne respiratoire est une chaîne de transport d'électrons, qui, en réoxydant les coenzymes réduites issues des réactions du catabolisme grâce à l'oxygène (accepteur final d'électrons), crée et maintient un gradient électrochimique de protons entre la matrice et l'espace intermembranaire. C'est la force motrice générée qui permet à l'ATP synthase d'assurer la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes enzymatiques auxquels s'ajoute le complexe V ou ATP synthase. Particulièrement volumineux, ces cinq complexes sont disposés de manière asymétrique dans la bicouche lipidique. Chacun d'eux est composé de nombreuses sous-unités protéiques, codées soit par l'ADNmt ou soit par l'ADN nucléaire (**Figure 32**) (Yusoff, 2015). Ces protéines ont des propriétés d'oxydo-réduction, notamment grâce aux groupements prosthétiques qui sont associés à certaines protéines. Ces groupements prosthétiques peuvent être des hèmes à atomes de cuivre ou de fer, des centres fer-soufre (Fe-S) des flavines (FMN, FAD). En plus de ces complexes, la chaîne respiratoire met en jeu deux petites molécules indépendantes et mobiles dans la bicouche lipidique : l'ubiquinone (UQ) et le cytochrome c lié de façon faible à la face externe de la membrane interne de la mitochondrie.



Complexes	I NADH déshydrogénase	II Succinate déshydrogénase	III Ubiquinone-cytochrome c réductase	IV Cytochrome c oxydase	V ATP synthase
Gènes { nucléaires	38	4	10	10	14
mitochondriaux	7	0	1	3	2

Figure 32: Chaîne respiratoire mitochondriale.

Les complexes I, III et IV génèrent des protons qui sont expulsés dans l'espace inter-membranaire, créant ainsi un flux de protons qui reviennent vers la matrice par l'ATP synthase, permettant ainsi la production d'ATP. Modifié d'après Yusoff, 2015.

Le complexe I : également appelé NADH - ubiquinone oxydoreductase (NUR) ou NADH déshydrogénase. Le complexe I est une protéine de très grande taille. C'est le composant le plus volumineux de la chaîne respiratoire. Chez la plupart des organismes, sa forme rappelle grossièrement celle d'une botte. Chez les mammifères, il possède 46 sous-unités codés à la fois par des gènes mitochondriaux et des gènes nucléaires et a une masse d'environ 850 kDa (Lenaz et al., 2006). Ses principaux coenzymes sont les FMN et les centres Fe-S. Il possède un site de liaison au NADH tourné vers la matrice. La réaction est initiée par la liaison d'une molécule de NADH au complexe I et la cession d'une paire d'électrons du NADH (sous forme d'ion hydrure, H⁻) à un ensemble de protéines Fe-S qui les transfèrent au coenzyme Q (ou ubiquinone). Alors que les électrons circulent à travers le complexe I, quatre protons sont

pompés hors de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire à travers la membrane interne, créant un gradient électrochimique de protons transmembranaires. Son inhibiteur spécifique est la roténone qui bloque les électrons au niveau de ce complexe.

Le complexe II : ou succinate - ubiquinone oxydoreductase (SUR) ou encore succinate déshydrogénase. Il s'agit d'une enzyme du cycle de Krebs qui catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et assure le transfert des électrons grâce à son coenzyme, le FAD. Ce complexe possède d'autres coenzymes Fe-S et un cytochrome b, qui participent au transfert des électrons du FADH₂ à l'UQ. Cette dernière reçoit donc les électrons du NADH *via* le complexe I mais également du succinate *via* le complexe II. Sa forme réduite est l'ubiquinol (UQH₂) qui diffuse dans la membrane vers le complexe III où elle est oxydée de nouveau en UQ. Ces réactions se font sans flux de protons compte tenu de la faible différence de potentiel d'oxydoréduction entre les donneurs et les accepteurs d'électrons mis en jeu et donc de la faible variation d'énergie libre qui résulte de ces réactions de transfert d'électron. Ce complexe a toutefois son importance puisque c'est par lui qu'entrent les électrons issus de l'oxydation du succinate dans le cycle de Krebs mais aussi ceux du NADH,H⁺ formé lors de la glycolyse.

Le complexe III : ou ubiquinol cytochrome c oxydoreductase (UCCR) ou encore coenzyme Q-cytochrome c réductase. Il est composé de cytochrome b, de cytochrome c1 et d'une protéine Fe-S. Il accepte les électrons de l'UQ réduite et les transfère à deux molécules de cytochrome c (différent du cytochrome c1. Le complexe III fonctionne comme une pompe à protons puisqu'il couple ce transfert d'électrons à la translocation de 2 x 2 protons vers l'espace inter-membranaire. Un inhibiteur spécifique de ce complexe est l'antimycine A, un composé chimique produit par certaines bactéries.

Le complexe IV : ou cytochrome c oxydase (COX). Ce complexe contient des cytochromes a et a₃ ainsi que deux ions cuivre (Cu_A et Cu_B). Il assure l'oxydation du cytochrome c et la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Le dioxygène est l'accepteur final des électrons et l'eau constitue le produit final de la chaîne respiratoire. À l'instar des complexes I et III, le complexe IV permet la translocation de protons; des protons de la matrice sont donc consommés pour former de l'eau mais sont également expulsés vers l'espace intermembranaire, ce qui contribue encore à l'augmentation du pH matriciel et à la diminution du pH intermembranaire. Le cyanure est un inhibiteur spécifique de ce complexe. Il en existe de nombreux dérivés, très toxiques et fabriqués par des bactéries et champignons. Un des dérivés,

l'amygdaline, est également présent dans des noyaux de cerise ou d'abricot.

Le complexe V : aussi appelé ATP synthase, permet la fabrication de l'ATP en se servant du gradient électrochimique de protons comme source d'énergie. Ce complexe n'est pas un complexe respiratoire puisqu'il ne contribue pas au transfert des électrons à l'oxygène mais il est étroitement lié à la chaîne respiratoire dans le processus des phosphorylations oxydatives. L'ATP synthase est un complexe protéique de grande taille formé de deux parties distinctes : une partie F_0 , transmembranaire, qui constitue un tunnel à protons et une partie F_1 , du côté de la matrice, qui constitue la partie catalytique du complexe. L'ensemble couple le retour des protons vers la matrice à la réaction de synthèse d'ATP. La partie F_0 du complexe est sensible à l'oligomycine (d'où l'indice « o » qui lui est attribué).

Mécanisme général de la chaîne respiratoire : Comme nous venons de la voir, la chaîne respiratoire assure un transfert des électrons du NADH (et succinate) à l'oxygène. Les électrons passent du complexe I (ou II pour ceux du succinate) au complexe III, *via* l'ubiquinone, puis au complexe IV *via* le cytochrome c. ce dernier complexe (IV) cède enfin les électrons à l'oxygène, accepteur final. L'énergie libre générée par ces réactions d'oxydoréduction est utilisée au niveau des complexes I, III et IV pour transférer des protons contre leur gradient de concentration, de la matrice vers l'espace inter-membranaire. L'accumulation des protons dans l'espace inter-membranaire aboutit à une différence de concentration en protons et donc de pH (1,4 unité de pH), la matrice devenant basique par rapport à l'espace inter-membranaire, et contribue à la différence de potentiel électrique transmembranaire comprise entre -150 et -180mV (intérieur négatif). La force protomotrice résultant de ce gradient électrochimique de protons « pousse » les protons à revenir vers la matrice. La membrane interne étant imperméable aux protons, c'est la partie F_0 de l'ATP synthase qui va permettre ce retour et déclencher la synthèse d'ATP par la tête catalytique F_1 . C'est donc le gradient électrochimique de protons qui couple le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire à la phosphorylation de l'ADP en ATP : c'est le couplage chimio-osmotique suggéré par Mitchell (et acceptée par tous aujourd'hui) dans les années 1960 (Mitchell, 1961). L'ATP ainsi produit dans la matrice mitochondriale est transporté dans l'espace inter-membranaire par l'adénine nucléotide translocase (ANT). Il s'agit d'un antiport qui permet l'export d'ATP contre l'import d'ADP. L'ATP libéré dans le cytosol est ensuite utilisée dans des réactions chimiques nécessitant de l'énergie. Les phosphorylations oxydatives sont également régulées par la concentration en ADP qui est corrélée à l'utilisation d'ATP.

L'inhibition de l'ANT inhibe les phosphorylations oxydatives (Schirris et al., 2015).

Comme dit précédemment, la génération de l'eau par la réduction de l'oxygène dans la chaîne respiratoire nécessite deux protons et quatre électrons. Cependant, une proportion de l'oxygène échappe à la réduction complète en eau (seulement un ou 2 électrons sont transférés), générant ainsi la production de ROS : l'ion superoxyde O_2^- et peroxyde O_2^{2-} respectivement. Ces dérivés de l'oxygène sont instables, très réactifs et potentiellement dangereux pour la cellule du fait de leur capacité à oxyder l'ADN, les protéines et les lipides membranaires (Kong et al., 2014).

La mitochondrie est donc au centre de l'énergétique cellulaire, mais sa fonction ne se limite pas à la production de l'ATP. En effet, outre ses fonctions dans le métabolisme énergétique, elle est également impliquée dans bien d'autres mécanismes cellulaires, renforçant leur importance dans la cellule. Ainsi elle est impliquée dans l'apoptose, la synthèse de nombreux composés tels que les hormones stéroïdiennes, les pyrimidines, mais aussi dans l'homéostasie du calcium (Doghman-Bouguerra & Lalli, 2017; Giorgi et al., 2012; Papadopoulos & Miller, 2012; Pesini et al., 2019; Rizzuto et al., 2012). Elle permet notamment le stockage du calcium en cas d'élévation importante de la concentration en ions calciques cytosoliques durant diverses circonstances anormales, telle que l'ischémie, protégeant ainsi la cellule (Fonteriz et al., 2016). Une partie de ces processus ne sera pas abordée dans le cadre de mes travaux de recherche ; nous limiterons dans ce manuscrit à son rôle dans l'apoptose.

2. L'apoptose

Longtemps confondu avec la nécrose, puis désignée comme « nécrose contractée » en 1971, le terme « apoptose » a été utilisé pour la première fois en 1972 (Kerr, 2002; Kerr et al., 1972). Le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose a été mis en évidence en 1994 (Kroemer, 2001). L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus par lequel les cellules, suite à un signal, déclenchent leur autodestruction. Dans les conditions physiologiques, ce processus est en équilibre avec la prolifération cellulaire et cet équilibre est nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Par exemple, l'apoptose joue un rôle primordial dans les mécanismes de défense mis en œuvre lors de réactions immunes (Akhtar & Bokhari, 2021; Elmore, 2007). L'apoptose se manifeste par la condensation du cytoplasme, le bourgeonnement des membranes cytoplasmiques et nucléaire, la compaction de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Au niveau de la membrane plasmique, les phosphatidylsérines sont externalisés

(caractéristique exploitée pour identifier cette voie de mort cellulaire) et la cellule est segmentée en vésicules, formant ainsi des corps apoptotiques. Ces derniers vont être phagocytés par les macrophages (**Figure 33**) (Abou-Ghali & Stiban, 2015).

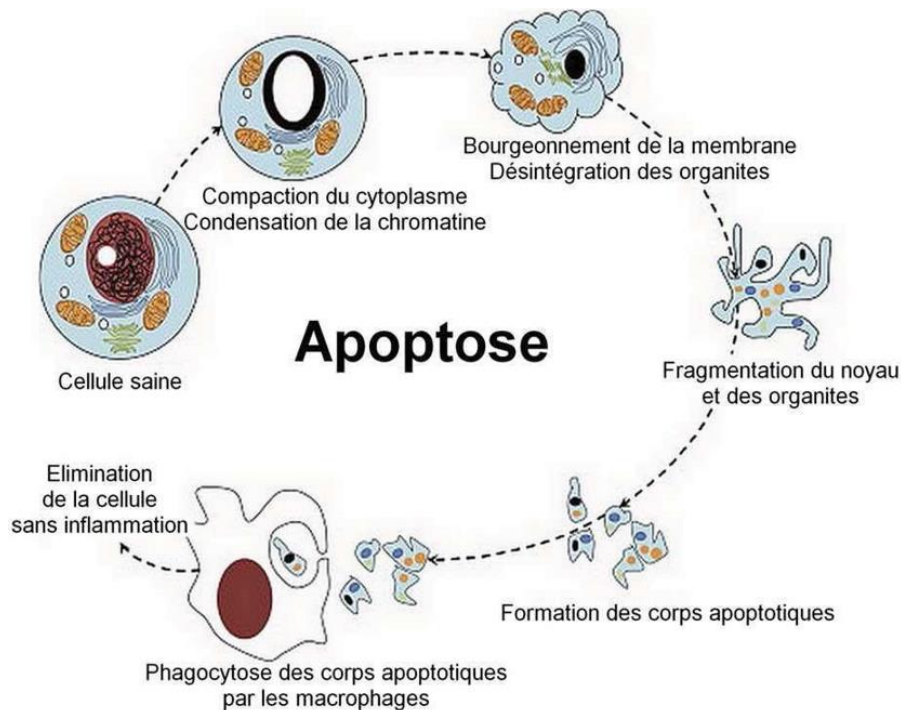


Figure 33: Changements morphologiques subits par une cellule rentrant en apoptose.

Modifié d'après Abou-Ghali et Stiban, 2015.

Deux voies distinctes mais interconnectées de l'apoptose existent : l'apoptose extrinsèque, qui passe par l'activation de récepteurs membranaires et l'apoptose intrinsèque qui passe par l'activation de protéines mitochondriales (**Figure 34**) (Goldar et al., 2015).

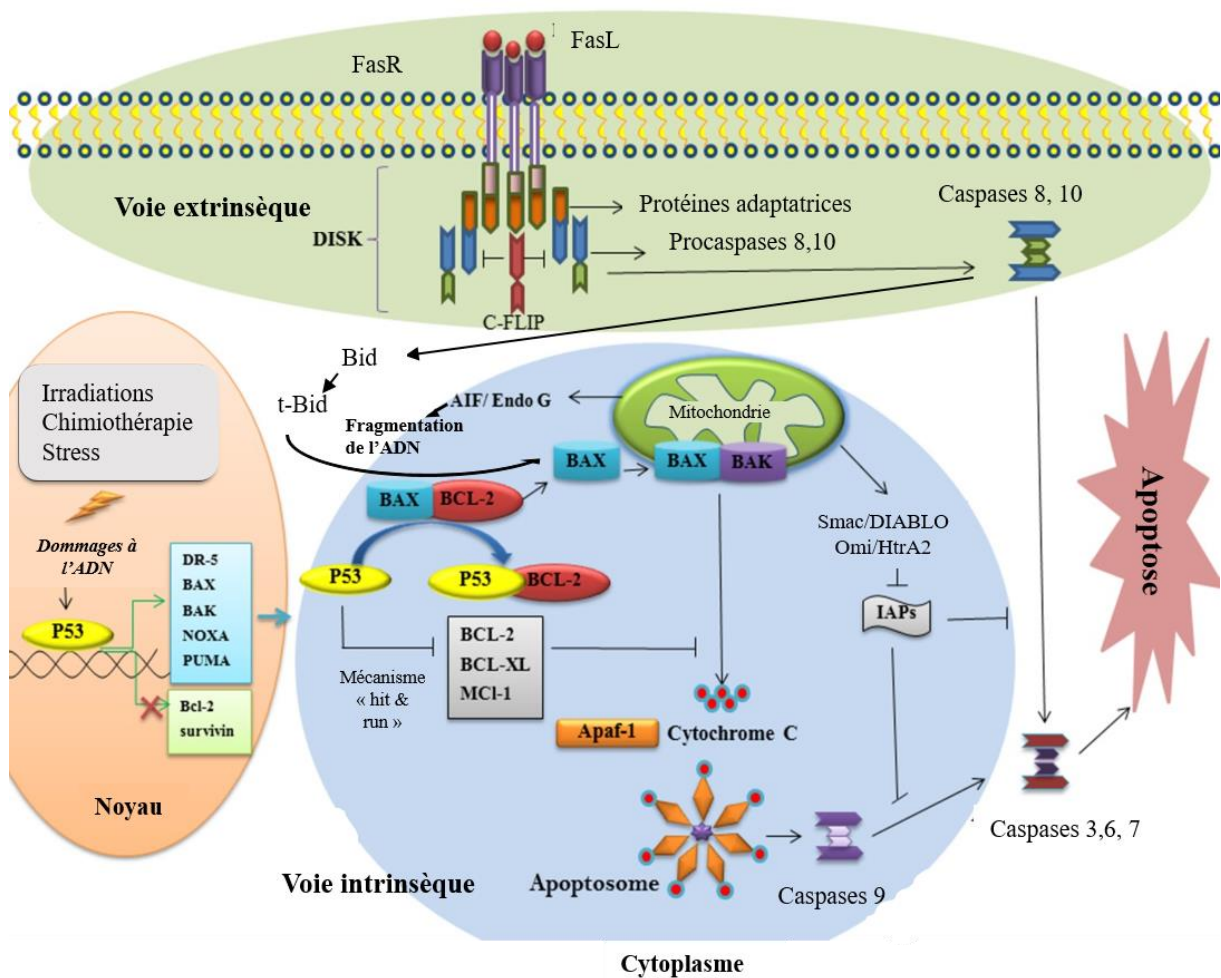


Figure 34: Activation de l'apoptose via ses voies extrinsèque et intrinsèque

Modifié d'après Goldar et al., 2015.

La voie extrinsèque également appelée « voie des récepteurs de mort cellulaire » passe par l'activation de récepteurs de mort situés sur la membrane plasmique, à l'exemple de la superfamille des Tumor Necrosis Factor ou TNF comprenant les récepteurs FAS ou TNF α , suite à des signaux externes à la cellule. Ceci déclenche une série de mécanismes conduisant à l'activation de caspases. Les caspases sont des protéines à cystéine qui reconnaissent et clivent leurs substrats protéiques après un résidu aspartique. Les caspases 3, 8, 9 et 10 interviennent dans cette voie (Elmore, 2007; Locksley et al., 2001).

La voie apoptotique intrinsèque ou « voie mitochondriale », contrairement à la précédente, est déclenchée suite à des signaux internes à la cellule, lorsque celles-ci sont lésées ou soumises à un stress tel que des dommages de l'ADN ou l'augmentation de la quantité de

ROS. L'activation de cette voie induit la formation de pores de transition de perméabilité dans la membrane mitochondriale. Ces pores sont constitués par la porine au niveau de la membrane externe et de l'ANT au niveau de la membrane interne et leur formation induit une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, suivi du gonflement de la matrice mitochondriale, d'une interruption du métabolisme mitochondrial et d'un stress oxydant. La perméabilisation de la membrane mitochondriale est sous le contrôle de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, localisées dans le cytosol (Bax, Bad) et de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-XI, Bcl-2, Mcl-1) présents au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Ces dernières en séquestrant des molécules pro-apoptotiques, empêchent la perméabilisation de la membrane, et permettent ainsi la stabilité de la mitochondrie. En effet, ces protéines anti-apoptotiques forment des hétérodimères avec les protéines pro-apoptotiques. Les molécules pro-apoptotiques cytosoliques vont alors inhiber les protéines anti-apoptotiques, activant des protéines pro-apoptotiques effectrices telles que Bax et Bak (Bhola & Letai, 2016). Ainsi, l'entrée de la cellule en apoptose par la voie intrinsèque est déterminée par le rapport protéines pro-apoptotiques/protéines anti-apoptotiques (Gibson & Davids, 2015). L'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques effectrices va induire la formation de pores et par conséquent la perméabilisation de la membrane mitochondriale, libérant ainsi dans le cytosol des molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome c, Smac/DIABLO, OMI/HtrA2, l'endonucléase-G, l'*Apoptosis Inducing Factor* (AIF) ainsi que les procaspases 2, 3 et 9. Une fois dans le cytosol, ces facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux vont avoir des cibles et des effets spécifiques : le cytochrome c et la procaspase 9 s'associeront à APAF-1, formant ainsi l'apoptosome à la suite de laquelle la procaspase sera activée par clivage, libérant la caspase 9 capable d'activer à son tour des caspases effectrices comme la caspase 3 (Hill et al., 2004). Une cascade d'activation de caspases s'ensuivra et induira grâce à leur activité protéolytique, la dégradation de protéines cytosoliques et nucléaires mais également l'activation des nucléases, dont l'endonucléase G, également libérée dans le cytosol. Cette dernière participera à la dégradation de l'ADN nucléaire. Smac/DIABLO et OMI/HtrA2 sont quant à elles responsables de l'inhibition des protéines de la famille des *Inhibitor of apoptosis* (IAP) (Kocab & Duckett, 2016). Enfin, l'AIF ne nécessite aucun autre intermédiaire et va emprunter une voie indépendante des caspases. Il se relocalisera dans le noyau cellulaire où il induira la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN nucléaire (Candé et al., 2002). La voie intrinsèque peut être déclenchée par l'activation de p53 mais également par les intermédiaires lipidiques comme le céramide, un sphingolipide (combinaison d'un acide gras avec la sphingosine) (Pettus et al., 2002). La voie

p53-dépendante est activée suite à la détection de dommages non réparables de l'ADN par exemple. L'activation de p53 va avoir un impact sur le contrôle du cycle cellulaire et sur l'activation de gènes comme APAF-1 (Robles & Curtis, 2001) et sur la transcription des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Nakano & Vousden, 2001; Oda et al., 2000) qui vont initier l'apoptose comme précédemment décrit. L'activation de l'apoptose intrinsèque par les céramides fait intervenir plusieurs voies de signalisation. Ces molécules sont retrouvées en abondance dans les membranes cellulaires et sont impliquées entre autre dans la signalisation lipidique, la différenciation cellulaire ou l'apoptose. La régulation des niveaux de céramide est contrôlée par les enzymes responsables de leur synthèse (sphingomyélinases (SMase), sphingomyéline synthases (SMS) et de leur catabolisme (céramidases). Les céramides sont impliqués dans la voie apoptotique déclenchée par les radiations ionisantes. En effet, une délétion en SMases induit une résistance aux irradiation γ dans des fibroblastes (Krönke, 1999). L'activation de l'apoptose par les céramides passe par des molécules comme la cathepsine D, les CAPK (*ceramide activated protein kinase*) qui inhibent l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 en la phosphorylant (Heinrich et al., 2000; Müller et al., 1995). Ceci a pour conséquence le relargage de cytochrome c et l'activation de la caspase 9 (Ruvolo et al., 1998; Sawada et al., 2000).

Les voies extrinsèques et intrinsèque de l'apoptose ne sont pas totalement indépendantes les unes des autres. En effet, Bid est une protéine pro-apoptotique qui permet la liaison entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque : elle peut être activée par le récepteur de mort FAS et suite à son activation, interagir directement avec Bax et Bak, induisant la perte de leur interaction avec les protéines anti-apoptotiques, leur oligomérisation, la formation de pores et le relargage de protéines mitochondriales. De plus, la voie des céramides serait également active par TNF mais également par p53 et Rb (Dbaibo et al., 1995; Lee et al., 2000; Sawada et al., 2001; Yang & Duerksen-Hughes, 2001). En effet, il a été récemment démontré que les radiations ionisantes ainsi que l'actinomycine D par exemple, induisaient la production de céramides dépendamment de p53 et d'une production d'anions superoxyde. Contrairement à p53 dont l'activation est en amont de cette voie, la déphosphorylation de Rb se situe plutôt en aval. Par leurs liens avec ces deux dernières molécules, en plus d'induire l'apoptose, les céramides sont également impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Alberts et al., 1993; Kim et al., 2000, p. 53).

L'apoptose est un mécanisme dérégulé lors de la tumorigénèse. L'implication de la

mitochondrie dans ce processus fait ressortir son rôle important dans le développement des cancers.

C. L'ADN mitochondrial

Les mitochondries sont des organites particuliers dans le sens où elles possèdent dans leur matrice leur propre information génétique : l'ADN mitochondrial (ADNmt). Chez l'Homme, ce génome, contrairement au génome nucléaire (ADNn), est circulaire et est composé de 16 569 paires de bases (pb). Il a été séquencé pour la première fois par Anderson et ses collaborateurs (Anderson et al., 1981) (**Figure 35**). Composé d'un brin lourd et d'un brin léger, complémentaires, il ne possède aucun intron et n'est pas associé à des histones. Ses deux brins diffèrent dans leur composition : un brin riche en guanines dit brin lourd (*heavy strand* ou brin H), et un brin riche en cytosines, dit brin léger (*light strand* ou brin L). Il comporte 37 gènes (contre environ 25000 pour l'ADNn) qui codent 13 protéines impliquées dans la chaîne respiratoire, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiques (ARNr 12S et 16S). Le brin lourd code 14 ARNt, les 2 ARNr et 12 protéines tandis que le brin léger code les 8 ARNt restant et une sous unité du complexe I (ND6). D'autres protéines sont impliquées dans la mitochondrie mais sont codées par le noyau et importées dans les mitochondries grâce à des transporteurs (Fox, 2012), d'où la nécessité d'une communication moléculaire entre le noyau et la mitochondrie. L'ADNmt comprend également deux régions non codante non similaires qui contiennent les origines de réplication et les promoteurs de transcription des brins lourds et légers : en effet, la plus longue, régulant à la fois la réplication et la transcription de l'ADNmt comporte l'origine de réplication du brin lourd (OriH), les promoteurs transcriptionnels des brins lourd et léger (HSP et LSP) ainsi que la boucle de déplacement (D-Loop) alors que la plus courte ne contient que l'origine de réplication du brin léger (OriL).

L'ADNmt est dynamique et il existe une hétéroplasmie au sein des mitochondries : en effet, il existe sous 2 à 10 copies qui peuvent différer dans une mitochondrie, soit environ 1000 à 10000 copies d'ADNmt par cellule, représentant environ 1% de l'ADN cellulaire total d'une cellule somatique. L'ADNmt évolue grâce à des mécanismes de recombinaison homologue et les copies de l'ADNmt répliquées indifféremment du cycle cellulaire (Falkenberg et al., 2007), sont réparties aléatoirement lors des divisions cellulaires. Chez les mammifères, l'ADNmt se présente sous forme de complexes protéines-ADN, appelés nucléoïdes, distribués de manière hétérogène dans la matrice mitochondriale selon les conditions cellulaires. Ces nucléoïdes

aussi de l'ADNn, (puisque ce dernier code également des protéines impliquées dans la chaîne respiratoire), entraînant principalement un défaut de la chaîne respiratoire. De plus, un dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial s'ajoute à ces causes. Un large spectre de symptômes sont associés aux maladies mitochondriales (désordres du mouvement, cécité, surdité, épilepsie, accidents vasculaires) et les tissus les plus énergivores sont bien souvent les plus touchés (système nerveux central, les muscles dont le cœur). Les dysfonctionnements mitochondriaux sont également impliqués dans les processus de vieillissement et dans les pathologies liées à l'âge (Bratic & Larsson, 2013; Kudryavtseva et al., 2016).

Les mitochondries d'un individu étant un héritage maternel, la transmission de l'ADNmt se fait en conséquence de manière non mendélienne, à l'exception de certains animaux, plantes et champignons. Cette hérédité uni-parentale présente l'avantage de permettre le suivi des populations et d'analyser ainsi la diversité génétique de nos ancêtres.

Comme déjà mentionné, même si dans la plupart des cas, les molécules d'ADNmt d'une cellule sont identiques, il peut arriver que molécules d'ADNmt différentes coexistent dans la même cellule : on parle respectivement d'homoplasmie et d'hétéroplasmie. Cependant, pour une mutation mitochondriale donnée, la répartition aléatoire des mitochondries lors de la division cellulaire permet d'obtenir différents profils cellulaires à partir d'une cellule h t roplasmique : des cellules homoplasmiques ne possédant que l'ADNmt sauvage (non muté) chez lesquelles on n'observe aucun symptôme, des cellules homoplasmiques ne possédant que des mitochondries portant la mutation et ayant pour conséquence une clinique sévère et enfin, des cellules h t roplasmiques pour lesquelles la répercussion clinique se fera en fonction du taux de mutation (Sproule & Kaufmann, 2008; van Eijsden et al., 2008; Wallace, 2018). En effet, un individu ne développera les symptômes d'une pathologie qu'une fois un seuil donné d'hétéroplasmie franchi, en fonction de la mutation. C'est l'exemple du cancer de la prostate. Nous aborderons les liens entre les mutations de l'ADNmt et la survenue du cancer de la prostate par la suite.

A. Dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial et pathologies

Pendant longtemps, le cancer a été considéré comme étant la résultante exclusivement intrinsèque à la cellule en transformation, issue de modifications génétiques, épigénétiques en plus d'un switch glycolytique seulement. La mise en évidence du rôle central de la mitochondrie

dans le développement tumoral, sa progression et la réponse aux thérapies, ainsi que l'importance du microenvironnement en lien avec la réponse tumorale ont permis une meilleure compréhension, certes toujours incomplète, du développement et de la progression tumorale, permettant ainsi le développement de nouvelles thérapies. Ainsi, des dysfonctionnements du métabolisme mitochondrial ont été mis en évidence dans plusieurs types de cancers dont le cancer de la prostate mais également dans des pathologies telles que le diabète. Nous nous concentrerons sur les cancers et plus particulièrement, le cancer de la prostate.

La découverte de l'implication de la mitochondrie dans les processus de mort cellulaire telle que l'apoptose a augmenté l'intérêt pour l'étude du rôle de la mitochondrie dans le développement des cancers. Ceci a permis de mettre en évidence les modifications du métabolisme mitochondrial dans la tumorigénèse. Ainsi, (Dang et al., 2009). Les cellules tumorales présentent ainsi une certaine plasticité métabolique leur permettant de moduler les voies métaboliques en fonction de leurs besoins énergétiques (Fendt et al., 2013; Wise et al., 2011). Le knockout de MPC1, un transporteur de pyruvate mitochondrial induit un switch métabolique vers la glycolyse, avec pour conséquence une réduction de la production d'ATP mais également une acquisition de capacités migratoires et invasives. De plus, ces cellules étaient plus résistantes à la chimiothérapie et la radiothérapie (Li et al., 2017). Par conséquent, le ciblage du métabolisme mitochondrial est devenu une stratégie thérapeutique et de sensibilisation des cellules à la chimiothérapie ou la radiothérapie (Galluzzi et al., 2013; Martinez-Outschoorn et al., 2017).

Comme dit précédemment, les cellules épithéliales de la prostate ne mettent pas en place le switch glycolytique ou l'effet Warburg au début de leur transformation maligne. Au contraire, elles présentent une forte activité du cycle de Krebs par rapport aux cellules saines, ceci, en inversant le métabolisme du citrate comme décrit précédemment. Ainsi, ces mécanismes mis en place sont nécessaires à la tumorigénèse du cancer de la prostate, en permettant entre autre aux cellules d'éviter l'apoptose et de proliférer.

Les dysfonctionnements mitochondriaux sont également des conséquences de mutations de l'ADNmt mais aussi de l'ADNn, qui participent elles-aussi au développement de pathologies, dont le cancer.

B. Les mutations de l'ADN nucléaire

Les mutations de l'ADNn peuvent avoir un impact sur les gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADNmt et ceux responsables de l'assemblage et de la stabilité des protéines de la chaîne respiratoire. C'est le cas des gènes du réplisome mitochondrial (POL γ A, POL γ B, TWINKLE), dont les mutations sont souvent retrouvées dans de nombreuses maladies mitochondriales (ophtalmoplégie externe progressive, syndrome de déplétion de l'ADNmt, ataxie spinocérébelleuse infantile) (Fratter et al., 2010; Longley et al., 2010; Van Goethem et al., 2001).

La majorité des sous-unités des complexes respiratoires est codée par le génome nucléaire. Cependant, peu de mutations de ces gènes ont été mises en évidence, probablement du fait de la fatalité de telles mutations sur l'embryon. C'est le cas par exemple du complexe IV pour lequel aucune mutation des sous-unités d'origine nucléaire n'a été décrite (Schapira, 2006, 2012). Toutefois, des dysfonctionnements de protéines codées par le noyau et impliquées dans la maintenance et l'assemblage du complexe IV, à l'exemple de SCO22, COX10 et COX15, sont impliqués dans le syndrome de Leigh, les myopathies, l'encéphalopathie et l'acidose lactique. Ces déficiences sont héritées de manière récessive. Par ailleurs, il a été démontré que des mutations de sous-unités d'origine nucléaire des complexes I et II entraînaient par exemple le syndrome de Leigh et une leucodystrophie pour le premier, et encore le syndrome de Leigh, une ataxie ainsi que des tumeurs sécrétrices de catécholamines pour le second.

Plusieurs mutations de gènes nucléaires codant des composants mitochondriaux (comme la succinate déshydrogénase ou l'iso-citrate déshydrogénase) ont été associées à un risque élevé de développer un cancer. Les mutations de l'ADNn impliquées dans la carcinogénèse peuvent se diviser en deux niveaux : celles n'ayant pas d'impact sur l'ADNmt et celles ayant un impact sur l'ADNmt. Cet aspect sera plus détaillé dans un prochain paragraphe.

C. Les mutations de l'ADN mitochondrial

À ce jour, plus de 150 pathologies liées à des mutations de l'ADNmt ont été recensées (**Figure 36**) (DiMauro, 2004; DiMauro & Davidzon, 2005). Ces mutations impactent des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire ou des ARNr ou ARNt nécessaires à la

machinerie de traduction mitochondriale.

Les mutations de l'ADNmt peuvent être des délétions ou des erreurs de réparation dont les causes sont multiples (Holt et al., 1988). Les causes des mutations et les systèmes de réparation de l'ADNmt seront abordés dans le paragraphe suivant. L'occurrence des délétions peut avoir lieu sur une paire de bases ou sur plusieurs milliers. Le plus souvent, elles sont localisées entre OriH et OriL, également appelé « arc majeur de l'ADNmt ». Elles proviendraient d'erreurs de réplication : dans le modèle de réplication par déplacement de brin, suite à un glissement dû au mésappariement de deux séquences répétées qui se suivent (Phillips et al., 2017). L'autre cause des mutations de l'ADNmt sont comme indiquées précédemment, des erreurs de réparation des cassures double-brin (Chen et al., 2011).

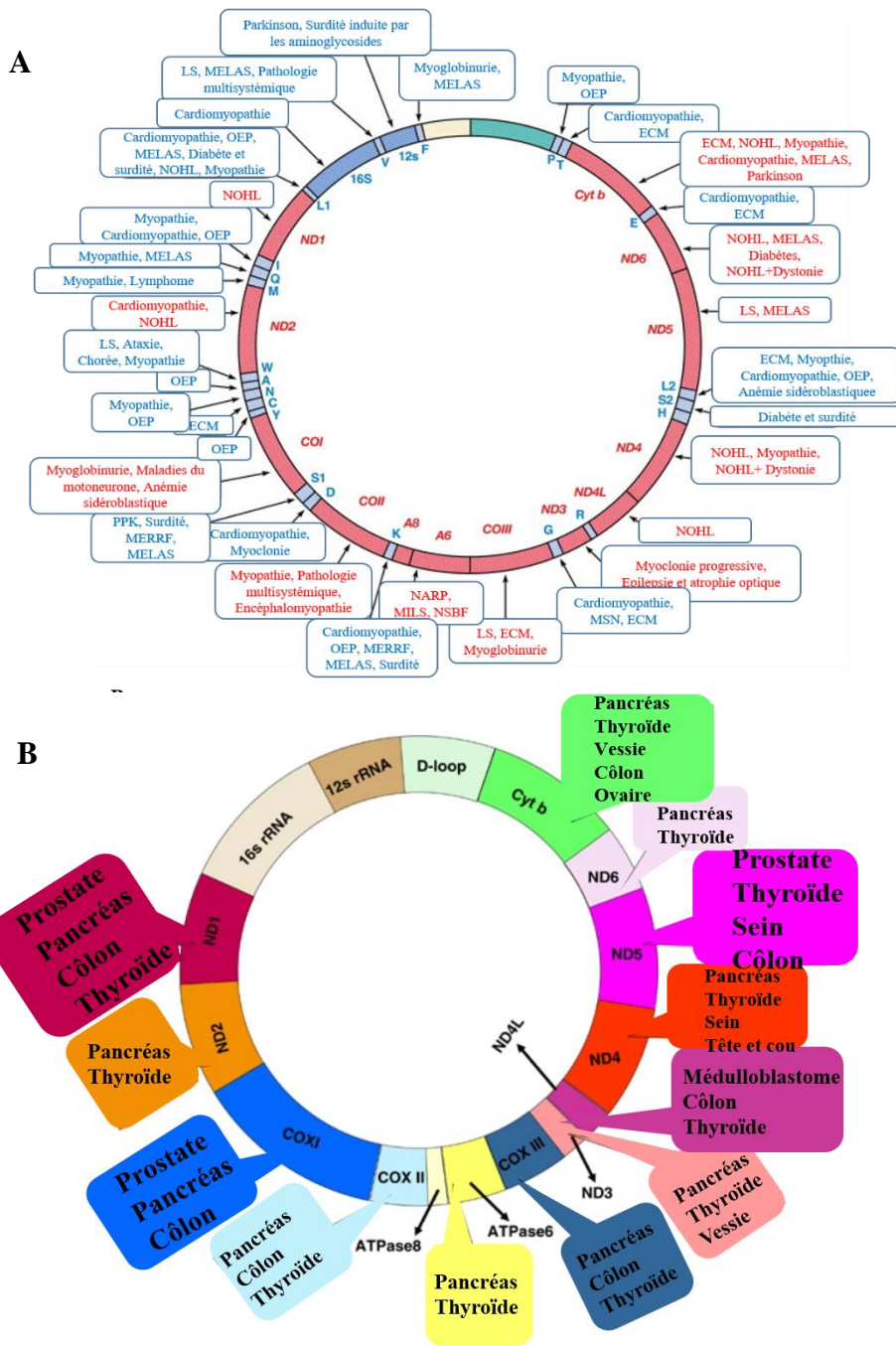


Figure 36: Pathologies et mutations de l'ADNmt.

La mitochondrie ayant des rôles clés dans la cellule, des mutations de l'ADNmt ont été mis en évidence dans plusieurs pathologies (A) dont les cancers (B). A: les pathologies dues à des mutations altérant la synthèse des protéines mitochondriales sont indiquées en bleu et celles dues à des mutations de gènes codant des protéines sont représentées en rouge. Abréviations: MELAS: encéphalomyopathie mitochondriale, acidose lactique et épisodes de type AVC; OEP: ophtalmoplégie externe progressive; NOHL: neuropathie optique héréditaire de Leber; NARP: neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire; LS: syndrome de Leigh; MILS: syndrome de Leigh hérité de la mère; MERRF: épilepsie myoclonique avec des fibres rouges déchiquetées; NSBF: nécrose striatale bilatérale familiale. Modifiés d'après DiMauro, 2004; Chatterjee et al., 2006.

Le lien entre la mitochondrie et le développement de cancers n'est plus à démontrer (Zong et al., 2016). Des mutations de l'ADNmt ont également été mises en évidence dans le développement et la progression de plusieurs cancers dont le cancer de la prostate (**Figure 36B**). En effet, des altérations du génome mitochondrial sont impliquées dans la prolifération anarchique des cellules, l'indépendance androgénique, l'évitement de l'apoptose. De plus, certaines pourraient être prédicteurs de récurrence biochimique. Ainsi, plusieurs études ont démontré une corrélation étroite entre des mutations chromosomiques, une forte exposition aux ROS, une forte prolifération et la transition d'un cancer de la prostate primaire à un cancer de la prostate agressif présentant un potentiel métastatique (Higuchi et al., 2006; Lindberg et al., 2013; Park et al., 2009; Parr et al., 2006). Une déplétion en ADNmt a également été observée dans les cellules malignes et indépendantes des androgènes de la prostate. Higuchi et ses collaborateurs ont montré par des études sur des cybrides qu'une restauration des mitochondries induisait une dépendance des cellules tumorales aux androgènes (Higuchi et al., 2006). De plus, l'utilisation de levures a permis de mettre en évidence l'implication de mutations de l'ATP synthase dans l'évitement de l'apoptose (Niedzwiecka et al., 2018). Les origines de ces mutations sont multiples et peuvent également être liées à l'âge. Dans leur étude, Smith et ses collaborateurs ont montré un lien entre l'âge et des mutations de l'ADNmt, responsables de déficiences des phosphorylations oxydatives et entraînant le développement du cancer colorectal (Smith et al., 2020). Même si tout événement causant des dommages ou une mutation de l'ADNmt peut entraîner la cancérisation des cellules, compte tenu du nombre de copies de l'ADNmt dans une mitochondrie et du nombre de mitochondries dans une cellule, la tumorigénèse ne se déclenche qu'au-delà d'un certain seuil de mutations (Cook & Higuchi, 2012).

La réponse thérapeutique peut également être influencée par les mutations de l'ADNmt. Le switch métabolique ayant lieu dans les cancers de la prostate acquérant un phénotype malin et présentant un mauvais pronostic implique également des mutations de l'ADNmt (Schöpf et al., 2020). L'exposition de cellules cancéreuses à des agents thérapeutiques comme le cisplatine ou l'adriamycine induirait des mutations de l'ADNmt qui conduiraient à une résistance thérapeutique (Guerra et al., 2012; Singh et al., 1999). Dans leurs études, une équipe de chercheurs a démontré que des cellules p0 étaient insensibles à l'adriamycine, contrairement à des cellules qui exprimaient l'ADNmt. Cette résistance thérapeutique n'était pas due à un changement dans la réponse à la mort cellulaire, ou du cycle cellulaire (Singh et al., 1999).

Quant au cisplatine, un autre agent chimiothérapeutique dont l'accumulation dans la mitochondrie a été démontrée, il induit une augmentation d'adduits dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn, entraînant une altération de la synthèse des ARN mitochondriaux et de l'ADNmt (Garrido et al., 2008; Olivero et al., 1995). De même, une résistance au cisplatine a été mise en évidence dans des lignées cellulaires épithéliales intestinales normales (CEI-6) $\rho 0$, quatre fois supérieure par rapport aux cellules non déplétées en ADNmt (Qian et al., 2005). Ces observations s'appliquent également à la radiothérapie, une autre thérapie conventionnelle contre le cancer.

La radiothérapie, que nous aborderons dans le chapitre III, induit des dommages directs et indirects aux cellules, ce qui a pour résultat des dommages à l'ADN. Ces dommages ont pour conséquence un arrêt temporaire du cycle cellulaire qui permettra la réparation des dommages à l'ADN ou le cas échéant, conduira à la mort mitotique des cellules ou une activation de l'apoptose (Bernstein et al., 2002). Ces processus nécessitant de l'ATP et induisant une perméabilisation de la membrane mitochondriale, impliqueraient directement ou indirectement la mitochondrie. Ainsi, il a été démontré que des fibroblastes humains $\rho 0$ et des cellules de cancer du pancréas $\rho 0$ étaient plus résistants à des irradiations de 5 et 8 Gy par rapport à celles contenant de l'ADNmt sauvage. Les mécanismes mis en place impliqueraient une modification du cycle cellulaire, notamment la phase G2/M et/ou une baisse de l'apoptose, sans toutefois inclure une modification de l'accumulation d'enzymes antioxydantes (Cloos et al., 2009; Tang et al., 1999). L'utilisation de cybrides de cellules de cancers de la prostate a également montré une réponse à un traitement aux statines, variable en fonction des degrés de mutation de l'ADNmt (Sun et al., 2015).

Comme pour la chimiothérapie, les mutations de l'ADNmt influencent les réponses cellulaires à la radiothérapie mais cette dernière peut également induire des mutations de l'ADNmt. Ainsi, des mutations, délétions, ou diminution de l'ADNmt ont été observées chez des patients traités par radiothérapie et chimiothérapie (Jiang et al., 2006; Wardell et al., 2003).

En somme, les mutations de l'ADNmt peuvent impacter les réponses des cellules aux différentes thérapies, même si les mécanismes mis en place ne sont pas totalement connus. Ainsi, les mitochondries sont en train de devenir des indicateurs clés de la biologie du cancer de la prostate (Schöpf et al., 2020; Yu & Yan, 2010). L'implication des mutations ou délétions des génomes nucléaire et mitochondrial dans le développement et la progression des cancers

met en lumière l'importance des systèmes de réparations des deux génomes.

D. Délétions et systèmes de réparation de l'ADNmt

De nombreux agents endogènes et exogènes peuvent altérer la structure et la stabilité de l'ADNmt. Les agents endogènes (ROS, défauts de réplication...) induisent des mésappariements de bases lors de la réplication, des dépurinations, des désaminations de bases, et des dommages oxydatifs dus à la réaction des ROS produits par la chaîne respiratoire sur l'ADNmt. Les instabilités génomiques peuvent également être dues aux agents exogènes comme souvent, des radiations ionisantes, des ultraviolets, des molécules chimiothérapeutiques, des stress environnementaux, mais elles peuvent également avoir pour origine l'alimentation et le style de vie (Tuteja & Tuteja, 2001).

Comme dans le noyau, des systèmes de réparation permettent de reformer un ADNmt stable. Parmi ces voies de réparation, certaines sont communes au noyau et à la mitochondrie. C'est le cas des systèmes de réparation des cassures double-brin (CDB), de réparation par excision de base (BER), et enfin, de réparation des mésappariements (MMR). Par contre, la réparation par excision de nucléotides (NER) n'a été mise en évidence que dans le noyau (Kazak et al., 2012). Alors que ce type de réparation permet de corriger des lésions étendues qui déforment de manière importante l'ADN, comme par exemple des pontages avec des molécules exogènes, le système BER permet le remplacement de bases altérées, la réparation de sites abasiques et la réparation des coupures simple brin (Costa et al., 2003; Krokan & Bjørås, 2013; Wilson & Bohr, 2007). Enfin, le MMR permet la réparation des mauvais appariements (Jun et al., 2006). Ces systèmes de réparation de l'ADN sont essentiels à la maintenance du génome.

En effet, des déficiences des systèmes de réparations, en lien avec les mutations de l'ADNmt et de l'ADNn ont été mises en évidence dans des mécanismes de vieillissement mais également dans le développement de cancers. De plus, des défauts de réplication de l'ADNmt peuvent affecter la stabilité du génome nucléaire, renforçant ainsi le lien entre les deux compartiments (Hämäläinen et al., 2019).

Nous allons décrire dans les paragraphes suivants, ceux mis en jeu dans la mitochondrie en fonction du type de dommage à réparer.

1. Réparation des bases endommagées

Un défaut du BER a été mis en évidence dans des cas de défauts métaboliques, des vieillissements prématurés et des cancers (Mostoslavsky et al., 2006). Le BER a été mis en évidence dans le noyau mais également dans la mitochondrie, même si les mécanismes mis en place dépendent entièrement de gènes codés par le compartiment nucléaire (Prakash & Doublié, 2015). Bien que les mécanismes de réparation soient similaires, les acteurs mis en jeu dans la mitochondrie diffèrent de ceux du noyau.

Ainsi, dans la mitochondrie, le mécanisme s'initie par une reconnaissance de la base endommagée, qui est par la suite excisée par une ADN glycosylase en clivant la liaison N-glycosidique entre la base et son désoxyribose. Cette enzyme est spécifique à chaque dommage. En résulte de son activité, un site abasique, qui est ensuite supprimé par clivage du squelette phosphodiester. Les extrémités libérées sont modifiées et le vide est comblé par l'ajout de nucléotide(s) manquant(s) par la polymérase. Le(s) nucléotide(s) sont enfin liés par la ligase 3. Selon les dommages et les enzymes impliquées, deux voies de BER sont possibles (**Figure 37**) : une voie courte (« short patch » ou SP-BER) et une voie longue (« long patch » ou LP-BER).

Durant le SP-BER, seul un nouveau nucléotide est incorporé à la place d'une base endommagée. Cette voie est la première à avoir été mise en évidence dans la mitochondrie, contrairement à la voie LP-BER, découverte plus tardivement (Akbari et al., 2008) et durant laquelle deux à six nucléotides sont incorporés.

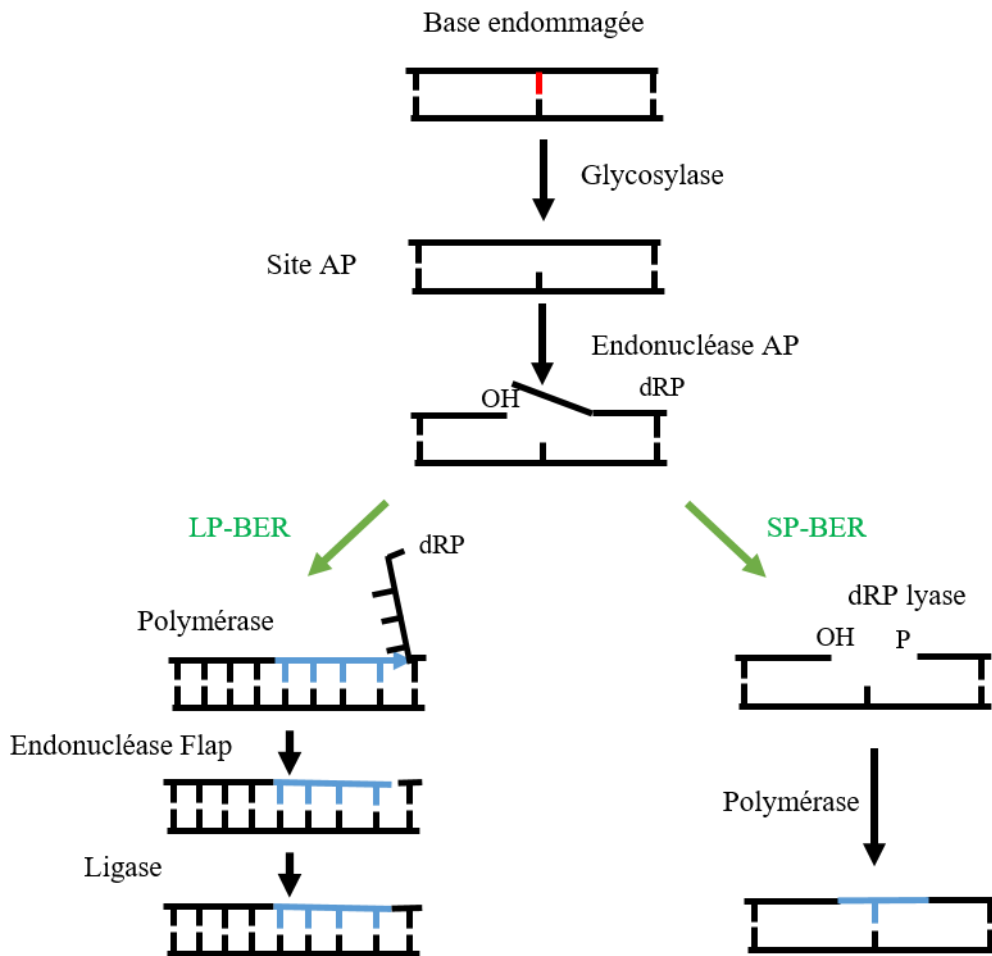


Figure 37: Réparation des dommages à l'ADN par BER (Base Excision Repair).

2. Réparations de cassures simple brin (SSBR)

Les CSB sont les lésions de l'ADN les plus communes. Elles résultent de dommages dus aux ROS mais aussi de l'étape de clivage du squelette d'ADN au niveau du site abasique lors du BER. Un défaut de ces réparations entraîne un blocage de de la fourche de réplication ainsi que de la transcription, pouvant évoluer en une cassure double brin (CDB) très délétère pour la cellule. Le mécanisme est similaire au BER dans le sens où il est initié par une détection de la cassure, suivie d'une modification permettant l'action de la polymérase, la synthèse d'ADN et enfin, une ligation.

3. Réparations de cassures double-brin

Les cassures double brin sont des lésions délétères pour la cellule et leur réparation, même lorsqu'elle est non fidèle, est essentielle pour la survie cellulaire. Deux voies majeures sont impliquées dans la réparation des CDB : la recombinaison homologue (HR) ou la recombinaison des extrémités non homologues (NHEJ). Ces deux voies de réparation ont été mises en évidence dans la mitochondrie ou dans les chloroplastes sans pour autant faire consensus au sein de la communauté scientifique (Chesner et al., 2021; Dahal et al., 2018; García-Medel et al., 2019; Lakshmipathy & Campbell, 1999; Thyagarajan et al., 1996). Un déficit en HR dans la mitochondrie a été mis en évidence dans des maladies génétiques associées à des mutations de l'ADNmt (ophtalmoplégie progressive externe) (Zeviani et al., 1990).

Cependant, dans la mitochondrie, ces systèmes de réparation sont moins documentés que le BER ou le SSBR ; ils sont par contre bien connus dans le noyau. Toutefois, des molécules impliquées dans les réparations de CSB dans le noyau ont été retrouvées dans la mitochondrie, sans aboutir à un consensus, les mécanismes de réparation des CDB dans la mitochondrie étant controversés. Des comparaisons faites entre les deux compartiments, permettent d'émettre des hypothèses sur ce qui se passe dans la mitochondrie.

Ainsi, dans le noyau, la réparation des CDB par HR et NHEJ dépend fortement de l'organisme ou du type cellulaire concerné ou encore de l'étape du cycle cellulaire. NHEJ réparerait la plupart des CDB chez les mammifères (Kakaroukas & Jeggo, 2014). Les deux mécanismes sont initiés par la signalisation de la cassure qui se fait par la phosphorylation de l'histone H2AX autour de la cassure. Cette phosphorylation est assurée par des protéines de la voie PI3K, notamment ATM et ATR et aide au recrutement des protéines de réparation (Kuo & Yang, 2008). La forme phosphorylée de H2AX, appelée γ H2AX peut être observée au microscope en se servant d'anticorps spécifiques. Les CDB apparaissent sous forme de foci et l'analyse des cinétiques de réparation des CDB a montré une augmentation de l'accumulation de γ H2AX deux heures après irradiation de 4 Gy en utilisant une source de ^{137}Cs (Sharma et al., 2015).

4. Réparation des mésappariements

La voie de réparation MMR est quant à elle impliquée dans les mésappariements de bases et les petites boucles d'insertion ou de délétion d'un à quatre nucléotides. Cette voie a été mise en évidence dans la mitochondrie par des analyses *in vitro* dans lesquelles des extraits mitochondriaux humains ont été utilisés (de Souza-Pinto et al., 2009; Mason et al., 2003). Les acteurs qui ont été mis en évidence ne sont cependant pas les mêmes que ceux impliqués dans les voies MMR survenant dans le noyau.

E. Systèmes de réparation et cancer

L'implication des systèmes de réparation des dommages à l'ADN varie en fonction des cibles (oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur par exemple), de l'état de la cellule et de l'étape de développement de la pathologie. Ainsi, leur déficience peut mener au développement de pathologies mais leur forte activité peut également les promouvoir voire permettre la résistance aux thérapies.

Plusieurs pathologies comme les neurodégénérescences, l'infertilité, les déficits immunitaires ou les cancers, ont en commun l'incapacité des cellules à réparer avec précision les dommages à l'ADN (Jackson & Bartek, 2009; Yap et al., 2011). Comme évoqué précédemment, des mutations de gènes tels que BRCA1, BRCA2, P53, PTEN, favorisent le développement de cancers, faisant de l'instabilité génomique, une caractéristique reconnue des cancers (Hanahan & Weinberg, 2011). Ainsi, des déficiences de HR ont été mises en évidence dans des cancers du sein ou des ovaires (Cruz et al., 2018; da Cunha Colombo Bonadio et al., 2018).

Le cas de l'Olaparib, un inhibiteur de la voie de réparation par BER montre également l'implication des systèmes de réparation dans la tumorigénèse et la progression des cancers du sein, des ovaires et de la prostate. En effet, en inhibant la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), une enzyme centrale de la voie de réparation par BER, cet agent thérapeutique induit une accumulation de CSB. Cette accumulation de CSB a pour résultat la formation de CDB, plus délétères pour la cellule (Bochum et al., 2018; de Bono et al., 2020). De même, l'utilisation de Génistéine et de AG1024, deux agents thérapeutiques qui induisent l'apoptose mais également l'arrêt du cycle cellulaire en phase S et G2/M respectivement, dans des cellules PC3 et DU145 a permis la radiosensibilisation de ces cellules. Ceci, en passant également par

l'inactivation de HR et de NHEJ (Tang et al., 2018). L'implication de ces deux voies de réparation a également été démontrée dans les phénomènes de radiorésistance de cellules de tumeurs prostatiques (Chang et al., 2019; Maranto et al., 2018).

Les mécanismes mis en place dans les phénomènes de résistance à la radiothérapie. Dans le cas des gliomes par exemple, une augmentation des voies de réparation de l'ADN pourrait expliquer leur forte résistance à la radiothérapie (Bao et al., 2006). Ainsi, l'inhibition des mécanismes des voies de réparation de l'ADN pourrait être une voie de potentialisation de la radiothérapie, en plus de leur capacité à induire l'apoptose dépendant de p53. Ainsi, le ciblage des voies de réparation des dommages à l'ADN est une piste thérapeutique et sensibilisatrice des cellules tumorales, face à l'échec de la radiothérapie ou de la chimiothérapie.

De manière simplifiée, la tumorigénèse et plus particulièrement le développement du cancer de la prostate mais aussi sa progression vers un état plus agressif implique une interconnexion entre les voies de prolifération, de mort cellulaire (avec une place centrale de l'apoptose), des mutations des génomes nucléaire et mitochondrial, des voies de réparation des dommages à l'ADN, des modifications du métabolisme. Les différents points abordés dans les précédents paragraphes sont en lien avec la mitochondrie, montrant ainsi le rôle central de cet organelle dans le développement et la progression du cancer de la prostate.

Chapitre III : Les voies thérapeutiques du cancer de la prostate

I. Les types de prise en charge et de traitements du cancer de la prostate

Les différentes thérapies varient selon les caractéristiques et la progression du cancer de la prostate : selon qu'il est localisé ou localement avancé, son type histologique, son grade et son étendue, s'il est métastatique, qu'il y a rechute après un traitement curatif, s'il est sensible à la castration ou encore métastatique résistant à la castration (**Tableau 5**). La classification TNM et la classification de D'Amico pour l'évaluation des risques de rechute permettent d'émettre un diagnostic et par conséquent, d'orienter le choix du traitement ; la prise en charge prenant en compte l'état général du patient.

En effet, un bilan pré-thérapeutique est réalisé afin d'évaluer la fonction urinaire et sexuelle du patient et ces informations, en plus des caractéristiques de la prostate (volume), l'âge, les antécédents médicaux et chirurgicaux sont pris en compte.

Plusieurs stratégies, seules ou en association, vont être adaptées selon le statut tumoral du patient avec pour but de :

- Surveiller l'évolution de la maladie pour retarder la mise en route d'un traitement quand cela est possible
- Ralentir la progression ou la dissémination de la tumeur
- Réduire ou supprimer la tumeur
- Réduire ou supprimer les métastases
- Réduire le risque de récurrence

Le cancer de la prostate ayant un impact sur la qualité de vie des personnes atteintes, ces différentes approches ont également pour but de traiter les symptômes engendrés par la maladie afin d'assurer une meilleure qualité de vie possible. Des soins et soutiens complémentaires peuvent également être proposés afin de gérer les conséquences de la pathologie et de ses traitements. Ces différents traitements sont mis en place en accord avec le patient.

Tableau 5: Les différents traitements du cancer de la prostate en fonction de son étendue au moment du diagnostic.

Etendue de la maladie au moment du diagnostic	Principales possibilités en première intention
Cancers localisés <i>à faible risque</i>	<i>Choix entre plusieurs modalités</i> Surveillance ou prostatectomie totale +/- curage ganglionnaire ou curiethérapie ou radiothérapie externe
<i>à risque intermédiaire</i>	<i>Choix entre plusieurs modalités</i> Prostatectomie totale + curage ganglionnaire ou radiothérapie externe +/- hormonothérapie (jusqu'à 6 mois) dans certains cas, curiethérapie
<i>à haut risque</i>	<i>Choix entre plusieurs modalités</i> Prostatectomie totale + curage ganglionnaire ou radiothérapie externe +/- précédée d'un curage ganglionnaire + hormonothérapie prolongée (jusqu'à 3 ans)
Cancers localement avancés	Radiothérapie externe +/- précédée d'un curage ganglionnaire + hormonothérapie prolongée (jusqu'à 3 ans)
Cancers métastatiques	Hormonothérapie +/- chimiothérapie

A. Le traitement différé

Dans la plupart des cas, le cancer de la prostate évolue lentement et entraîne peu ou pas de manifestations pendant plusieurs années. Dans certains cas, une période de latence supérieure à 15 ans peut être observée. Les cancers de bas grade qui évoluent dans les 10 ans suivant le diagnostic représentent 5 à 10 % des cancers de la prostate diagnostiqués (Albertsen, 2015). Etant donné l'âge des patients et l'évolution lente que peut avoir la pathologie, il est maintenant recommandé de différer le traitement, évitant ainsi un sur-traitement ainsi que les effets indésirables qui y sont liés.

Lorsque la tumeur est localisée et ne provoque pas de symptômes, une stratégie de surveillance active est proposée la plupart du temps, et ce, uniquement pour les patients ayant une espérance de vie supérieure à 10 ans et qui pourraient bénéficier d'un traitement curatif en cas d'évolution de la pathologie. Cette surveillance repose sur des examens réguliers qui se basent principalement sur :

- un toucher rectal dans le but de détecter toute évolution
- des dosages répétés de PSA afin de suivre son évolution dans le temps et son temps de doublement
- des biopsies prostatiques, IRM si besoin

Dans certains cas, une attente sous surveillance (*watchful waiting*) est plutôt proposée. En effet, celle-ci est proposée lorsque l'âge et/ou l'état de santé du patient (espérance de vie inférieure à 10 ans, comorbidités) ne permettent pas la mise en place d'un traitement, et ce, quel que soit l'avancement de la pathologie. Un traitement palliatif, généralement basé sur de l'hormonothérapie, est cependant proposé afin de traiter les symptômes lorsque ceux-ci apparaissent. Dans ces cas, l'hormonothérapie peut être associée à d'autres traitements dits symptomatiques, selon les besoins et les symptômes ressentis (exemple de la radiothérapie en cas de douleurs osseuses).

Lorsque le patient ayant une tumeur localisée choisit un traitement immédiat, la prostatectomie totale ou la radiothérapie sont deux options proposées. Une curiethérapie peut également être proposée.

B. Traitement local et loco-régional

Dans environ 80% des cas, le cancer de la prostate est localisée (Siegel et al., 2016). Dans ces cas, le choix du traitement se fait en fonction des risques de progression du cancer et de l'espérance de vie du patient. Ainsi, d'après l'EAU, la prostatectomie doit être proposée aux patients de faible à haut risque de progression dont l'espérance de vie est supérieure à 10 ans. La radiothérapie quant à elle est plutôt proposée dans les cas de cancers localisés à faible risque et devrait être combinée à l'hormonothérapie pour les formes intermédiaires ou à haut risque de progression mais aussi dans les cas de cancers localement avancés.

1. Prostatectomie totale

La prostatectomie totale est également nommée « prostatectomie radicale ». Elle correspond à l'ablation chirurgicale de la totalité de la prostate, ainsi que des vésicules séminales (**Figure 38**). La prostatectomie est l'un des traitements de référence des cancers localisés de la prostate. Dans les cas de cancers localisés à faible risque, en plus de la prostatectomie, le patient subit également un curage ganglionnaire qui consiste à enlever les ganglions lymphatiques voisins. Ce curage est systématique pour les cancers à risque intermédiaire et à haut risque de récurrence.

L'anatomopathologiste analyse par la suite l'ensemble de ce qui a été retiré lors de l'opération afin de déterminer le grade et le degré d'agressivité du cancer, permettant ainsi de mettre en place des traitements complémentaires si besoin (telles qu'une hormonothérapie ou une radiothérapie externe). Un dosage de PSA est également effectué peu de temps après l'intervention chirurgicale. Comme tout acte chirurgical, la prostatectomie entraîne des effets indésirables (douleurs, hématomes, phlébite) mais aussi des effets liés à la chirurgie de la prostate comme une impossibilité définitive d'éjaculer, ou des troubles de l'érection, assez fréquents. A ce propos, pour les patients à faible risque de pathologie extra-prostatique la préservation nerveuse est souvent proposée afin de conserver leurs fonctions érectiles.

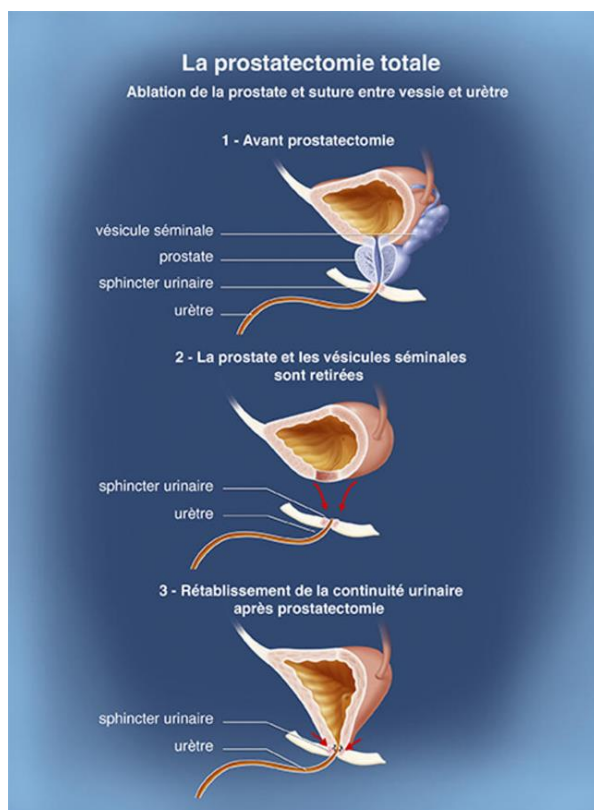


Figure 38: La prostatectomie totale.

D'après <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-de-la-prostate/Chirurgie-la-prostatectomie-totale/Deroulement-de-l-intervention>.

2. Radiothérapie

La radiothérapie correspond à un traitement loco-régional des cancers. Elle utilise des rayonnements ionisants, c'est-à-dire, des faisceaux de particules qui transportent une énergie et qui en traversant la matière, peuvent la modifier. Dans la majorité des cas, ce sont des photons qui sont utilisés, mais des éléments radioactifs, émettant spontanément ou en continu des rayonnements ionisants, ou encore des ions légers, peuvent également être utilisés : on parle alors respectivement de curiethérapie ou de hadronthérapie. Le but est de cibler les tissus cancéreux grâce à un repérage radiographique, en évitant si possible les tissus sains. Les effets de la radiothérapie seront discutés dans les paragraphes suivants.

a. Radiothérapie externe

La radiothérapie externe est l'un des traitements de référence pour les cancers localisés ou localement avancés. Pour les cancers localisés à risque intermédiaire, cette thérapie est souvent associée à une hormonothérapie courte (maximum 6 mois) ; elle est précédée d'un curage ganglionnaire et associée à une hormonothérapie longue (jusqu'à 3 ans) dans les cas de cancers localisés à haut risque ou localement avancés. L'hormonothérapie sera abordée dans les prochains paragraphes. La radiothérapie externe est parfois également utilisée pour le traitement des métastases osseuses.

Pour les cancers de la prostate, une radiothérapie conformationnelle en 3D est effectuée en s'appuyant sur des images 3D acquises par scanner (et IRM), afin de faire correspondre précisément le volume de la prostate sur lequel sont ciblés les rayons au volume de la tumeur. Dans certaines conditions, une technique d'irradiation avec intensité modulée du faisceau est utilisée : on parle alors de radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI), technique de choix pour la radiothérapie externe. La dose conventionnelle est de 65 à 70 Gy, mais cette technique grâce à la modulation de l'intensité permet une escalade de 74 à 80 Gy, permettant ainsi une augmentation de la survie sans récurrence biochimique à 5 ans.

Une autre technique de radiothérapie, l'hadronthérapie, est également utilisée comme traitement du cancer de la prostate. Cette technique diffère de la radiothérapie dite « conventionnelle » qui utilise des photons (rayons X), par l'utilisation de hadrons, regroupant notamment les protons (protonthérapie) et les ions carbonés (carbonethérapie). À l'inverse des photons, les protons sont des particules chargées, assez lourdes et qui ont donc des propriétés

physiques différentes de celles des photons : en effet, il est possible de moduler l'énergie des faisceaux de protons afin qu'ils déposent l'essentiel de leur énergie (Pic de Bragg) au niveau de la cible (**Figure 39**) (Wisnbaugh et al., 2014).

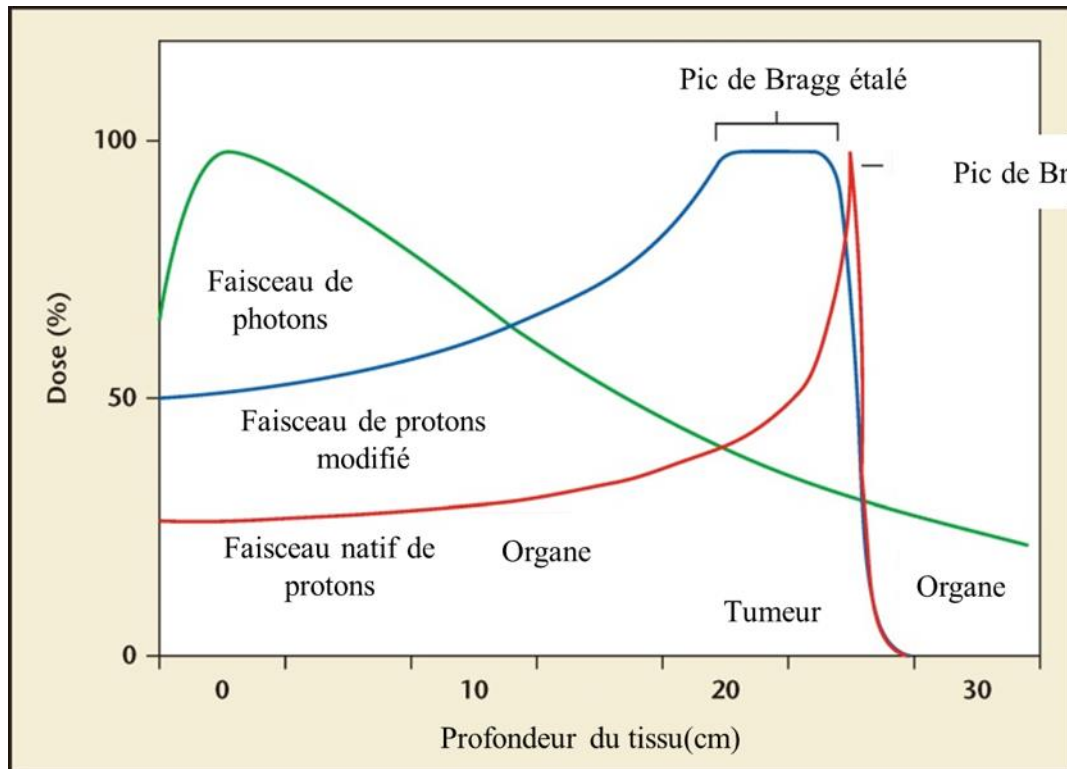


Figure 39 : Courbes de distribution de dose des faisceaux de photons et de protons en fonction de la profondeur du tissu.

Modifié d'après Wisnbaugh et al., 2014.

La protonthérapie montre d'intéressants effets sur le long terme chez des patients à haut risque ou à risque intermédiaire mais l'âge du patient est à prendre en compte quant à sa toxicité (Takagi et al., 2017). Une autre étude chez des patients à faible risque ou à risque intermédiaire, a montré une efficacité sur cinq ans d'un ultrahypofractionnement des doses (36,25Gy en 5 fractions) (Kubeš et al., 2021). D'un autre côté, d'autres études montrent une meilleure réponse de patients présentant un haut risque, ainsi que de faibles effets secondaires, suite à une radiothérapie utilisant des ions carbone (Ishikawa et al., 2012; Nomiya et al., 2016). En somme, l'efficacité de la protonthérapie et de la carbonothérapie sur le cancer de la prostate a été démontrée dans de nombreuses études cliniques et même si elles sembleraient limiter la

progression biochimique de la pathologie sur du long terme, leur supériorité par rapport à la radiothérapie conventionnelle n'est pas totalement démontrée. De plus, la protonthérapie serait plus coûteuse que la radiothérapie conventionnelle (Bryant & Hoppe, 2021; Konski et al., 2007; Olsen et al., 2007; Schroeck et al., 2017; Slater et al., 2004).

La radiothérapie n'est pas sans effets indésirables. En effet, les principaux effets secondaires peuvent être immédiats (troubles urinaires, inflammation du rectum et de l'anus, troubles intestinaux, réactions cutanées) ou tardifs (douleurs, rectites, incontinence urinaire, troubles de l'érection). Cette thérapie présente toutefois un risque très faible (estimé à moins de 1%), mais statistiquement supérieur à celui d'une personne non traitée pour un premier cancer, de développer un cancer du rectum ou de la vessie.

b. Curiethérapie

La curiethérapie est peu utilisée en France, contrairement aux États-Unis et plutôt destinées aux patients présentant un faible risque. C'est une technique de radiothérapie interne qui consiste à placer des éléments radioactifs à l'intérieur de la prostate. La dose de rayonnement décroît au fur et à mesure qu'on s'éloigne des éléments radioactifs, permettant ainsi de limiter les effets indésirables sur les tissus sains avoisinants (vessie, rectum, canal anal). Deux formes de curiethérapie existent :

- Des implants de grains d'iode 125 qui restent de manière permanente dans la prostate
- Une technique à haut débit de dose utilisant des implants temporaires d'iridium 192 ; l'élément radioactif est ôté de la prostate, une fois l'irradiation réalisée.

Dans certains cas spécifiques, la curiethérapie peut être associée à une radiothérapie externe. Les effets indésirables existent et dépendent du type d'implant, du volume de la région traitée, de la dose totale reçue et de la dose d'irradiation ayant pu atteindre les organes voisins. Cela peut être des hématomes, une hématurie, une irritation rectale, une phlébite, souvent immédiatement après l'intervention, ou des troubles urinaires, troubles de l'érection, du sang dans le sperme, survenant plus tard après l'intervention.

c. HIFU

L'HIFU (*High Intensity Focused Ultrasound*) ou traitement par ultrasons focalisés de haute intensité est une nouvelle modalité de traitement réservée aux patients de plus de 70 ans et ayant une espérance de vie supérieure à 7 ans. Elle peut également être proposée suite à l'échec de la radiothérapie. Cette thérapie, décrite pour la première fois dans les années 1944 (Lynn & Putnam, 1944), consiste à provoquer par des tirs focalisés d'ultrasons de 5 secondes, une élévation brutale de la température des tissus à 65°C grâce à une sonde endorectale. Le but est d'entraîner la nécrose du tissu. La sonde est recouverte d'un ballonnet contenant un liquide réfrigéré qui permet de maintenir la paroi du rectum à une température constante pendant toute la durée du traitement. Le nombre de tirs est défini en fonction du volume à traiter : environ trois cents à quatre cents tirs sont nécessaires pour traiter la prostate dans sa totalité (Murat et al., 2007).

Comme les précédentes, cette thérapie présente également des effets secondaires à long terme : des troubles de l'érection, un rétrécissement de l'urètre et du col vésical, une incontinence urinaire.

d. Cryothérapie

A l'inverse du traitement précédent, la cryothérapie, également appelée cryochirurgie, consiste à congeler la tumeur à -40°C grâce à une sonde afin de la détruire. Sous l'effet du froid, les cellules se gonflent et éclatent ; de plus, le sang contenu dans les vaisseaux sanguins de la tumeur se coagule, privant la tumeur et entraînant sa nécrose. L'intervention est réalisée sous anesthésie générale. Le chirurgien s'aide d'une échographie, d'un scanner, ou d'une IRM pour introduire la cryosonde par une petite incision au niveau du périnée et réaliser l'intervention.

Ce type de traitement est proposé à des patients à faible risque, avec un score de Gleason inférieur ou égal à 7 et un taux du PSA inférieur à 20 ng/mL, qui présentent une glande de taille inférieure à 40 mL et pour lesquels la radiothérapie ou la curiethérapie n'a pas fonctionné (Barat et al., 2019; Mercader et al., 2020). Les principaux effets secondaires sont des troubles de l'érection.

C. Traitements systémiques

L'hormonothérapie et la chimiothérapie sont des traitements généraux ou traitements systémiques. L'hormonothérapie, parfois, associée à une radiothérapie externe, est le traitement de référence des cancers de la prostate localement avancés et métastatiques et l'un des traitements possibles pour les formes localisées à haut risque. La chimiothérapie est quant à elle indiquée pour traiter certains cancers métastatiques et elle peut, dans certains cas, être associée à l'hormonothérapie. Environ 5% des patients nouvellement diagnostiqués avec un cancer de la prostate présentent des métastases. La médiane de leur survie est d'au moins 42 mois (à considérer avec modération, cette population étant très hétérogène) (James et al., 2015). Chez ces patients, l'hormonothérapie est donc palliative.

1. Hormonothérapie

Le cancer de la prostate est un cancer hormonosensible : son développement est stimulé par les androgènes et plus particulièrement, la testostérone. L'hormonothérapie vise à inhiber l'action stimulante de ces hormones afin de stopper le développement du cancer. Les effets positifs d'un traitement du cancer de la prostate métastatique par privation d'androgènes ont été démontrés (Huggins & Hodges, 1972). L'hormonothérapie peut être chirurgicale (définitive) ou médicamenteuse. Initialement, la privation androgénique était réalisée par la castration physique du patient. Cette castration ou orchidectomie consistait effectivement à réaliser l'ablation des testicules du patient. Cette technique est aujourd'hui plus rarement utilisée. Une autre technique, la pulpectomie qui est une approche semi-conservative qui consiste à éliminer l'entièreté du testicule mais en conservant l'albuginée.

Outre les effets secondaires qu'elle entraîne, l'ablation conduit certes à une diminution de la testostéronémie mais a un fort impact psychologique sur le patient. C'est pourquoi depuis sa découverte dans les années 1970, l'hormonothérapie médicamenteuse ou chimique est plus souvent utilisée. Elle consiste à administrer par voie orale, sous-cutanée ou intramusculaire, des analogues ou des antagonistes de la LHRH afin de bloquer la production de la testostérone par les testicules et d'obtenir une testostéronémie inférieure à 0,5 ng/mL considéré comme seuil de castration (Nishiyama, 2014).

a. Agonistes et antagonistes de la LHRH

La LHRH ou Hormone de libération de la lutéinostimuline ou encore hormone de libération de la gonadotrophine (GnRH), sécrétée par l'hypothalamus, contrôle la production des hormones sexuelles mâles et femelles. Elle stimule l'hypophyse pour produire l'hormone lutéinisante (LH) qui chez les hommes stimule les cellules de Leydig situées au niveau des testicules pour la production de la testostérone et chez les femmes, stimule les ovaires pour la production des œstrogènes et la progestérone.

Il existe plusieurs molécules agonistes de la LHRH : la **goséréline** (Zoladex®), la **leuproréline** (Eligard®, Enantone®, Gonapeptyl®, Leptoprol®), la **buséréline**, l'**histréline** et la **triptoréline** (Decapeptyl®). Ces composés ont une longue période d'action (le seuil de castration est atteint au bout de 2 à 4 semaines) (Klotz et al., 2008). Leur mode d'action passe dans un premier temps par une augmentation de la sécrétion de LH et de FSH, induisant par conséquent une augmentation de la production de testostérone. On parle d'effet « *flare-up* » (explosion). Celui-ci survient dans les 2 à 3 jours après le début du traitement et dure environ une semaine. Une utilisation concomitante d'anti-androgènes, au début du traitement, permet de contrecarrer cette augmentation transitoire de la production d'androgènes. Les anti-androgènes plus courants sont le **flutamide**, le **bicalutamide**, le **nilutamide**, l'**acétate de cyprotérone**. Dans un second temps, les agonistes induisent la désensibilisation et la diminution de l'expression du récepteur de la LHRH et par conséquent une forte diminution de la production de testostérone (Anderson, 2003; « Antiandrogens », 2012).

Contrairement aux agonistes de la LHRH, les antagonistes inhibent la production de LH/FSH en se liant aux récepteurs de la LHRH, ce qui a pour conséquence d'inhiber la synthèse de testostérone, aboutissant finalement à un effondrement de la testostéronémie aussi rapide que lors d'une castration chirurgicale. Ces molécules ont l'avantage de ne pas présenter d'effet « *flare-up* ». Le dégarélix (Firmagon®) en est un exemple.

b. Anti-androgènes

L'utilisation des anti-androgènes a pour objectif de bloquer le récepteur aux androgènes et/ou d'inhiber son action pour ce qui est de ce qu'on appelle les anti-androgènes de première génération. Il existe des anti-androgènes stéroïdiens comme l'acétate de cyprotérone (Androcur®) ou des anti-androgènes non stéroïdiens comme par exemple, le bicalutamide

(Casodex®), le flutamide, le nilutamide (Anandron®). La monothérapie anti-androgénique n'est cependant pas souhaitable pour les patients métastatiques pour lesquels un blocage androgénique complet (CAB) (consistant à supprimer les androgènes et inhiber leur action sur le récepteur), est recommandé. L'utilisation des anti-androgènes retarde la progression du cancer chez les patients métastatiques asymptomatiques et permet de réduire la douleur et le risque de séquelles dues à la progression de la pathologie chez les patients symptomatiques.

L'hormonothérapie a de nombreux effets secondaires, notamment liées à la déplétion en testostérone. Ces effets indésirables sont communs aux différents types d'hormonothérapie mais il existe également des effets indésirables spécifiques à chaque médicament :

- Bouffées de chaleur
- Dysfonction érectile
- Baisse de libido
- Prise de poids
- Ostéoporose (diminution de la masse osseuse), pouvant être encore plus marquée que chez les femmes ménopausées.
- Gynécomastie (gonflement et sensibilité de la poitrine)
- Irritabilité, dépression
- Troubles cognitifs
- Cardiopathie et/ou maladie dégénérative neurologique (induction d'un syndrome métabolique). Le syndrome métabolique repose sur une résistance à l'insuline (augmentant par ailleurs le risque de diabète) et l'association de facteurs de risque cardiovasculaire ; on parle de syndrome métabolique lorsqu'au moins trois de ces anomalies sont présentes :
 - Un tour de taille élevé (supérieur à 102 cm)
 - Une hyperglycémie (glycémie supérieure à 5.6 mmol/L)
 - Une hypertriglycéridémie (un excès de triglycérides dans le sang ; supérieur à 1.7 mmol/L)
 - Une pression artérielle élevée (supérieure à 130/80 mmHg)
 - Un taux bas de bon cholestérol (concentration de HDL inférieur à 1 mmol/L)

L'hormonothérapie chimique peut être prescrite de façon continue ou de façon

intermittente. En effet, dans un premier temps, la privation androgénique va induire la mort des cellules tumorales prostatiques mais dans un second temps, en dépit de la privation androgénique, le patient subit une rechute conduisant à la progression de la pathologie vers un cancer résistant à la castration (CRPC : *Castrate-Resistant Prostate Cancer*). En effet, une perte de l'hormonosensibilité des cellules tumorales prostatiques, se développe, entraînant une sélection de clones tumoraux résistants aux androgènes et rendant ainsi la privation androgénique inefficace sur la progression de la pathologie. La mise en place d'une hormonothérapie intermittente pourrait limiter la mise en place du CRPC, mais également être bénéfique pour la qualité de vie du patient, en améliorant sa tolérance au traitement, en favorisant la préservation du capital osseux et en ayant un effet protecteur sur l'apparition du syndrome pseudo-métabolique. Actuellement, elle n'est qu'une option pour des patients métastatiques asymptomatiques dont le taux de PSA à 6 mois est inférieur à 4 ng/mL, volontaires et informés des incertitudes étant donné qu'il n'existe pas encore de données scientifiques et médicales allant dans le sens du bénéfice d'une hormonothérapie intermittente par rapport à une hormonothérapie continue (Hussain et al., 2013).

Compte tenu de la résistance à la castration avec les anti-androgènes de première génération, de nouvelles molécules ont été développées ces dernières années.

c. Anti androgènes de seconde génération

La mortalité liée au cancer de la prostate est due à une progression vers l'agressivité de la pathologie. Comme mentionné auparavant, l'hormonothérapie se confronte à des problèmes concernant la mise en place du CRPC, faisant des cancers avancés et métastatiques un nouveau challenge. Dans les cellules tumorales résistant à la castration, AR est toujours actif, ce qui a permis le développement de ces anti-androgènes dits de deuxième génération. L'acétate d'abiratéron (Zytiga®), en est un exemple. Il s'agit d'un inhibiteur stéroïdien dont l'action induit un blocage sélectif de la biosynthèse des androgènes par les testicules mais aussi par les glandes surrénales et les tissus tumoraux prostatiques (Attard et al., 2009). Son action étant irréversible et spécifique, il n'entraîne par conséquent pas d'insuffisance surrénalienne et n'altère pas la voie des glucocorticoïdes. Il est recommandé dans des cas de cancers de la prostate hormono-sensibles à haut risque nouvellement diagnostiqué en association avec un traitement par suppression androgénique ou dans des cas de cancers résistants à la castration, asymptomatiques ou peu symptomatiques et pour lesquels la chimiothérapie n'est pas encore

cliniquement indiquée. L'étude LATITUDE a montré que l'ajout de l'abiratérone à une hormonothérapie conventionnelle améliorait la survie globale et la survie sans progression de la maladie avec un décalage dans le temps de complications osseuses chez des patients métastatiques (Fizazi et al., 2017). Une autre molécule, l'enzulatamide (Xtandi®), est quant à elle un puissant inhibiteur non stéroïdien compétitif de la voie de signalisation des récepteurs aux androgènes. L'enzulatamide bloque la translocation nucléaire des récepteurs activés, empêchant ainsi leur fixation à l'ADN dans les cellules cancéreuses résistantes aux anti-androgènes ou encore en cas de surexpression des récepteurs aux androgènes (Tran et al., 2009). Il est recommandé dans des cas de cancers de la prostate métastatiques résistant à la castration, asymptomatiques ou peu asymptomatiques après un échec d'un traitement par suppression androgénique et pour lesquels la chimiothérapie n'est pas encore indiquée. Enfin, l'aplatumide (Erleada®), est un inhibiteur sélectif de AR, recommandé dans des cas de cancers de la prostate résistant à la castration non métastatiques (nmCRPC) et présentant un risque élevé de développer un cancer métastatique. Ces composés sont classiquement utilisés en monothérapie pour le mCRPC ou en combinaison avec l'hormonothérapie classique. Dans ce contexte, l'essai STAMPEDE, s'intéresse à la combinaison enzalutamide/abiraterone (Attard et al., 2014). Ces molécules ont tout de même quelques effets secondaires tels que la diarrhée, l'hypertension artérielle, des perturbations du bilan hépatique.

2. Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique, permettant d'atteindre les cellules cancéreuses quelle que soit leur localisation. Son action est dirigée sur les mécanismes de division cellulaire au sens large : en effet, en ciblant les systèmes de réparation, elle induit l'accumulation de dommages délétères pour la cellule. Elle est indiquée pour traiter certains cancers métastatiques et peut être parfois associée à de l'hormonothérapie. Il existe plusieurs molécules utilisées en chimiothérapie pour traiter le cancer de la prostate. Elles peuvent être utilisées successivement.

Celle utilisée en première ligne est le docetaxel, un diterpène dont l'effet passe par une stabilisation des microtubules et une inhibition de leur dépolymérisation, entraînant une désorganisation de leur réseau intercellulaire essentiel entre autre à la mitose. Le docetaxel peut être administré en association avec un corticoïde (prednisone) ou en association avec de l'hormonothérapie. Dans ce dernier cas, il a été démontré une augmentation du bénéfice sur la

survie à 4 ans dans des cas de cancers de la prostate métastatique hormono-naïf (James et al., 2016; Sweeney et al., 2015; Vale et al., 2016).

Dans les lignes ultérieures de chimiothérapie, pour les cancers résistant au docetaxel, est utilisé du cabazitaxel (Jevtana®), dont l'effet sur les microtubules est similaire, associé à un corticoïde (prednisone).

Ce sont des traitements assez lourds qui comportent d'énormes effets secondaires comme :

- La baisse des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes
- Des troubles cutanés
- Des nausées, vomissements
- Des troubles digestifs : diarrhées, constipation
- Des lésions de la bouche
- Une chute des cheveux et du système pileux
- Des affections oculaires
- Des troubles cardiaques
- Sans oublier les effets secondaires des corticoïdes (fonte musculaire, gonflement du visage, dépression, insomnies, apparition ou aggravation du diabète).

D. Traitements ciblant l'os

L'os est le site de métastase préférentiel du cancer de la prostate (Bubendorf et al., 2000). Environ 30 % des patients atteints d'un cancer de la prostate vont présenter des métastases osseuses ; 10 % le présentent au moment du diagnostic (Coleman, 2006). L'os n'est pas un tissu figé. En effet, il est constamment détruit par des ostéoclastes et reconstruit par des ostéoblastes, des cellules spécialisées, avec un équilibre maintenu entre ces cellules, assurant la solidité de l'os. Les métastases du cancer de la prostate dans les os forment des lésions ostéolytiques, entraînant la destruction de l'os et provoquant des douleurs, des fractures, ou encore une compression de la moelle épinière (Weinfurt et al., 2005). Ces métastases sont incurables et sont une des causes de la mortalité liée au cancer de la prostate (**Figure 40**). Des traitements sont donc mis en place concomitamment avec de l'hormonothérapie ou de la chimiothérapie, afin de prévenir ou de ralentir la destruction de l'os ou encore de corriger le

taux anormalement élevé de calcium dans le sang. Trois classes de molécules sont employées à cette fin :

Les bisphosphonates : dont l'acide zolédronique (Zometa®) ralentissent l'action des ostéoclastes et limitent la résorption osseuse, retardant ainsi la survenue des lésions osseuses de 36 % (Saad et al., 2004).

L'anticorps anti-RANKL : il s'agit d'un anticorps monoclonal, le Denosumab (Xgeva®), qui en liant RANKL (un ligand intervenant dans le métabolisme osseux), empêche sa liaison à son récepteur RANK présent à la surface des ostéoclastes, et perturbe ainsi la formation, la fonction et la survie des ostéoclastes. Cela permet de retarder l'apparition des premières métastases osseuses de 4 mois (Mollica et al., 2021; Smith et al., 2012).

Le chlorure de radium 223 : il s'agit d'une molécule radiopharmaceutique, similaire au calcium, qui peut se lier à l'os nouvellement formé et émettre des radiations (rayonnements de type alpha) pour induire l'apoptose des cellules tumorales avoisinantes. Il augmenterait la survie totale des patients d'après l'étude ALSYMPCA (Parker et al., 2013).

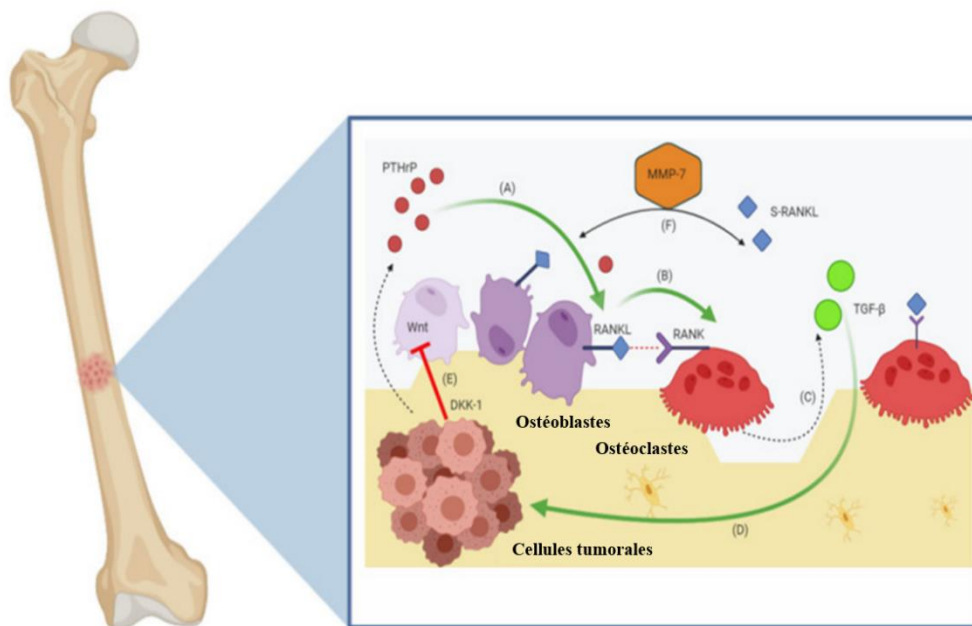


Figure 40: Cercle vicieux » dans les métastases osseuses montrant l'implication de RANK et de RANKL.

D'après Mollica et al., 2021.

Ces molécules sont recommandées dans des cancers de la prostate résistant à la castration mais pas dans les cancers hormono-dépendants (pour revue, Mollica et al., 2021).

E. Nanomédecine

De récentes avancées en nanomédecine, permettant le diagnostic et le traitement du cancer de la prostate ont vu le jour. La nanomédecine est un champ de la médecine qui consiste à utiliser des nanotechnologies (Webster, 2006). Son utilisation dans le diagnostic et le traitement de cancers dont le cancer de la prostate a fait un énorme bond ces dernières années (Baetke et al., 2015; Tran et al., 2017). Elle présente de nombreux avantages comme la possibilité d'y joindre des molécules thérapeutiques, des agents d'imageries et le ciblage de la tumeur peut se faire de manière passive (*via l'effet EPR (enhanced permeability and retention)*) ou active, par sa fonctionnalisation en liant la nanoparticule à un ligand par exemple (Melancon et al., 2011). Même si les métastases osseuses du cancer de la prostate restent de nos jours incurable, ces nouvelles techniques ont démontré *in vivo* et *in vitro* leur importances thérapeutiques mais également leur utilité comme agents de diagnostic (pour revue, Hagaman et al., 2021).

II. La radiothérapie : effets des radiations ionisantes

La radiothérapie est un des traitements de référence pour les cancers localisés ou localement avancés de la prostate. Elle se base sur l'utilisation de rayonnements ionisants afin d'induire des dommages dans les cellules cancéreuses.

Les radiations électromagnétiques sont des particules ne possédant ni masse, ni charge, se déplaçant à la vitesse de la lumière et possédant des énergies (et donc des longueurs d'onde) différentes. Elles se propagent sous forme d'ondes (ondes radio, micro-ondes) ou sous forme de particules appelées photons (radiations X, radiations γ). Tous les rayonnements ne sont cependant pas ionisants. Un rayonnement est ionisant lorsqu'il possède suffisamment d'énergie pour arracher des électrons aux atomes ou molécules qui composent la matière qu'il traverse. Les particules électromagnétiques ayant une énergie inférieure à celle des UV sont non-ionisantes contrairement à celles ayant une énergie égale ou au-dessus des UV, dites ionisantes (UV, radiations X, radiations γ). Les photons X, découverts en 1895 par Wilhelm Conrad Röntgen, sont issus de réarrangements du cortège électronique suite au bombardement d'un métal lourd par un faisceau d'électrons. Les photons γ quant à eux sont produits par une désintégration nucléaire.

Lorsque ces particules pénètrent dans la matière, elles interagissent avec elle : il se produit un transfert d'énergie de la particule à la matière et la particule est ralentie. Le ralentissement progressif de la particule est caractérisé par une grandeur dénommée « transfert d'énergie linéique » (TEL). Il s'agit de la densité d'énergie absorbée par le milieu en fonction de la distance parcourue par la particule et il varie en fonction du type de rayonnement et de son énergie. Le TEL est défini selon l'équation suivante :

$$\text{TEL} = dE/dl$$

où dE est l'énergie moyenne transférée à la matière et dl , la distance parcourue par la particule. Il s'exprime en $\text{keV}/\mu\text{m}$, contrairement à l'énergie déposée dans la matière qui s'exprime en Gray (Gy), ce dernier représentant les joules déposés par kg de matière.

Les interactions entre les particules et la matière peuvent être de trois types :

- L'ionisation de l'atome : due à un retrait de l'électron du nuage électronique. Ceci arrive lorsque l'énergie de la particule est supérieure à l'énergie de liaison des électrons présents dans la matière.
- L'excitation de l'atome : lorsque l'énergie de la particule n'est pas suffisante pour retirer l'électron, mais assez importante pour le faire changer d'état, en lui faisant quitter son état fondamental pour un état de plus forte énergie, mettant ainsi l'atome dans un état excité.
- Transfert thermique : lorsque l'énergie de la particule n'est pas suffisante pour exciter l'atome, mais assez pour augmenter son énergie cinétique, induisant ainsi un transfert de chaleur.

Un photon peut interagir physiquement avec la matière par effet photoélectrique, effet Compton, réaction nucléaire, production de paires ou par diffusion de Thomson-Rayleigh... ou par des effets physico-chimiques et biologiques.

A. Effets physiques

Ce sont l'effet photoélectrique, l'effet Compton, la réaction nucléaire, la production de paires et la diffusion de Thomson-Rayleigh. La prédominance de chacun de ces effets est

fonction de l'énergie cinétique des photons incidents, mais aussi du numéro atomique des atomes dont est composée la matière, et donc avec lesquels interagissent les photons (**Figure 41**).

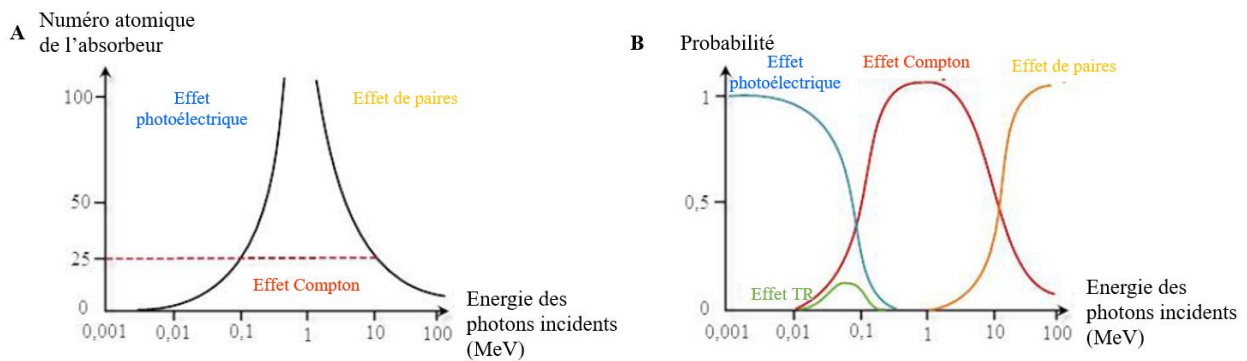


Figure 41: Prédominance des effets physiques des rayonnements X.

Différentes interactions entre les photons et la matière sont possibles en fonction de l'énergie cinétique des photons incidents et du numéro atomique des atomes composant la matière. L'effet photoélectrique et la diffusion de paires sont prédominants lorsque le numéro atomique des atomes rencontrés est supérieur à 25; l'effet photoélectrique étant majoritaire pour de faibles énergies, contrairement à la production de paires. L'effet Compton, quant à lui, est prépondérant lorsque des photons ayant des énergies cinétiques intermédiaires rencontrent des atomes à numéro atomique faible. La diffusion de Thomson-Rayleigh (effet TR) est majoritaire dans les faisceaux de faible énergie; elle est toutefois minoritaire en radiobiologie.

1. L'effet photoélectrique

Il s'agit d'un phénomène physique durant lequel un matériau métallique exposé à la lumière ou à un rayonnement électromagnétique de fréquence suffisamment élevée, émet des électrons. En effet, les photons transfèrent la totalité de leur énergie à un électron orbital de l'atome rencontré, appelé photoélectron. Le photoélectron est alors éjecté du nuage électronique, créant une lacune, et est mis en mouvement, puis il perd son énergie par ionisation et excitation du milieu environnant. L'atome cible, qui se retrouve excité, doit quant à lui subir une réorganisation de son cortège électronique : la lacune créée est comblée par un électron de la couche supérieure de l'atome, avec une émission d'énergie, responsable de l'émission d'un photon de fluorescence ou de son absorption par un autre électron qui est éjecté de l'atome. Cet électron est appelé l'électron d'Auger (**Figure 42**).

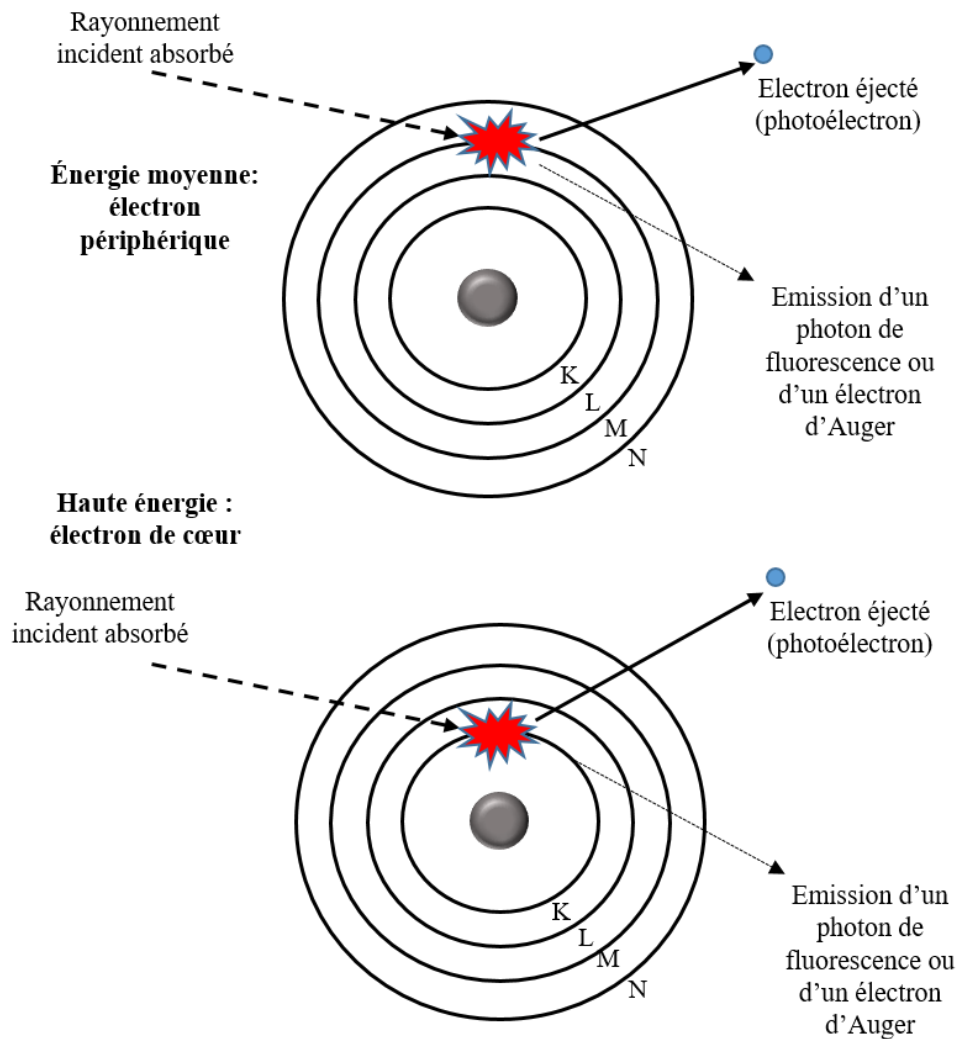


Figure 42: Effet photoélectrique.

2. L'effet Compton

L'effet Compton, également appelé diffusion Compton, est un phénomène observé lorsqu'un photon incident entre en collision avec un électron faiblement lié d'un atome. Cet électron, également appelé « électron Compton » est éjecté, l'atome se retrouve ionisé et un photon est diffusé. Le photon incident ne transfère ainsi qu'une partie de son énergie, car étant faiblement lié, l'énergie de liaison de l'électron est beaucoup plus faible que dans l'effet photoélectrique.

L'électron Compton et le photon diffusé sont déviés selon un angle θ avec le photon incident. L'angle θ dépend de l'énergie cinétique du photon incident : plus elle est élevée, plus l'angle θ est faible (**Figure 43**).

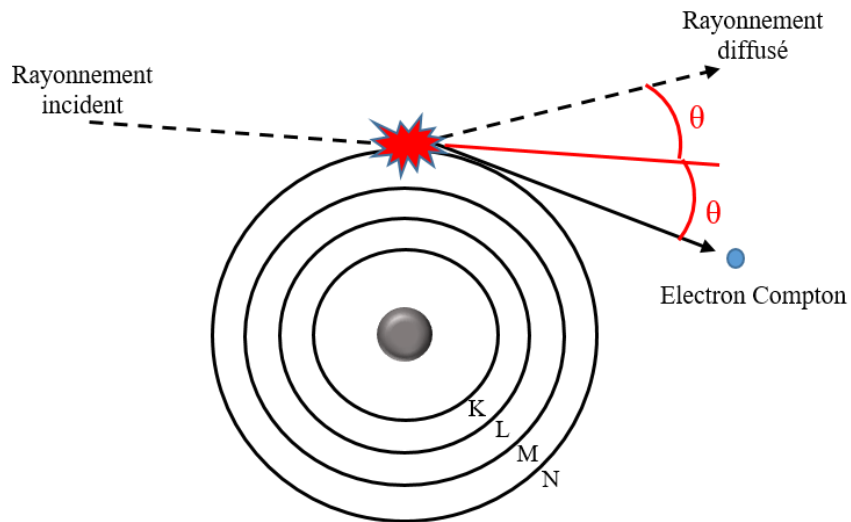


Figure 43: Diffusion Compton.

3. La production de paires

La production de paires est un phénomène qui se déroule lorsque le photon incident, possédant une énergie cinétique très élevée, c'est-à-dire supérieure au double de l'énergie de masse de l'électron au repos (soit environ 1,02 MeV), interagit avec le noyau de l'atome rencontré. Il se produit alors un électron et un positon. Ces deux particules ont la même masse et la même énergie cinétique que le photon incident et perdent leur énergie par ionisation et excitation du milieu environnant. Le positon peut également subir un phénomène d'annihilation avec un électron négatif du milieu environnant, produisant un rayonnement de deux photons d'énergie individuelle de 511 keV et formant un angle de 180° l'un de l'autre (**Figure 44**).

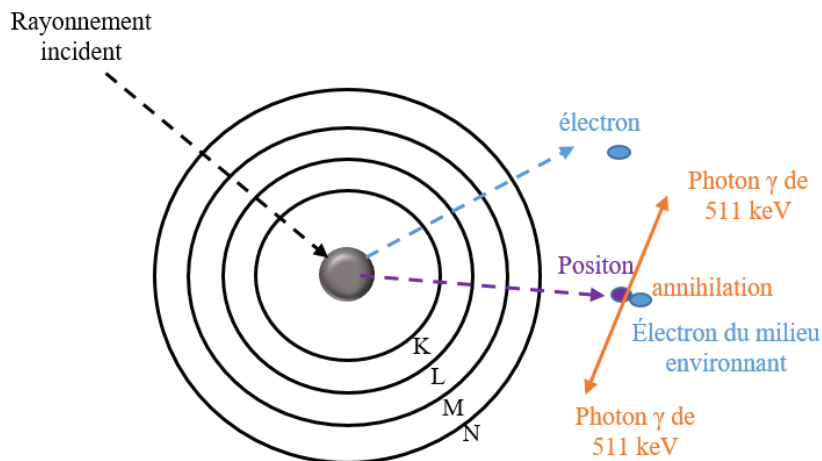


Figure 44: Production de paires.

4. La diffusion de Thomson-Rayleigh

Il s'agit d'un phénomène minoritaire qui a lieu lors de l'interaction des photons X et γ mais qui concerne plutôt les photons de faible énergie (infrarouge, lumière visible et rayons X mous). On parle de diffusion de Thomson-Rayleigh lorsque le photon incident est absorbé par l'électron rencontré, qui le réémet dans une autre direction. L'énergie du photon incident est la même que celle du photon émis (**Figure 45**).

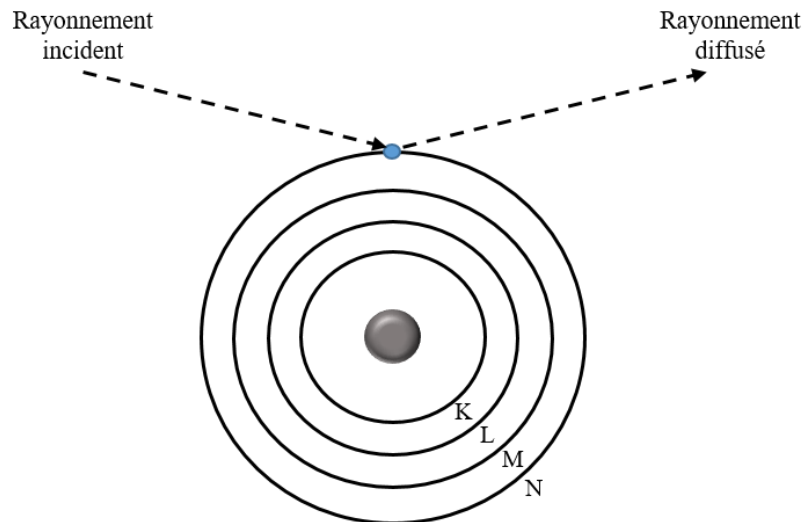


Figure 45: La diffusion de Thomson-Rayleigh

5. La réaction nucléaire

Elle a lieu lorsque le photon interagit avec le noyau des atomes pour émettre un ou plusieurs neutrons. Elle ne se produit qu'avec des photons dont l'énergie est supérieure à 10 MeV. Ces photons sont peu utilisés en radiobiologie.

B. Effets physico-chimiques

Les effets physicochimiques sont les conséquences directes et indirectes de l'interaction des rayonnements ionisants avec la matière, créant une ionisation ou une excitation des molécules. Ces dernières vont interagir entre elles mais également avec des macromolécules cellulaires (effets directs) ou indirectement sur la matière en passant par la radiolyse de l'eau (effets indirects).

1. Effets physico-chimiques directs

Ils se déroulent dans les 10^{-15} à 10^{-12} secondes après la collision avec la matière. Ce sont les conséquences de l'interaction directe des radiations ionisantes avec les molécules organiques constituant les cellules. En effet, ces molécules vont être ionisées ou excitées et restitueront leur excédent d'énergie en émettant un photon de fluorescence ou en rompant des liaisons chimiques covalentes, résultant en la formation de radiolésions moléculaires ou de radicaux libres. Les molécules cibles sont entre autre, l'ADN, les protéines, les lipides et l'eau.

2. Effets physico-chimiques indirects

Ils sont retrouvés dans la majorité des rayonnements à faible TEL. Ils passent par la radiolyse de l'eau. En effet, les rayonnements ionisants vont interagir avec la composante aqueuse de l'organisme. Les tissus biologiques sont composés de 60 à 80% d'eau et l'ionisation de cette dernière va provoquer la formation de radicaux libres hautement réactifs. Ces derniers vont interagir avec d'autres molécules et former des radicaux libres oxygénés tels que les anions superoxydes O_2^- , les radicaux peroxydes RO_2 . Ces radicaux libres oxygénés iront ensuite interagir avec des molécules voisines telles que l'ADN, les protéines, lipides et les modifier.

C. Effets biologiques/ Effets cellulaires des rayonnements ionisants

Les lésions physiques et physico-chimiques induites par les radiations ionisantes auront pour conséquence des dysfonctionnements cellulaires pouvant aboutir à la mort cellulaire. Comme mentionné ci-dessus, une des actions des radiations ionisantes passe indirectement par la radiolyse de l'eau qui produit des radicaux libres dans un laps de temps très court, comme le radical hydroperoxyde, le radical hydrogène, et le radical hydroxyle (Dayal et al., 2014). Ces radicaux très réactifs diffusent et atteignent des biomolécules dont l'ADN, causant ainsi des dommages (Bienert et al., 2007; Lennicke et al., 2015). L'action des radiations ionisantes peut également passer par la production de ROS : des études ont démontré l'augmentation de la formation de ROS survenant immédiatement après irradiation et maintenue pendant plusieurs heures (Ogawa et al., 2003).

Les effets biologiques des radiations ionisantes dépendent de la composition en eau et oxygène du tissu : les tissus riches en eau et oxygène sont radiosensibles alors que les tissus

pauvres en eau et en oxygène sont radiorésistants. C'est par exemple le cas de l'os ou de la dent.

Les effets biologiques peuvent apparaître, immédiatement sur du court terme (effets déterministes) ou sur du long terme (effets stochastiques). Il existe cependant un paradoxe dans le dépôt de dose : en effet, il faut déposer assez de dose pour empêcher le bon fonctionnement des systèmes de réparation mais pas trop pour éviter tout effet secondaire délétère à l'organisme.

1. Dommages à l'ADN et systèmes de réparation des lésions à l'ADN radio-induites

Toute structure cellulaire est une cible des radiations ionisantes. Cependant, compte tenu de son implication dans la transmission de l'information génétique, et donc du fait des nombreux effets que son altération pourrait engendrer, médecins et scientifiques se sont focalisés sur une structure clé : le noyau et son ADN, faisant de l'ADN nucléaire, la cible des radiations ionisantes la plus étudiée. Les dommages à l'ADN causés par les radiations ionisantes sont multiples. Ces dernières peuvent provoquer des ruptures de chaîne, des lésions oxydatives, la formation de sites abasiques, ou encore des modifications de bases. La fréquence de ces dommages est fonction des doses comme l'illustre le **tableau 6** représentant le nombre de lésions se produisant dans un noyau pour un gray.

Tableau 6: Nombre des différents types de lésions par gray et par noyau.

Type de lésions de l'ADN	Nombre de lésions/Gray/noyau
Cassures simple brin	750
Cassures double brin	40
Lésions intra ou inter brins	30
Pontages ADN-protéines	150
Modifications de bases	1400
Modifications des oses	1200

Parmi les dommages cités, les ruptures de chaînes sont dues à des cassures simple brin (CSB) et des cassures double brin (CDB) de l'ADN (Lomax et al., 2013) (**Figure 46**). Les

premières sont dues à la rupture de la liaison phosphodiester entre le phosphate et le désoxyribose qui, résulte de l'oxydation du désoxyribose (Evans et al., 2004). Les deux brins sont alors écartés et la pénétration de l'eau dans la brèche rompt les liaisons hydrogène entre les brins de l'ADN. Il existe une corrélation positive entre la dose d'irradiation et le nombre de CSB : plus la dose est élevée, plus il y a de CSB. Cependant, ces lésions sont réparées assez rapidement et ont ainsi peu d'impact sur la survie cellulaire.

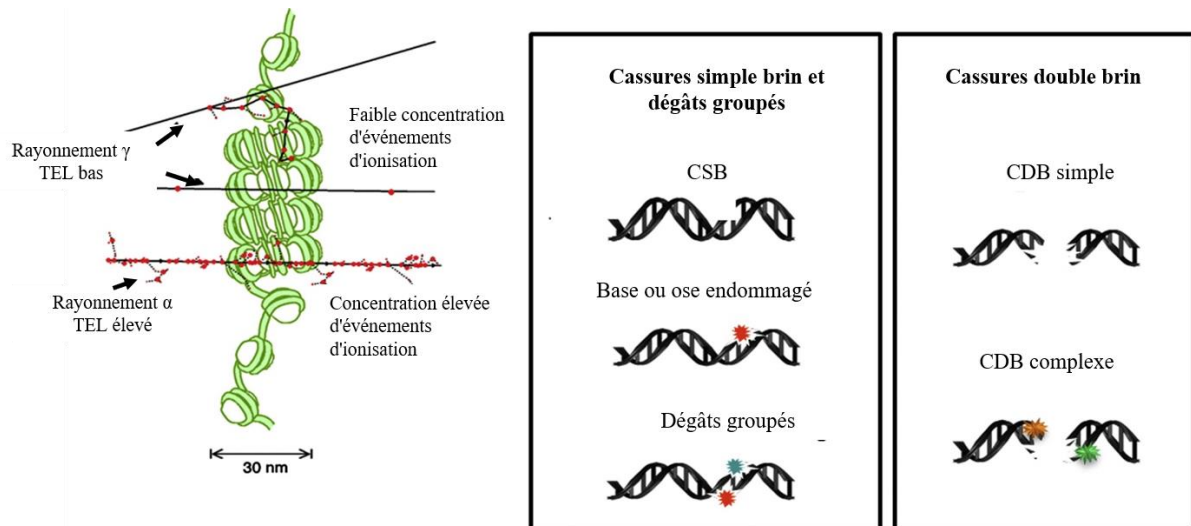


Figure 46 : Dommages à l'ADN.

Modifié d'après Lomax et al., 2013.

Les CDB sont quant à elles causées soit par la fixation d'un seul radical hydroxyle sur le désoxyribose avec transfert du radical formé sur le brin opposé, soit par deux radicaux hydroxyles qui traversent la même région dans un intervalle de temps insuffisant pour la réparation de la première cassure (Dikomey et al., 1998). Comme dans le cas des CSB, le nombre de CDB est proportionnel à la dose reçue mais contrairement à elles, les CDB sont plus difficiles à réparer et donc plus délétères pour la cellule. La plupart des CDB peuvent être réparées par deux mécanismes : la recombinaison homologue (HR) et la recombinaison des extrémités non homologues (NHEJ). Cette dernière est prédominante lors des dommages survenant en phase G1 du cycle cellulaire alors que la HR est cruciale pour la réparation de CDB plus complexes et implique entre autre la participation de BRCA1 et BRAC2. Il est intéressant de noter que les mutations des gènes BRCA sont associées à une augmentation du risque de développer un cancer de la prostate mais aussi à la réponse/réussite thérapeutique.

Outre les cassures, les radicaux hydroxyles ont pour cible les bases puriques et pyrimidiques ainsi que les oses constituant l'ADNn. La 8-oxo-7,8-dihydrodéoxyguanine (8-oxoadénine) est l'une des bases modifiées la plus fréquemment observée (Cadet et al., 1999, p. 19).

D'autres atteintes à la structure de l'ADNn provoquées par les radiations ionisantes. Sont des sites abasiques, des pontages ADN-ADN ou ADN-protéines ou encore, à une autre échelle, des aberrations chromosomiques et chromatidiennes. Les sites abasiques sont des conséquences de l'oxydation des bases dont résulte une déstabilisation de la liaison N-glycosidique entre la base azotée et le désoxyribose (Krokan & Bjørås, 2013). Les pontages ADN-ADN intra ou inter-brins et ADN-protéines résultent quant à eux de la formation d'une (ou de plusieurs selon le cas) liaison(s) entre deux bases ou entre l'ADN et des protéines nucléaires respectivement.

Enfin, les aberrations chromosomiques peuvent être des translocations, des délétions, ou encore des inversions et sont retrouvées lorsque des cellules en phase G0, G1 ou S sont irradiées. Les aberrations chromatidiennes sont quant à elles des cassures, des inversions paracentriques, des translocations de chromatides, des anneaux centriques et acentriques et surviennent après l'irradiation de cellules en phase G2/M. À part les translocations et les inversions qui peuvent perdurer des générations, la plupart de ces aberrations sont létales pour la cellule.

Enfin, les dommages ne sont pas obligatoirement isolés. L'interaction des radiations ionisantes avec l'ADN peut provoquer la formation d'au moins deux dommages sur une distance de 1 à 4 nm. Ces types de dommages forment un site de multi-dommages (LMDS). Des CSB, sites abasiques ou bases oxydées peuvent y être retrouvés (Sutherland et al., 2001). Ces sites sont fortement létaux, compte tenu du nombre important de lésions qu'ils contiennent. Les systèmes de réparation sont en effet « dépassés » et les erreurs de réparation qui en résultent sont alors délétères pour la cellule (Pearson et al., 2004).

2. Autres cibles

Outre l'ADN, les organites de la cellule mais aussi les protéines, les lipides sont des cibles importantes des radiations ionisantes.

a. La mitochondrie

L'ADNmt ne possède pas les mécanismes de protection et de réparation que confèrent les histones à l'ADNn ; de plus, sa proximité avec les sources de ROS le rend plus sensible comparativement à l'ADNn.

Dans un premier temps, il a été démontré une augmentation de l'ADNmt après irradiation (Szumiel, 2015). De plus, il a été rapporté que les radiations ionisantes induisent une seconde génération de ROS via une fuite d'électrons à partir des complexes de la chaîne de transport d'électrons dans la mitochondrie (Brand, 2016; Szumiel, 2015), passant par une hyperpolarisation mitochondriale (Yamamori et al., 2012a). Un niveau élevé de ROS entraînera des mutations de l'ADNmt qui auront également des répercussions sur l'ADNn. Les dysfonctionnements dus aux dommages à l'intégrité mitochondriale entraîneront *in fine* un stress oxydant local et systémique puis la mort cellulaire. Des données contraires ont cependant été rapportées dans des cas de cancers de la prostate: l'accumulation de ROS mitochondriales serait associée à des niveaux réduits de dommages à l'ADN et corrélée à une baisse d'entrée en apoptose des cellules, notamment par l'activation de voies de réparations des dommages à l'ADN. Les ROS mitochondriaux contribueraient ainsi à la survie et par conséquent à la radiorésistance des cellules cancéreuses de la prostate (McDermott et al., 2016).

Le dysfonctionnement mitochondrial induit par les rayonnements ionisants passe également par la diminution des activités des complexes de la chaîne respiratoire. On assiste également après irradiation à une hausse de la biogenèse mitochondriale qui se manifeste par une augmentation du contenu mitochondrial et de la masse mitochondriale (Bartoletti-Stella et al., 2013). Par ailleurs, des mutations ponctuelles de l'ADNmt et des délétions ont été retrouvées chez des patients traités par radiothérapie (Wardell et al., 2003).

Le potentiel de la membrane mitochondrial est également modifié après irradiation. En effet, des études ont démontré que dans des cellules non cancéreuses, les rayonnements ionisants induisent une augmentation du potentiel de membrane mitochondriale mais également une augmentation de la respiration et de la production d'ATP, ce qui a donc pour conséquence une régulation positive de l'OXPPOS (Yamamori et al., 2017). Cependant, les cellules cancéreuses s'adaptent rapidement aux dommages causées par les radiations, grâce aux systèmes de réparation de l'ADN par exemple.

b. Dommages oxydatifs des protéines

Les radicaux libres peuvent s'attaquer aux protéines présentes dans les milieux intracellulaires mais également dans la matrice extracellulaire. Ces protéines sont entre autres, des protéines de structure, des facteurs de transcription, et des enzymes. Le squelette constitué d'un enchainement de liaisons peptidiques et la chaîne latérale de certains acides aminés sont sensibles à l'oxydation.

L'oxydation du squelette polypeptidique se fait par l'induction du départ d'un atome d'hydrogène du carbone α par les radicaux hydroxyles HO \cdot . Ainsi se forme un radical centré sur le carbone. En l'absence d'oxygène, deux de ces radicaux centrés sur le carbone peuvent interagir entre eux pour former des liaisons croisées intra ou inter-chaînes. En présence d'oxygène, une réaction d'addition se produit avec le radical centré sur le carbone, formant ainsi un intermédiaire peroxyde, qui subit par la suite des réarrangements et des clivages donnant naissance à deux peptides contenant une fonction carbonyle. Ces protéines carbonylées sont entre autres considérées comme des marqueurs de stress oxydant des protéines. Les protéines oxydées sont soit réparées, soit dégradées par le protéasome (Delatre et al., 2007).

L'oxydation de la chaîne latérale de certains acides aminés est possible. Il s'agit de modifications irréversibles, pouvant conduire à l'inactivation des protéines. Les acides aminés les plus sensibles à l'oxydation de leur chaîne latérale sont les acides aminés soufrés, basiques et aromatiques (Delatre et al., 2007) (**Tableau 7**). L'oxydation des acides aminés soufrés mène à la formation de composés carbonylés ou de ponts dissulfure. Par exemple, pour la cystéine, ces ponts dissulfure sont facilement réduits par la thiorédoxine ou le glutathion réduit. La méthionine quant à elle est oxydée en sulfoxyde de méthionine, et ce dernier en sulfone de méthionine ou réduit par une enzyme, la méthionine sulfoxyde réductase. L'oxydation des acides aminés basiques, comme l'arginine par exemple, génère soit de l'acide 5-hydroxy 2-aminovalérique, soit un semi-aldéhyde glutamique, porteur d'un groupement carbonyle. L'oxydation de l'histidine produit de l'asparagine et/ou des dérivés aspartiques ou de l'oxo-histidine. La lysine, quant à elle peut être oxydée en hydroxy-lysine ou en semi aldéhyde ou encore subir une lipo-oxydation. Les chaînes latérales des acides aminés aromatiques sont également sensibles à l'oxydation, au niveau de leur cycle aromatique.

Tableau 7: Principaux produits d'oxydation de quelques acides aminés.

Acides aminés	Agent oxydant	Produits formés
<i>Cystéine</i>	$\cdot\text{OH}$	Acide cystéique, cystine
<i>Méthionine</i>	$\cdot\text{OH}$	Sufoxyde ou sulfone de méthionine
<i>Arginine</i>	$\cdot\text{OH}, \text{RO}_2\cdot$	Acide 5-hydroxy 2-aminivalérique, semi-aldéhyde glutamique
<i>Histidine</i>	$\cdot\text{OH}$	2-oxohistidine
<i>Lysine</i>	$\cdot\text{OH}$	3,4 ou 5-hydroxylysine, semi-aldéhyde glutamique
<i>Phénylalanine</i>	$\cdot\text{OH}$	Orthotyrosine
<i>Tryptophane</i>	$\cdot\text{OH}$	Kynurine, composés hydroxylés
<i>Tyrosine</i>	$\cdot\text{OH}$	Dihydroxyphénylalanine, bityrosine

L'oxydation de la phénylalanine par les radicaux hydroxyles génère des dérivés mono et di-hydroxylés ; celle de la tyrosine génère de la dihydroxy-phénylalanine ou des radicaux tyrosyls qui peuvent former des ponts tyrosine-tyrosine.

c. Dommages oxydatifs des lipides

Les lipides, notamment, les acides gras polyinsaturés, peuvent également subir des dommages oxydatifs de par la présence de plusieurs doubles liaisons intercalées par un groupement méthylène. Cette oxydation également appelée « peroxydation lipidique » provoque des changements de propriétés des membranes cellulaires en modifiant leur fluidité et leur perméabilité (Delatre et al., 2007).

La peroxydation lipidique est une suite de réactions qui peuvent se diviser en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Delatre et al., 2007) (**Figure 47**). La première phase est initiée par un atome d'hydrogène arraché aux acides gras polyinsaturés, formant ainsi un radical pentadienyl ($L\cdot$), très instable, qui va rapidement réagir avec de l'oxygène et former un radical peroxy ($\text{LOO}\cdot$). La phase de propagation est caractérisée par la réaction de ce radical avec un autre acide gras polyinsaturé et former soit un hydroperoxyde (LOOH) et un autre radical pentadiényl, soit entrer en phase de terminaison en réagissant avec

un autre produit radicalaire (L' ou LOO') pour former des esters (LOOL) (Delatre et al., 2007).

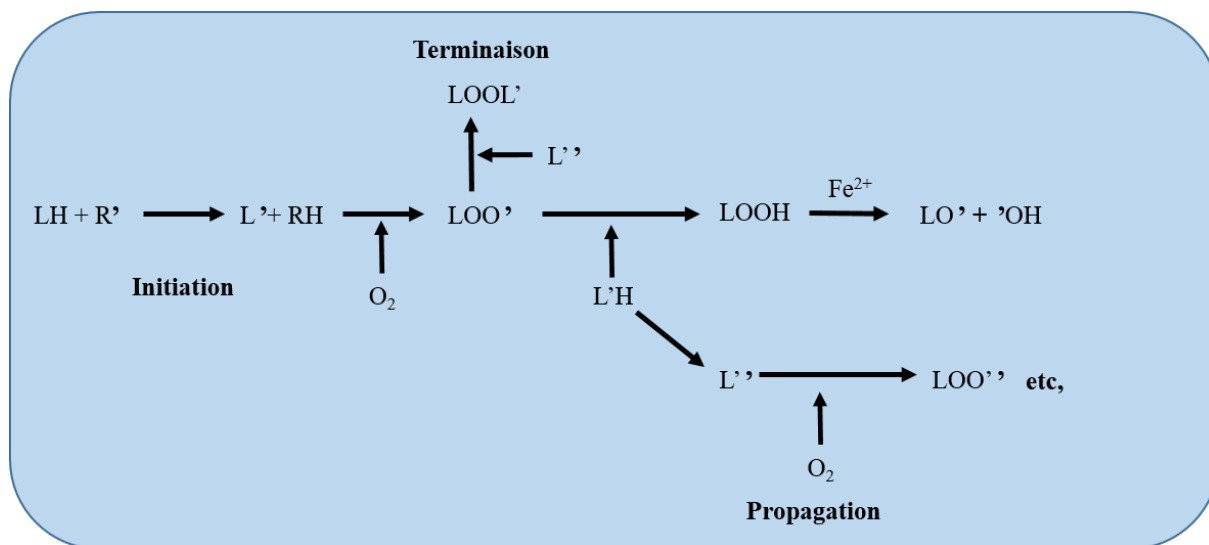


Figure 47: Les étapes de la peroxydation lipidique.

Les hydro-péroxydes sont des composés très instables et peuvent se décomposer pour donner des molécules cytotoxiques telles que des aldéhydes, capables de se lier à l'ADN, aux protéines et aux phospholipides.

Les céramides qui sont des seconds messagers lipidiques impliqués dans l'apoptose, peuvent également être des cibles indirectes des radiations ionisantes, affectant ainsi la mort cellulaire par apoptose radio-induite. La production de céramide est essentielle pour l'activation de l'apoptose radio-induite dans sa phase précoce mais également dans sa phase tardive (Alphonse et al., 2002). En effet, la céramide synthase mitochondriale est activée après irradiation. Ainsi, la production de céramide se fait spécifiquement dans la mitochondrie, induisant par exemple la translocation de Bax à la mitochondrie. Cette action est assurée par les céramides synthase CerS5 et CerS6 (Mesicek et al., 2010). Par ailleurs, une déficience en sphingomyélinases (également responsables de la synthèse de céramide en hydrolysant la sphingomyéline) a été mise en évidence dans certaines cellules tumorales radio-résistantes (Santana et al., 1996). De plus, dans ces mêmes cellules, une augmentation de l'expression de la céramidase acide lysosomale ainsi qu'une augmentation de la production de sphingosine-1-phosphate, une molécule anti-apoptotique ont été observées, empêchant ainsi la formation de céramide en réponse à l'irradiation (Beckham et al., 2012; Mahdy et al., 2009).

3. Atteinte du cycle cellulaire

a. Régulation du cycle cellulaire

Le bon déroulement du cycle cellulaire est important au bon fonctionnement de la cellule. Ainsi, le cycle cellulaire présente des points de contrôle, également appelés « checkpoints » au niveau desquels interviennent des complexes protéiques spécifiques (Pommier & Kohn, 2003). Ces complexes comprennent une sous-unité effectrice, les *Cycline-Dependent Kinases* (CDK) et une sous-unité régulatrice, les cyclines (**Tableau 8**). Le rôle de ces dernières est d'activer les CDK, présents tout au long du cycle mais sous forme inactive. Ces complexes cyclines/CDK en plus de la régulation par les cyclines, sont également régulés par d'autres mécanismes : en effet, les CDK peuvent être phosphorylées sur différents sites. Ainsi, elles peuvent être phosphorylées sur leur thréonine 160/161 par le facteur de transcription TFIID, ou déphosphorylées sur les thréonines 14 et 15 par une phosphatase de la famille CDC25 (*Cell Division Cycle 25*) (Serizawa et al., 1995; Sexl et al., 1999, p. 199). Il existe également des inhibiteurs des CDK, nommés CDKi (*CDK inhibitors*) comme par exemple INK4, p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}. L'activation des cyclines/CDK spécifiques à chaque phase (G0/G1, S, G2/M) ainsi que la régulation du complexe par ces différents acteurs vont être nécessaires au passage des checkpoints tout au long du cycle cellulaire (**Figure 48**).

Tableau 8: Les différents complexes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

<i>Phase du cycle</i>	<i>Complexes cycline/Cdk</i>	<i>Rôles des complexes</i>
G1	Cycline D / CDK4 Cycline D / CDK6	Phosphorylation et activation de la protéine Rb, libérant les facteurs de transcription E2F. Ces derniers contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la progression dans le cycle cellulaire
Transition G1/S	Cycline E / CDK 2	Responsables de la transition G1/S. Activent Rb par phosphorylation
S Transition S/G2	Cycline A / CDK 2	Responsables de l'activation de la réplication de l'ADN et de l'inactivation des facteurs de transcription de la phase G1. Induisent la duplication du centrosome et permettent l'arrêt de la dégradation de la cycline B.
Transition G2/M	Cycline B / CDK1	Responsables de la transition G2/M et de l'activation de la progression de la mitose

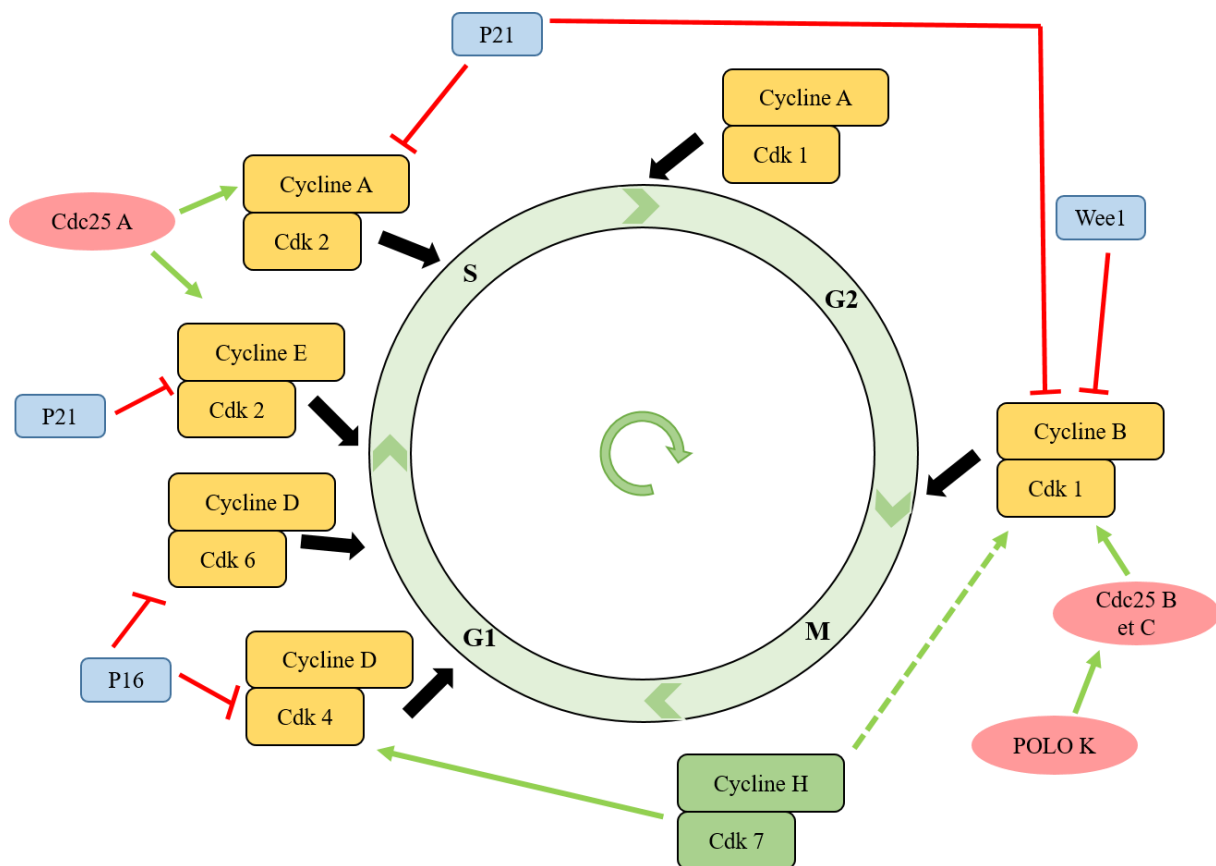


Figure 48: Schéma du cycle cellulaire et de sa régulation.

b. Effets des rayonnements ionisants sur le cycle cellulaire

Les cellules exposées aux radiations ionisantes subissent une modification de leur progression dans le cycle cellulaire. Toutes les phases du cycle peuvent être atteintes mais un arrêt en phase G2 est observé pour la majorité des types cellulaires. Ces arrêts sont dus soit à l'inhibition des complexes cyclines/CDK, soit à l'inhibition de l'avancement de la fourche de réplication et permettent la reconnaissance et la réparation des dommages ou la mort de la cellule.

Arrêt en phase G1 : l'arrêt en phase G1 est possible pour les cellules exprimant la protéine p53 fonctionnelle : il est en effet déclenché par l'activation et la stabilisation post-traductionnelle de cette protéine (Kastan et al., 1991, p. 199; Nelson & Kastan, 1994). Cet arrêt peut être transitoire et dans ce cas, la cellule survit ou meurt (apoptose), ou peut également être irréversible et mener à la sénescence. Après irradiation, les lésions induites mènent à l'activation de kinases ATM/ATR qui sont responsables de la phosphorylation de la protéine

p53. Cette phosphorylation peut être directe ou indirecte en passant par la phosphorylation de protéines Chk1/Chk2 (Vousden & Lane, 2007). L'activation de p53 va induire l'expression de différentes CKi telles que p15 et p16 de la famille des INK4 ainsi que p21 et p27 (el-Deiry et al., 1994; Hsu et al., 2000; Shapiro et al., 1998, p. 19). Les deux premières vont inhiber le complexe cycline D/CDK4 responsable de l'entrée et de la progression en phase G1 et les deux dernières inhibent le complexe cycline E/CDK2, nécessaire à la transition G1/S.

Les protéines Chk1/Chk2 peuvent également induire la dégradation de la phosphatase CDC25A par le protéasome en l'inactivant par phosphorylation (Vousden & Lane, 2007). De ce fait, le complexe cycline E/CDK2 n'est pas activé et la cellule est donc arrêtée en phase G1. Il s'agit ici d'une voie indépendante de la protéine p53 (Nilsson & Hoffmann, 2000).

L'action des radiations ionisantes peut également passer par l'expression du TGF- β capable d'activer les protéines p21, p15 et p27 (Datto et al., 1995).

Arrêt en phase S : cet arrêt passe par l'activation des protéines Chk1/Chk2 après irradiation, induisant la dégradation de la CDC25A par le protéasome (Vousden & Lane, 2007). Ainsi, le complexe cycline A/CDK2, responsable de la progression des cellules dans la phase S est inhibé, empêchant donc l'initiation de la réplication (Nilsson & Hoffmann, 2000). La protéine p53 est également impliquée dans l'arrêt en phase S car elle va permettre l'augmentation de l'expression de la protéine p21 qui a, elle aussi, la capacité de bloquer le complexe cycline A/CDK2 (Petrocelli et al., 1996).

Arrêt en phase G2 : comme déjà mentionné, la majorité des cellules irradiées subissent un arrêt dans la phase G2 du cycle cellulaire. Tout comme les autres phases du cycle cellulaire, l'arrêt en phase G2 dépend de la protéine p53. En effet, cette dernière active la protéine chaperonne 14-3-3 qui inactive la phosphatase CDC25C. Or cette phosphatase est essentielle à l'activation de CDK1, elle-même essentielle à la progression en phase G2. Ainsi, les cellules sont arrêtées en phase G2 (Graves et al., 2000). Il a été démontré que l'absence d'arrêt en phase G2 augmenterait la mort des cellules par apoptose (Bernhard et al., 1994, p. 199) et qu'inversement, une majoration de l'arrêt en cette phase indiquerait une acquisition de résistance à la radiothérapie (Palayoor et al., 1995). La radiorésistance des cellules n'est cependant pas en lien avec la durée de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 mais plutôt au nombre de CDB non réparées (Dikomey et al., 1998).

4. Mort cellulaire radio-induite

Nous avons vu que lorsque les cellules subissent des dommages suite aux radiations ionisantes, des mécanismes de protection comme l'arrêt du cycle par exemple, vont être enclenchés afin d'assurer la réparation des dommages. La mort cellulaire radio-induite peut être provoquée suite à des lésions létales (dus à des doses élevées) ou à des accumulations (avec absence de réparation) de lésions potentiellement létales ou sublétales. Le but de la radiobiologie est d'infliger de tels dommages afin de placer la cellule dans l'incapacité de les réparer et donc de se diviser.

À part l'apoptose et la sénescence qui ont été respectivement abordées dans le chapitre I, il existe d'autres types de mort cellulaire.

La mort cellulaire immédiate : elle est due à une très forte dose d'irradiation, mettant les cellules dans un statut inflammatoire important. Les mécanismes exacts responsables de cet événement sont toutefois méconnus.

L'**autophagie** : elle survient à la suite d'un stress cellulaire. Il s'agit d'un processus catabolique : en effet, la cellule dégrade ses propres constituants. Dans ce qu'on appelle l'autophagie cytoprotectrice, la cellule, en dégradant de manière contrôlée ses composants, s'assure de l'apport d'énergie nécessaire à sa survie. Ce phénomène a été décrit dans des cellules tumorales qui présentent des mutations oncogéniques mais aussi un niveau basal d'autophagie qui leur permettrait de survivre (Yang et al., 2011). C'est en effet ce qui se passe dans l'effet Warburg, lorsque les cellules cancéreuses, même en présence d'oxygène produisent leur énergie par la glycolyse. La libération du lactate dans l'espace extracellulaire crée une acidification du milieu, entraînant potentiellement un stress cellulaire, puis le déclenchement de l'autophagie.

C'est également le cas de cellules résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie: en effet, l'autophagie leur permet de résister à la mort cellulaire après irradiations (Paglin et al., 2001). Ce mécanisme de maintien en vie de la cellule est toutefois très contrôlée, puisqu'au-delà d'un certain seuil, l'autophagie devient cytotoxique pour la cellule (Baehrecke, 2005).

La mitophagie : c'est une autophagie spécifique aux mitochondries défectueuses à la suite de dommages ou de stress. Elle est induite par différentes voies : la mieux caractérisée est

celle impliquant les protéines PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) et Parkin. PINK1 est impliquée dans la détection de la qualité des mitochondries et Parkin dans le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale, en association avec PINK1. En réponse à la perte du potentiel de membrane, la protéine PINK1 est stabilisée sur la membrane externe des mitochondries endommagées et recrute la protéine Parkin en la phosphorylant. Leur accumulation sur les mitochondries défectueuses permet la ségrégation de ces dernières avant leur dégradation autophagique par un processus impliquant l'ubiquitination des protéines mitochondriales par Parkin. De plus, le microenvironnement des cellules cancéreuses contient HIF1A, un facteur de transcription inductible par l'hypoxie. Ce facteur favorise l'expression de BNIP3, un facteur important pour la mise en place de la mitophagie (Shokolenko et al., 2013, 2016).

La mort mitotique : c'est la mort radio-induite la plus répandue. Elle est due à des dommages à l'ADN stables, non réparables ou à un défaut dans la progression du cycle cellulaire ; elle est associée à une activation inappropriée du complexe Cdk1/cycline B. Aussi connue sous le nom de catastrophe mitotique, on en distingue deux types : une mettant en jeu une voie partiellement dépendante de p53, qui survient après une mitose avortée et qui mène à une apoptose après activation de caspases et la seconde mettant en jeu une voie indépendante de p53 où les cellules meurent pendant ou après la métaphase. La cellule est alors bloquée dans son cycle cellulaire et sa mort va être induite par apoptose ou par nécrose ou alors, la cellule va rentrer en sénescence.

La nécrose : il ne s'agit pas d'une mort programmée mais plutôt d'une mort prématurée de la cellule, due à un dégât cellulaire. Elle survient environ 24h après les radiations ionisantes. Elle se manifeste par un gonflement du cytoplasme et des organelles, une augmentation de la perméabilité des membranes, la lyse de la chromatine et de l'ADN et se termine par une cytolyse. La perméabilité membranaire croissante induit une perte de l'intégrité membranaire : ainsi, les débris et contenus intracellulaire sont déversés dans la matrice extracellulaire, provoquant ainsi une importante réponse inflammatoire dans le tissu environnant.

III. Rayonnements ionisants et hadrons

Comme évoqué précédemment, les hadrons sont des radiations ionisantes particulières assez lourdes. En effet, contrairement aux photons, ils possèdent une masse. Il existe des hadrons chargés (protons, électrons, ions lourds) et des hadrons non chargés (neutrons). Les protons et les neutrons sont produits par des cyclotrons alors que les électrons sont produits par des accélérateurs. Les ions lourds comme les ions carbone sont quant à eux produits par les synchrotrons. Comme évoqué, ces derniers ont les mêmes avantages que les protons dans le sens où leur dépôt d'énergie peut être modulé afin de le diriger vers la tumeur uniquement. Les électrons quant à eux permettent d'irradier les tumeurs à différentes profondeurs en fonction de leur énergie initiale. Enfin, les neutrons sont directement ionisants et interagissent donc avec la matière tout au long de leur parcours, rendant leur utilisation problématique (**Figure 39**). Les effets physiques des hadrons se résument en trois mécanismes : les collisions élastiques, inélastiques et la fragmentation nucléaire.

IV. Les phénomènes de radiorésistance

A. Généralités

La radiothérapie est utilisée comme traitement de référence des cancers de la prostate localisés ou localement avancés. Cependant, dans 20-40% des cas, il se met en place un phénomène de résistance à la radiothérapie : en effet, le cancer de la prostate devient récurrent ou se métastase malgré le traitement. La radiorésistance est un phénomène imprévisible qui met en place des mécanismes peu ou mal connus mais qui impliquent souvent une augmentation du nombre de cellules souches cancéreuses corrélée à l'augmentation de l'expression des marqueurs de surface CD44, une différenciation neuroendocrine corrélée à l'augmentation de l'expression des marqueurs de surface CD133 et CD138 et la mise en place de la transition épithélio-mésenchymateuse (Murata et al., 2019), traduisant une progression du cancer vers la malignité.

B. Cancers de la prostate et radiorésistance

L'acquisition de la résistance à la radiothérapie est l'une des complications aux thérapies du cancer de la prostate. Malgré plusieurs facteurs identifiés, les mécanismes sous-jacents ne

sont toujours pas concluants.

De manière générale, les cellules radiorésistance montrent une résistance à l'induction de l'apoptose. Elles sont également caractérisées par une forte activité des systèmes de réparation, une adaptation de la production de ROS cytoplasmiques et mitochondriaux et par l'acquisition de capacités migratoires et invasives. Même si les mécanismes de radiorésistance du cancer de la prostate restent méconnus, certains éléments ont pu être mis en évidence. Une meilleure compréhension de ces mécanismes est essentielle pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

1. Voies de signalisation impliquées

a. Les cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses ont la capacité de s'auto-renouveler, et de se différencier en divers types cellulaires formant le volume de la tumeur (Wang et al., 2013). Des cellules cancéreuses prostatiques ont la particularité de présenter des antigènes de surface comme le CD44, le CD133 (ou prominine 1) et le CD138 (ou syndécane-1) et possèdent des propriétés de cellules souches cancéreuses (Cojoc et al., 2015; Ni et al., 2014; Shimada et al., 2009, 2013), ce qui leur confère la capacité de résister aux irradiations.

b. La différenciation neuroendocrine

La majorité des cellules de l'épithélium prostatique (cellules luminales, basales et neuroendocrines) sont des cellules sécrétoires. La différenciation neuroendocrine est causée par une privation en androgènes ou par la radiothérapie, les transformant en *NE-like cells* (*neuroendocrine-like cells*) (Deng et al., 2008; Wu & Huang, 2007). Ces dernières ne possédant pas de capacité prolifératives sont ainsi résistantes à la radiothérapie (Deng et al., 2008; Suarez et al., 2014).

c. La transition épithélio-mésenchymateuse

Paradoxalement, une des conséquences des irradiations est de favoriser la TEM, ce qui permet aux cellules d'échapper au stress dans le microenvironnement (de Bacco et al., 2011; Zhang et al., 2011). En effet, les ROS dont la production est induite par les radiations ionisantes

peuvent augmenter l'activité de facteurs favorisant la TEM comme par exemple Snail, HIF-1 et le TGF- β (Montanari et al., 2017).

d. Akt

La voie de signalisation PI3K/Akt est impliquée dans le développement de plusieurs types de cancer mais également dans leur progression. Une plus forte activation de cette voie, en plus de celles des MAPK a été démontré dans des lignées cellulaires de cancers de la prostate résistant aux irradiations (Skvortsova et al., 2008). En effet, par plusieurs mécanismes, cette voie de signalisation contribue à la radiorésistance de cellules tumorales : la survie et la prolifération cellulaire, l'hypoxie, l'angiogenèse. Par exemple, des études ont montré son implication dans la sécrétion de VEGF, par l'induction de HIF-1, un facteur de transcription sensible à la pression partielle en oxygène (Hennessey et al., 2013). Ainsi, un ciblage de cette voie de signalisation est une piste intéressante dans les thérapies du cancer de la prostate.

e. Les systèmes de réparation des dommages à l'ADN

La balance entre les dommages à l'ADN et les systèmes de réparation mis en place décide du sort des cellules irradiées (Li et al., 2016; Sancar et al., 2004). Les points de surveillance du cycle cellulaire, induits par les dommages à l'ADN, existent au niveau des phases G1, S et G2 du cycle cellulaire. Ils sont initiés par ATM et ATR qui initient une réponse précoce aux dommages de type CDB (Bakkenist & Kastan, 2003; Yoo et al., 2009).

Des anomalies de la protéine ATM ont été recensées chez des patients résistants à la castration (Khemlina et al., 2015) et l'absence d'ATR induit une absence de réparation par HR. Par ailleurs, en ciblant les checkpoints du cycle cellulaire, la radiothérapie empêche l'entrée en mitose des cellules. À la lumière de ces observations, il apparaît que la surexpression d'ATM/ATR dans la progression du cancer de la prostate pourrait alors expliquer l'acquisition de la résistance aux irradiations. Une activation de la voie ATM par le stress oxydant indépendante des CDB a également été mise en évidence (Ditch & Paull, 2012).

PARP-1 est un facteur impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN et dans la régulation de facteurs de transcription. Son expression modulée à la hausse dans le cancer de la prostate et dans les cellules subissant une TEM, a été mise en lien dans l'acquisition de la radiorésistance de ce cancer (Lönn et al., 2010; Pu et al., 2014). Par ailleurs, l'interaction de

cette protéine avec d'autres acteurs impliqués dans la réparation de l'ADN (OGG1 ; APE-1), stimulant l'activité de PARP-1, a également été décrite (Kelley et al., 2012; Noren Hooten et al., 2011). L'utilisation de ses inhibiteurs, comme l'Olaparib seul ou combiné à d'autres types de traitements montre des résultats prometteurs (Bochum et al., 2018; de Bono et al., 2020; Yap et al., 2011).

f. Stress oxydant

Le lien entre stress oxydant et développement et progression du cancer de la prostate est bien défini. Ainsi, un phénotype agressif du cancer de la prostate est proportionnellement corrélé au degré de génération de ROS. Contrairement aux cellules saines de la prostate, les cellules cancéreuses prostatiques présentent un niveau plus élevé de ROS (Bostwick, Alexander, et al., 2000; Chaiswing et al., 2007, 2011, 2014). De leur côté, les irradiations induisent une augmentation des ROS intracellulaires qui persistent pendant plusieurs heures (Q. Chen et al., 2003) régulant ainsi plusieurs facteurs de transcription comme NF- κ B (*nuclear factor kappa-beta*) et p53 ; ceci a été observé dans le cas de cellules radiorésistantes PC3 et DU145 (Jayakumar et al., 2014). L'activation de ces facteurs va influencer le cycle cellulaire et les systèmes de réparation de l'ADN et moduler les voies de survie cellulaire (Reuter et al., 2010). Or, l'augmentation de ces facteurs, notamment du NF- κ B, a été associée au développement de la résistance aux thérapies de certains cancers. En effet, son activation est dépendante d'ATM.

Toutefois, l'augmentation de la production de ROS suite aux irradiations peut mener à l'épuisement des antioxydants intracellulaires tels que le glutathion (GSH), la thiorédoxine et la superoxyde dismutase (SOD), améliorant ainsi la sensibilité au traitement. En revanche, une surproduction de ces composés peut protéger les cellules des dommages causés par les irradiations, ce qui est le cas lors du développement de la radiorésistance du cancer (Kumar et al., 2016). Finalement, la capacité des cellules cancéreuses prostatique à résister à la radiothérapie est associée en partie à la production persistante de ROS, à l'up-régulation de facteurs de transcription et à une surproduction d'antioxydants (Chaiswing et al., 2018).

2. Implication de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite qui génère de l'énergie, de ce fait, les dysfonctionnements induits par les radiations ionisantes, à savoir, la diminution des activités des complexes de la chaîne de transport d'électrons, produisent des réactions en chaîne qui contribuent à un stress oxydant persistant (Yoshida et al., 2012). Il s'agit d'un phénomène d'adaptation impliqué dans le développement de la radiorésistance (Prise & O'Sullivan, 2009). En effet, dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, il a été mis en évidence une corrélation positive entre la hausse de la régulation d'OXPPOS ainsi que les ROS mitochondriaux et la radiosensibilité de ces cellules (Lu et al., 2015; Yu et al., 2017). De plus, des mutations de la sous-unité I de la cytochrome oxydase, une sous-unité codée par le génome mitochondrial, sont impliquées dans la malignité et le développement de la radiorésistance du cancer de la prostate, potentiellement *via* l'augmentation induite de la masse mitochondriale (Nugent et al., 2007; Petros et al., 2005). Ceci suggère qu'en étant une cible des ROS induits par les rayonnements, l'ADNmt peut être à l'origine d'un phénotype de radiorésistance. Cependant, de manière intéressante, des cellules ρ^0 , c'est-à-dire, dépourvues d'ADNmt, sont radiorésistantes ; ceci, probablement dû au fait de l'absence du checkpoint G2 (Cloos et al., 2009; van Gisbergen et al., 2015). Il a été également observé que la voie de la glycolyse est activée dans les cellules radiorésistantes DU145 et PC3 (Chang et al., 2017). Cette activation serait due à une augmentation de l'expression du transporteur de glucose Glut 1, médiée par Akt. L'inhibition de l'activité d'Akt abrogeait ce phénomène. (Shimura et al., 2014). Mais les altérations métaboliques du cancer de la prostate radiorésistant vont au-delà de l'augmentation de la glycolyse : la biosynthèse des acides gras augmentée *via* l'inhibition d'enzymes lipolytiques, est associée à une baisse de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses radiorésistantes (Fritz et al., 2013; Fritz & Fajas, 2010).

Dans des modèles de cancers de la sphère ORL, en comparant des cellules SQD9 (carcinome épidermoïde laryngé) radiosensibles et radiorésistantes, Grasso et ses collaborateurs montrent que, bien que la radiorésistance puisse être associée à une modification du métabolisme (passage d'un métabolisme glycolytique à un métabolisme oxydatif pour ce type cellulaire), celle-ci n'en serait pas responsable. La radiorésistance de ces cellules serait plutôt accentuée par la quantité et la qualité des mitochondries (Grasso et al., 2020).

L'ensemble de ces observations conforte l'idée selon laquelle le ciblage de la

mitochondrie par les rayonnements ionisants pourrait jouer un rôle dans la radiosensibilité des cellules tumorales.

V. Stratégies de radiosensibilisation

A. Les marqueurs de prédiction de la radiorésistance

La réponse aux rayonnements dans les tissus sains et cancéreux de la prostate est hétérogène, et ce, même chez un même patient. En effet, au sein même d'une tumeur, différentes régions peuvent présenter un gradient de radiosensibilité. Cela dépend fortement du microenvironnement mais également d'autres facteurs tels que la distribution des cellules souches cancéreuses, ou encore les altérations génétiques (Blaylock, 2015). Toutefois, l'identification de marqueurs de la réponse aux rayonnements serait d'une grande utilité clinique. En effet, ces marqueurs pourraient aider dans l'anticipation de la réponse à la radiothérapie, en permettant de classer les patients selon une signature.

1. Signature génique

L'analyse par microarray de l'expression de gènes suite à l'irradiation de cellules NCI-60 (cellules métastatiques du cancer de la prostate) en corrélation avec des données de survie clonogénique, a permis d'identifier une palette de gènes qui seraient impliqués dans le développement de la radiorésistance du cancer de la prostate. Ainsi, parmi les gènes identifiés, vingt-deux gènes ont été associés à une faible survie après une dose d'irradiation de 2Gy, quatorze gènes à une faible survie après une irradiation de 8 Gy et vingt-cinq autres ont été identifiés comme étant impliqués dans une réponse aux irradiations dépendant du statut p53 de la cellule (Amundson et al., 2008). Un réseau de facteurs de régulation comprenant des facteurs de transcription tels que E2F1, E2F4, RBL2 a également été mis en évidence.

De récentes études réalisées chez des patients atteints du cancer de la prostate et ayant reçu en première intention une radiothérapie ou une prostatectomie radicale, ont révélé la présence de signatures génétiques se basant sur l'expression d'ARN. En effet, ces signatures permettraient de différencier les cancers de la prostate indolents, non indolents et létaux, en se basant sur l'expression de ces gènes : MYC, NKX3-1, PTEN et STAR (Erho et al., 2013; Locke et al., 2012; Shen & Abate-Shen, 2010).

De manière intéressante, l'état de fusion des gènes TMPRSS2-ERG, décrit auparavant, ne permet pas de prédire un pronostic après une prostatectomie radicale ou une radiothérapie (Dal Pra et al., 2013). Cependant, l'utilisation de données cliniques a permis de mettre au point un score basé sur l'expression de 24 gènes, nommé PORTOS, et qui permet de surveiller la probabilité de développer une métastase de radiothérapie postopératoire à 10 ans (Zhao et al., 2016). Il s'agit du premier outil basé sur la signature génétique, développé dans le but de prédire la réponse du cancer de la prostate à la radiothérapie. Il aurait potentiellement une forte valeur clinique.

2. Marqueurs du stress oxydant

Des marqueurs du stress oxydant (peroxydation lipidique, protéines carbonylées) sont retrouvés à un niveau élevé chez des patients cancéreux recevant une thérapie anticancéreuse (Il'yasova et al., 2009). Chez l'homme et la souris (Nkx3.1 ou Nkx3.1 / PTEN KO), une altération des antioxydants ainsi qu'une accumulation de produits de dommages oxydatifs ont été démontrées au cours du développement du cancer de la prostate (Bostwick, Alexander, et al., 2000; Chaiswing et al., 2014).

L'hypoxie est également un facteur important étant donné le rôle de l'oxygène dans la réponse cellulaire aux irradiations. En effet, les cellules cancéreuses proches des vaisseaux sanguins, sont plus sensibles aux irradiations, contrairement à celles qui en sont éloignées (Brown, 1990). En entraînant des modifications transitoires du flux sanguin, les irradiations induisent une hypoxie aiguë dans la tumeur, et augmentent ainsi la résistance des cellules aux irradiations (Paul-Gilloteaux et al., 2017). Des études précliniques ont montré l'implication de plusieurs facteurs d'hypoxie (qui constitueront de ce fait, des signaux d'hypoxie) (HIF, PI3K / Akt / mTOR, NOX, Wnt / β -caténine et Hedgehog) dans la progression, le développement de la radiorésistance et la récurrence du cancer de la prostate (Bristow & Hill, 2008; Deep & Panigrahi, 2015). Dans ce contexte de la progression du cancer de la prostate médiée par l'hypoxie, les exosomes seraient impliqués en favorisant un remodelage du microenvironnement. Leurs rôles dans l'angiogenèse ou l'invasion de cellules cancéreuses de la prostate entre autres ont été mis en évidence par une augmentation de diverses molécules (TGF- β 2, TNF α , IL-6, TSG101, Akt, ILK1, MMP et β -caténine) ciblant les jonctions cellulaires (Ramteke et al., 2015).

Enfin, l'interleukine-8 (IL-8), une chimiokine stimulant le stress oxydant est impliquée

dans la progression du cancer de la prostate ainsi que dans la sensibilité des cellules cancéreuses aux irradiations. En effet, l'expression élevée d'IL-8 est associée à un score de Gleason élevé (Caruso et al., 2008). Son effet passerait par l'activation de HSP90. Cette dernière a une expression environ 100 fois plus élevée dans les cancers humains. Il s'agit d'une protéine chaperonne dont l'activité dépend de l'ATP et qui est impliquée dans la stabilité de certaines de protéines essentielles à la croissance tumorale et à la résistance thérapeutique. Dans les cancers de la prostate radiorésistants, son rôle a été mis en évidence dans la régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, importante dans l'acquisition de la radiorésistance (Camphausen & Tofilon, 2007; Chang et al., 2017; Whitesell & Lindquist, 2005).

3. Marqueurs du microenvironnement

La mise en place de la TEM étant associée au développement de la radiorésistance, la connaissance de la physiologie des voies de signalisations mises en place pourrait être un marqueur de prédisposition à la radiorésistance. En effet, la régulation de l'expression de protéines telles que la E-cadhérine, la N-cadhérine et la vimentine est modifiée dans des cancers de la prostate avec des caractéristiques d'invasion. D'autres molécules en amont des cascades de signalisation peuvent également être modifiées dans leur régulation telles que le TGF- β , Wnt, Hedgehog, Notch, EGFR/PI3K/Akt, MAPK (Lee, Jeong, et al., 2017). En effet, ces molécules participent à l'activation de Snail ou Slug, protéines clés de la TEM dont l'expression a été retrouvée augmentée dans plusieurs types de cancers acquérant de l'agressivité, dont le cancer de la prostate (Medici et al., 2008). L'expression de Slug est augmentée après l'irradiation de cellules cancéreuses radiorésistantes, ce qui conduit à l'inhibition de la voie apoptotique dépendant de p53 (Liu, Uygur, et al., 2010). Ainsi, la découverte d'une signature de biomarqueurs de la TEM pourrait être bénéfique dans la détection de l'émergence de la radiorésistance dans plusieurs types de cancers, dont celui de la prostate.

Le TGF- β est un facteur de croissance évoqué à plusieurs reprises jusqu'ici, montrant ainsi son rôle central dans les mécanismes de développement et de radiorésistance du cancer de la prostate. En effet, il exerce des effets différentiels selon l'état de développement et l'avancée du cancer de la prostate : sa régulation positive a été associée au grade tumoral, au stade pathologique et aux métastases ganglionnaires chez les patients atteints d'un cancer de la prostate (Batra et al., 2014). Cependant, aucune différence dans les taux sériques de TGF- β n'a été détectée entre l'HBP et le cancer de la prostate. Néanmoins, des taux plasmatiques et

urinaires élevés sont associées à un mauvais pronostic clinique (Reis et al., 2011). Il pourrait ainsi servir de marqueur du cancer de la prostate radiorésistant.

Enfin, la protéine nucléaire PARP-1, présentant multiple fonctions cellulaires dont la réparation de l'ADN est également impliquée dans la mise en place de la TEM suite à des irradiations. Des études ont montré que son inactivation menait à la mise en place de la TEM (Grant & Kyprianou, 2013; Khan et al., 2015). De plus, sa détection par immunocoloration montre une augmentation de son expression dans des cellules de cancer de la prostate associées au phénotype mésenchymateux (TEM), en réponse aux irradiations (Pu et al., 2014).

B. La radiorésistance : de nouvelles cibles pour la contrer

Le génome humain est constamment mis à l'épreuve par des agents endogènes et exogènes qui induisent des mutations de l'ADN, conduisant à des anomalies telles que le cancer. L'importance du maintien du génome est également renforcée par le rôle des systèmes de réparation des dommages à l'ADN dans le développement et la progression tumorale, faisant de ces derniers, d'intéressantes cibles à visée thérapeutique (Jeggo et al., 2016). Plusieurs voies thérapeutiques existent dans ce sens, comme l'inhibition de la voie ATM/ATR ; CHK1/CHK2 abordés précédemment. Les checkpoints du cycle cellulaire peuvent également servir de cibles de radiosensibilisation (pour revue, Johnson et al., 2021; Klinakis et al., 2020). Nous nous limiterons cependant à celle impliquant PARP-1 et Dbait.

1. Stratégies associées à la réparation de l'ADN

a. PARP-1

À l'ère du traitement personnalisé, l'identification de la susceptibilité/prédisposition d'un patient à développer des effets indésirables de la radiothérapie est une condition essentielle. La découverte de facteurs de susceptibilité à la radiorésistance va de pair avec la découverte de voies de radiosensibilisation des cellules cancéreuses. De cette manière, les facteurs précédemment cités, entre autres, sont utilisés dans des études en combinaison avec des traitements classiques : c'est l'exemple de la combinaison de plusieurs inhibiteurs des systèmes de réparation de l'ADN dont PARP-1, de l'inhibition de ReIB après irradiation (ReIB induit un antioxydant mitochondrial MnSOD et en s'associant avec P52, joue un rôle important dans la protection des cellules cancéreuses prostatiques contre les irradiations), ou encore

l'utilisation d'inhibiteurs du TGF- β ou de la HSP90 où une potentialisation de la réponse thérapeutique a été observée (Kabakov et al., 2010; Klinakis et al., 2020; Morgan et al., 2014; Xu et al., 2007; Zhang et al., 2012).

Ainsi, grâce à cette stratégie, les cellules tumorales prostatiques ont pu être radiosensibilisées en modulant les réponses aux dommages de l'ADN, les checkpoints du cycle cellulaire, le microenvironnement tumoral et en ciblant des voies de signalisations impliquées dans la survie et la croissance tumorale après irradiation.

b. Dbait

L'essor de la nanomédecine a permis de combiner et de co-délivrer un inhibiteur de voies de réparation de dommages à l'ADN, Dbait, et le docetaxel par l'utilisation d'un nanopolymère. Ainsi, les études menées par Lui et ses collaborateurs ont montré une sensibilisation de cellules de lignées de tumeurs prostatiques LNCaP, PC3 et DU145 à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Les mécanismes de sensibilisation impliquaient une inhibition de la prolifération cellulaire, une inhibition des voies des réparations des dommages à l'ADN. De dernier paramètre fut également observé dans des xénogreffes de modèles murins (Liu et al., 2020).

2. Autres stratégies thérapeutiques

a. État de l'art

Également dans l'effort d'améliorer la radiothérapie et d'éviter le développement de la radiorésistance des cellules cancéreuse, d'autres stratégies thérapeutiques continuent à voir le jour. Elles se basent sur le développement d'agents radiosensibilisants, conduisant ainsi à l'émergence de la nanomédecine.

En cancérologie, la nanomédecine permet le ciblage ou la vectorisation de principes actifs vers les tumeurs par l'utilisation de nanoparticules. Ces dernières existent sous plusieurs formes et permettent le dépôt de la molécule active sur les sites d'intérêts, évitant ainsi des effets secondaires. Outre l'effet direct de la molécule sur la cellule cible, certaines nanoparticules permettent également d'amplifier les effets des irradiations : c'est le cas des nanoparticules métalliques composés de milliers d'atomes à haut numéro atomique (Z) tels que l'or (Z=79), le cuivre (Z=29), le gadolinium (Z=64), le titane (Z=22). Par leur capacité à émettre

des rayonnements secondaires suite à leur interaction avec un rayonnement ionisant, ces éléments permettent d'augmenter localement l'énergie déposée (Hainfeld et al., 2008). D'autres types d'agents existent également sous forme de composés organométalliques : les métallo-carbènes appartiennent à cette catégorie. Contrairement aux nanoparticules, ces molécules ne contiennent qu'un seul atome à haut Z (or, cuivre, fer ($Z=26$), argent ($Z=47$)). Ce sont ces composés qui ont fait l'objet des travaux présentés dans ce mémoire, mais, avant de présenter plus en avant les métallocarbènes et leur intérêt dans le cadre de notre étude, nous allons préciser quelques points importants sur les éléments à haut numéro atomique et sur l'utilisation des nanotechnologies en cancérologie.

b. Les éléments à haut numéro atomique

Même si la physiologie de la tumeur est assez complexe, le ciblage spécifique des tissus tumoraux est un besoin fondamental dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. C'est pourquoi le développement des nanotechnologies a pris un réel essor ces dernières années (Paull et al., 2003). La France est classée deuxième après l'Allemagne, à l'échelle mondiale dans la recherche en nanosciences et cinquième en termes de nombre de publications dans ce domaine (Les nanotechnologies en France).

La nanomédecine est utilisée dans différents domaines : cancérologie, neurologie, maladies cardiovasculaires, vaccins etc. (Thorley & Tetley, 2013). Nous nous focaliserons sur son utilisation en cancérologie dans ce manuscrit.

c. Nanotechnologies et cancers : Généralités

Contrairement aux thérapies classiques comme la radiothérapie ou la chimiothérapie, l'utilisation des nanotechnologies en cancérologie permet le ciblage spécifique des cellules tumorales. En effet, étant plus stables, elles permettent également de passer outre les problèmes de solubilité des médicaments anticancéreux tout en assurant une meilleure distribution et ciblage tumoral. Toutefois il est important de maîtriser les caractéristiques de ces composés, à savoir, leur absorption par les cellules saines et cancéreuses ainsi que leur fonctionnalisation.

Il existe divers types de nanoparticules : nanoparticules organiques, viraux, inorganiques comprenant les nanoparticules métalliques. Leurs actions peuvent passer par un ciblage actif ou passif. Les nanoparticules peuvent également être couplées à la radiothérapie.

En effet, par la présence d'éléments à haut Z , elles augmentent l'efficacité thérapeutique en améliorant la dose d'irradiation (Townley et al., 2012).

3. Radiosensibilisation : notre approche

a. État de l'art

Tout d'abord, comme déjà mentionné, l'interaction des rayonnements ionisants avec les éléments métalliques à haut Z amplifie l'effet photoélectrique en rendant les atomes instables, ce qui résulte en une émission de photons de fluorescence ou d'électrons Auger. Ainsi, une seule ionisation peut donner lieu à plusieurs électrons Auger (cascade Auger). Ceux-ci d'énergie de l'ordre de quelques keV vont donc déposer leur énergie très localement, avec des pénétrations de 10-100 nm. Lorsque ces électrons sont émis au sein de cellules (cellules cancéreuses dans notre contexte), et selon leur site de production, ils peuvent amplifier les dommages à l'ADN et ceux dus au départ au rayonnement ionisant seul (McMahon et al., 2011; Roeske et al., 2007).

Une approche originale pourrait se baser sur la combinaison de l'intérêt des métaux lourds pour radiosensibiliser avec le ciblage d'un organite essentiel pour la cellule et en l'occurrence la mitochondrie. En effet, l'implication de la mitochondrie dans la mise en place et la progression du cancer de la prostate, ainsi que ses rôles métaboliques cruciaux dans la vie et la mort cellulaire rendent cet organite potentiellement stratégique pour une approche radiosensibilisante. Ces deux points nous ont conduits à nous intéresser à une catégorie particulière de composés : les métallocarbènes.

b. Mode d'action de la combinaison métaux-irradiations

L'interaction des photons avec les atomes à haut Z , produit des effets pouvant être divisés en trois phases : une phase physique, une phase physico-chimique et une phase biologique (Kempson, 2021; Rosa et al., 2017).

Effets physiques : trois principaux potentiels types d'interactions physiques se produisent entre les photons et le métal à haut Z : l'effet photoélectrique, généralement suivi des cascades Auger, l'effet Compton et la production de paires précédemment décrits

(Butterworth et al., 2012; McMahon et al., 2016). Des simulations ont montré un doublement de la dose déposée en présence d'1% d'or (Cho, 2005). Aucune variation n'a été observée en fonction des énergies des rayons X (keV par rapport au MeV) (Butterworth et al., 2012, 2013). De plus, une simulation Monte Carlo a montré une augmentation des électrons secondaires en combinant des nanoparticules à des irradiations (Khadem Abolfazli et al., 2015).

Effets chimiques : Plusieurs études montrent une production de ROS et une induction de stress oxydatif par les nanoparticules seules ou par leur combinaison avec les rayonnements ionisants (Coulter et al., 2012; Khalili Fard et al., 2015; Mateo et al., 2014; Tournebize et al., 2012; Wahab et al., 2014).

Effets biologiques : conséquences des effets précédemment décrits, ils se manifestent aux niveaux moléculaire, cellulaire et tissulaire. Ils ont été décrits comme les 5R : réparation, ré-oxygénation, redistribution, repeuplement et radiosensibilité intrinsèque (Cui et al., 2017). Des effets des carbènes seuls ont été montrés dans l'induction de l'apoptose par l'activation de l'AIF (Eloy et al., 2012) ou par l'activation des caspases 3 et 9 couplée à une baisse d'expression de Bcl2 et un arrêt du cycle cellulaire dans des modèles de cancers du sein (Gautier & Cisnetti, 2012). Nombreuses sont les études montrant le potentiel radiosensibilisateur de ces molécules (pour revue, Rosa et al., 2017).

c. Ciblage mitochondrial et radiosensibilisation par les carbènes et métallocarbènes

L'intérêt croissant pour l'utilisation de nanomatériaux ces dernières années a permis de mettre en évidence leurs actions physico-chimiques et biologiques leur conférant un meilleur ciblage de la tumeur et des capacités radiosensibilisatrices. Ainsi, ils réduisent les effets secondaires liés à la radiothérapie en permettant d'éviter les tissus sains (Butterworth et al., 2012; Herold et al., 2000; Regulla et al., 2002). Des nanoparticules d'iode, de gadolinium et d'or ont montré leur importance dans le ciblage et la radiosensibilisation de tumeurs. Par ailleurs, de manière intéressante, l'or a montré une meilleure biocompatibilité, faisant de ces composés des candidats idéaux pour la radiosensibilisation des cellules tumorales (Hainfeld et al., 2010, 2013). Ainsi, notre intérêt s'est porté sur un composé organométallique proche des nanoparticules et qui possède des caractéristiques de ciblage de la mitochondrie : les carbènes. Ce sont des cations de Skulachev : des cations lipophiles ayant la capacité de pénétrer différentes membranes cellulaires (Lieberman et al., 1969).

Un atome de carbone a 6 électrons autour de son noyau dont 4 externes. Il suit d'une manière générale la règle de l'octet et établit donc quatre liaisons, mais cela n'est pas toujours le cas. Dans les carbènes, le carbone (ou l'un des atomes de carbone) n'a que 2 liaisons ; le composé est alors particulièrement instable et très réactif. Un carbène peut se combiner avec des métaux de transitions et former un complexe métallo-carbène stable. Il existe différents types de carbènes (or, cuivre, fer entre autres) qui ont fait l'objet d'études sur leur capacité de radiosensibiliser les cellules tumorales mais également en association avec la chimiothérapie. Nous nous focaliserons sur le ciblage de la mitochondrie par ces composés dans diverses tumeurs et plus particulièrement, le cancer de la prostate.

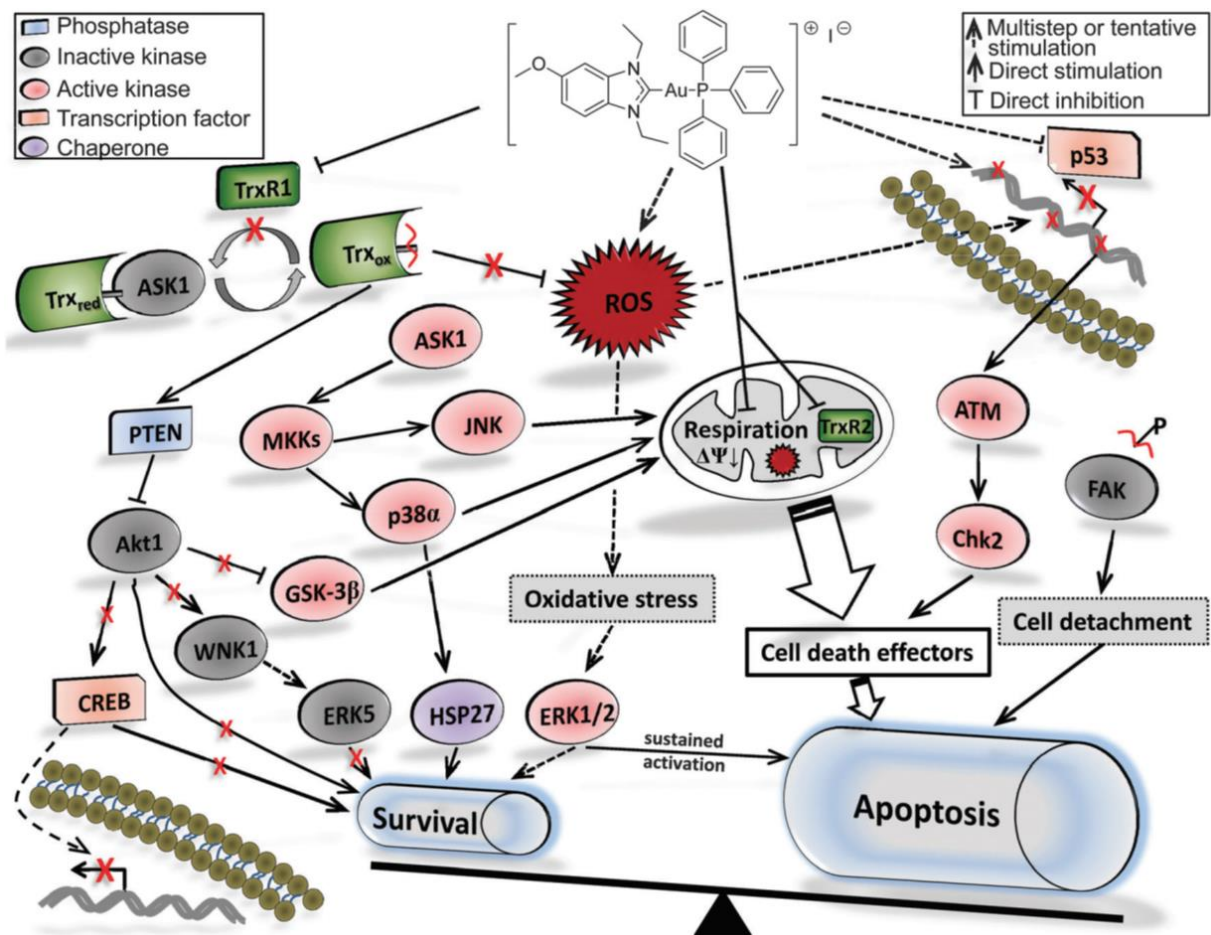
Depuis quelques années, les métallo-carbènes sont apparus comme des composés prometteurs en chimiothérapie en remplacement du cisplatine, un composé dont l'effet anticancéreux a été mis en évidence dans les années 1960 puis exploité pour le traitement des cancers 20 ans plus tard. Bien qu'efficace, le cisplatine ne permet pas de traiter tous types de cancers et, pour certains, une radiorésistance se développe. Par ailleurs il entraîne de nombreux effets secondaires (Rabik & Dolan, 2007). Des équipes ont montré assez récemment que des dérivés de carbènes N-hétérocycliques (NHC) de platine entre autre présentent des activités cytotoxiques supérieures au cisplatine (Gautier & Cisnetti, 2012; Oehninger et al., 2013). Leurs effets sont multiples et passent par nombre de voies citées auparavant.

Le développement de molécules organométalliques capables de cibler la mitochondrie est une avancée importante dans cette optique. Ces composés sont des cations lipophiles qui diffusent facilement à travers la membrane lipidique et se concentrent dans la mitochondrie grâce au potentiel de membrane mitochondrial (Modica-Napolitano & Aprille, 2001). Ils se concentrent ainsi dans les mitochondries présentant un potentiel membranaire plus élevé, ce qui est le cas pour les cellules tumorales. Plusieurs de ces molécules ont montré leur activité antitumorale avec une spécificité à cibler les cellules cancéreuses selon leur capacité lipophile (Kandela et al., 2003; Trapp & Horobin, 2005). Ces molécules sont d'autre part capables de se complexer à la thioredoxine réductase (TrxR) et de l'inactiver. La TrxR, présente dans le cytoplasme et les mitochondries, joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox de la cellule. Des études ont montré une corrélation entre une augmentation de son activité et un évitement de l'apoptose en plus d'une augmentation de la croissance cellulaire (Lincoln et al., 2003; Rundlöf & Arnér, 2004). À l'inverse, son inhibition a eu pour conséquence l'entrée en apoptose des cellules tumorales (Anestål & Arnér, 2003; Marzano et al., 2007). Il a été ainsi

mis en évidence l'inhibition de la TrxR par un autre composé organométallique (Or) également capable d'inhiber la glutathion réductase (Urig et al., 2006). Ces complexes ont pu cibler spécifiquement des cellules cancéreuses et induire leur apoptose en entraînant une baisse de leur potentiel de membrane mitochondrial (Hickey et al., 2008).

D'autres études ont également démontré l'activité antitumorale et radiosensibilisante d'un carbène à base d'iridium sur une lignée métastatique de cancer du col de l'utérus. Ce carbène possédant une cytotoxicité plus contrôlée que celle du cisplatine (meilleure IC₅₀ en comparaison avec celle du cisplatine) a également une sélectivité pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines (également en comparant les IC₅₀). Ce complexe a été retrouvé dans les mitochondries, entraînant une dépolarisation de la membrane et une modification de la morphologie des mitochondries. L'analyse de différents facteurs a révélé une initiation de cascades d'événements impliqués dans la mort cellulaire, sans toutefois altérer le cycle cellulaire de ces cellules cancéreuses, contrairement à ce qui a pu être observé avec plusieurs drogues anticancéreuses associé à des dommages d'ADN. Les mécanismes d'action de ces composés seraient donc différents de ceux des agents anticancéreux (métalliques) « classiques » utilisés en chimiothérapie (Li et al., 2015). Enfin, des études ont démontré les effets cytotoxiques de composés mixtes de type titanocène (organo-métalliques à base de titane) et or sur des lignées cancéreuses résistantes de colon et de prostate (Mui et al., 2016).

Ces composés, en ciblant ainsi la mitochondrie, induisent des cascades mécanistiques qui mènent à la radiosensibilisation, entre autres, de la cellule et donc à sa mort (**Figure 49**). La combinaison de ces composés à la radiothérapie pourrait être une piste thérapeutique intéressante.



*Figure 49: Les voies de signalisation d'induction de la mort cellulaire par les carbènes.
Modifié d'après Holenya et al., 2014.*

OBJECTIFS

Dans le monde, le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus fréquent chez les hommes et la cinquième cause de mortalité due à un cancer. Les mécanismes en amont de la tumorigénèse prostatique sont multiples et s'inter-régulent. Ils incluent des modifications géniques, protéiques, épigénétiques et font intervenir des phénomènes tels que l'inflammation, le stress oxydant, la sénescence, une résistance aux voies de mort cellulaire dont l'apoptose (Hanahan & Weinberg, 2011; Shen & Abate-Shen, 2010). L'ensemble de ces mécanismes ont plusieurs points communs dont la mitochondrie (Cook & Higuchi, 2012; Zong et al., 2016). De plus, des altérations métaboliques ont lieu dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate, faisant encore ressortir le rôle clé de la mitochondrie dans cette pathologie (Barfeld et al., 2014; Costello et al., 2005; Currie et al., 2013; Kelly et al., 2016; Lee, Jeong, et al., 2017; Martinez-Outschoorn et al., 2017; Wei et al., 2021). Ces altérations métaboliques ont des sources diverses : altérations de gènes, régulations épigénétiques... mais sont également influencées par le mode de vie, dont l'alimentation (**Figure 50**).

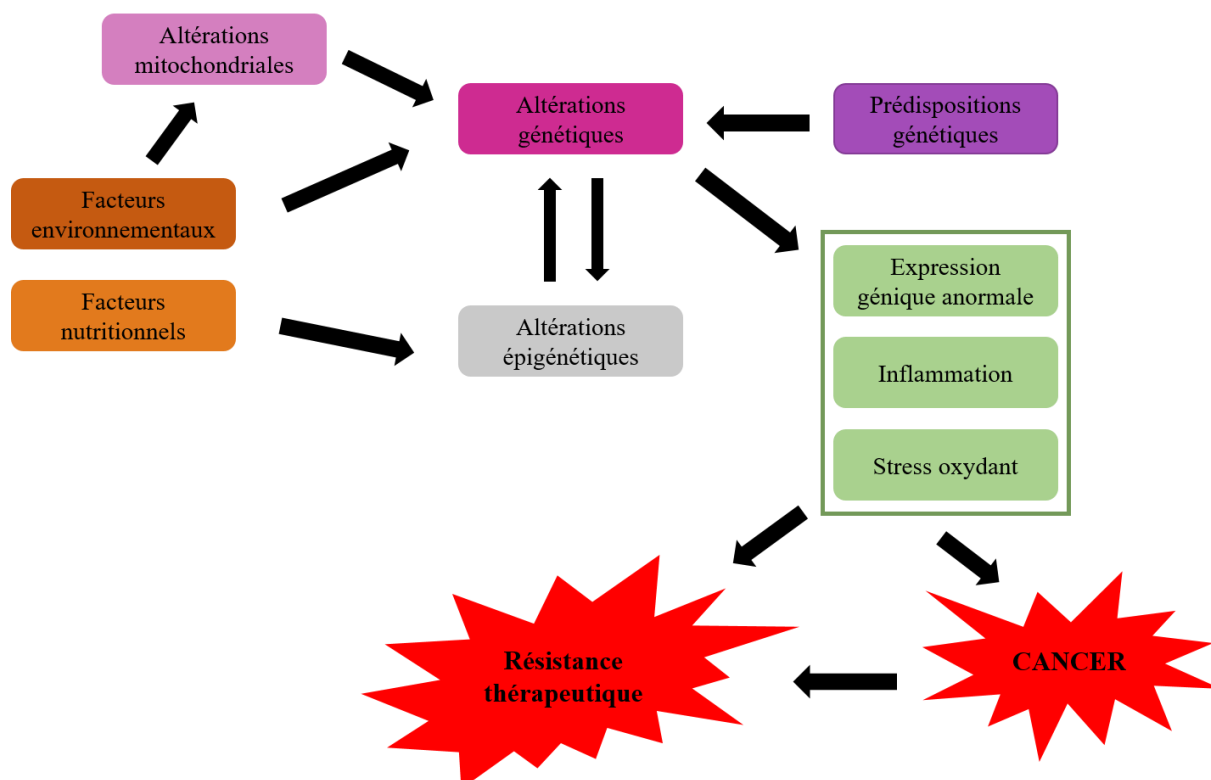


Figure 50: Divers acteurs impliqués et interconnectés dans le développement et la résistance thérapeutique du cancer de la prostate.

Diverses voies thérapeutiques existent pour traiter le cancer de la prostate, en fonction de son état d'avancement. Pour mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la radiothérapie. En effet, il s'agit d'une des thérapies de référence des cancers de la prostate avancés ou localement avancés. Elle consiste à utiliser des faisceaux de particules ou rayonnements ionisants capables de modifier la matière en la traversant, créant ainsi des dommages cellulaires. Cependant, dans près de la moitié des cas, le traitement échoue: en effet, les cellules par plusieurs mécanismes (dont la mise en place de systèmes de réparation des dommages à l'ADN, des mutations des génomes nucléaire et mitochondrial, l'augmentation de l'activation de la voie PI3K/Akt, la production de ROS, régulation du cycle cellulaire etc.), parviennent à résister aux radiations ionisantes. Plusieurs des mécanismes mis en place dans la radiorésistance des tumeurs prostatiques impliquent la mitochondrie (Grasso et al., 2020; McDermott et al., 2016; Pu et al., 2014; Reuter et al., 2010; van Gisbergen et al., 2015).

Compte tenu de son rôle pivot dans la radiorésistance des tumeurs prostatiques, le ciblage mitochondrial pourrait être une voie intéressante dans le but de radiosensibiliser les cellules tumorales. Ainsi, l'utilisation de composés organométalliques de type carbènes, présente un double intérêt : (1) ce sont des molécules se comportant comme des cations de Skulachev avec la capacité de cibler la mitochondrie et (2) ce sont aussi des molécules contenant des éléments métalliques à haut Z susceptibles d'amplifier les effets des irradiations, et donc de potentiellement radiosensibiliser les cellules tumorales. Leurs efficacités ont été démontrées dans plusieurs types de cancers (Gautier & Cisnetti, 2012; Holenya et al., 2014; Rosa et al., 2017).

L'objectif de mon travail de thèse a consisté à étudier l'intérêt du ciblage mitochondrial de cellules prostatiques par des carbènes-or afin d'amplifier les effets d'irradiations X de basse énergie et donc de radiosensibiliser ces cellules. Ce travail s'est décliné en 2 points principaux :

- Détermination du potentiel radiosensibilisateur des carbènes-or
- Détermination des mécanismes mis en jeu et des conséquences cellulaires

Pour cela, nous nous sommes servis de deux modèles de lignées cellulaires prostatiques : PC3 et LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*). Les cellules PC3 sont issues de métastases osseuses d'un adénocarcinome prostatique de grade IV. Elles ne sont pas sensibles aux androgènes, n'expriment ni AR, ni PTEN, ni p53 (Kaighn et al., 1979). De plus elles sont radiorésistantes. Cette première lignée, compte tenu de son fort potentiel métastatique

et de sa radiorésistance nous sert de modèle. La lignée LNCaP quant à elle est issue de métastases lympho-ganglionnaire sous-claviculaire d'un adénocarcinome résistant à la castration. Cette lignée exprime AR et p53 mais pas PTEN. Ainsi les cellules LNCaP sont sensibles aux androgènes, mais également aux œstrogènes et à la progestérone (Horoszewicz et al., 1980, 1983).

Au départ, nous avons reçu de l'ICCF (Institut de Chimie de Clermont-Ferrand) trois carbènes différents. La première étape de ce projet a consisté à n'en choisir qu'un et à le garder pour la suite de l'étude. Sur des caractéristiques chimiques dont la cytotoxicité, nous avons le carbène FC-IX-19 a été choisi. Ensuite, sa capacité à cibler la mitochondrie a été analysée dans nos modèles cellulaires. Nous avons ensuite déterminé ses impacts sur la radiosensibilisation des cellules sur un point de vue cellulaire, plus globale. Et enfin, nous avons analysé ses effets sur la radiosensibilisation d'un point de vue mitochondrial ont été décortiqués.

MATERIEL ET MÉTHODES

I. Culture cellulaire et traitements

A. Entretien des cellules

Les lignées cellulaires LNCaP et PC3 proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection) et sont cultivées dans des boîtes de Pétri stériles à 37°C, en présence de 5% de CO₂ et en atmosphère saturé en humidité. Elles sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco by Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et certifié sans tétracycline (SVF, Biowest) et 0.2 % de gentamicine (Gibco by Life Technologies). Un passage des cellules est effectué lorsque celles-ci atteignent environ 90% de confluence.

Les cellules sont congelées dans du SVF supplémenté avec 5% de DMSO (Sigma-Aldrich) à raison de 2 à 4.10⁶ cellules par ampoule (1 mL) et sont conservées à -80°C (courte durée) ou -150°C ou dans de l'azote liquide (pour de plus longues durées). La décongélation est réalisée en ajoutant 10 mL de milieu aux cellules décongelées et en centrifugeant le mélange à 1100 rotations par minute (rpm) pendant 2 minutes. Le culot est repris dans 1 mL de milieu et les cellules sontensemencées dans 10 mL de milieu de culture. Un changement de milieu est effectué le lendemain pour les PC3 et 48 heures après pour les LNCaP.

Afin de s'affranchir de toute contamination éventuelle par des mycoplasmes, des tests sont régulièrement effectués par PCR à l'aide du kit Look Out Mycoplasma PCR Detection Kit selon les indications du fabricant (Sigma-Aldrich).

B. Caractéristiques du carbène

Le carbène utilisé lors de cette thèse a été synthétisé par F. Cisnetti (Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF)) d'après le protocole décrit par Hickey et ses collaborateurs (Hickey et al., 2008). Sa structure est présentée ci-dessous (**Figure 51**):

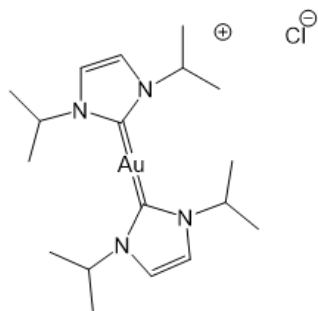


Figure 51: Structure du carbène FC-IX-19

Il s'agit de composés organo-métalliques, type cations de Skulachev, associés à l'or. En effet, étant lipophiles, ces composés ont la propriété de pénétrer plusieurs membranes cellulaires.

Ce carbène étant insoluble en phase aqueuse, les solutions mères sont préparées dans du DMSO, elles seront ensuite diluées de telle sorte que la proportion finale en DMSO lors du traitement des cellules ne dépasse pas 1/5000 (v/v). Des contrôles seront systématiquement réalisés avec du DMSO seul à une dilution comparable.

1. Détermination de l'IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration)

La cytotoxicité du carbène a été analysée par test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium ; Sigma-Aldrich) dans des plaques 96 puits. Ce test de survie cellulaire est basé sur l'activité mitochondriale. En effet, dans les cellules vivantes, le MTT est réduit par des enzymes mitochondriales en formazan de couleur violette. La quantité de formazan formé est directement proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives.

Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de carbène (10^{-9} à 2×10^{-5} M) pendant 48 heures. Le milieu a été ensuite éliminé puis 100 μ L de milieu frais et 20 μ L de MTT (3,75mg/ml) ont été rajoutés à chaque puits et les plaques ont été incubées à 37°C. Après quatre heures d'incubation à 37°C, les cristaux de formazan ont été dissouts par ajout de 100 μ L d'une solution de solubilisation (10% de Triton-X 100 et 10% de HCl 1N dans de l'isopropanol), sous agitation pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie grâce à un lecteur de plaque (Tecan Infinite M Nano) à 570 nm. La valeur de l'IC₅₀ a été déterminée à partir de la courbe dose-réponse obtenue.

2. Détermination du GI₅₀ (half maximal growth inhibition)

L'activité cytogénique du carbène a été étudiée par un test de clonogénicité. Pour cela, les cellules ont étéensemencées à faible densité 24 heures avant d'être traitées avec diverses concentrations du carbène comprises entre 0 et 4 μ M. La culture a été poursuivie soit en présence de carbène durant toute la période d'incubation (pas de changement de milieu), soit après changement du milieu à 3 heures ou 24 heures post-traitement. Quatorze jours plus tard, les colonies ont été fixées au méthanol à 37°C (Sigma-Aldrich) durant 15 minutes, puis colorées

avec une solution de 0.1% de cristal violet (Sigma-Aldrich) et enfin rincées à l'eau afin d'éliminer l'excès de colorant. Seules les colonies d'au moins 50 cellules ont été comptées et la valeur de GI₅₀ a été déterminée à partir de la courbe dose-réponse obtenue.

3. Effet potentialisateur du carbène

Les cellules ont étéensemencées 24 heures ou 72 heures avant d'être mises en contact avec différentes concentrations du carbène (0 à 4.10⁻⁶ M). Dans le cas d'un double traitement, elles ont été irradiées 3 heures après le traitement au carbène avec des doses allant de 0 à 8 Gy. Les irradiations ont été réalisées sur la plateforme Pavirma grâce à l'irradiateur X-Rad 320 (Precision X-Ray Inc (PXi), USA) à un débit de dose d'environ 2,35Gy/minute, une énergie de 250 keV et une intensité de 15 mA.

Pour les expérimentations, le carbène a soit été maintenu dans le milieu de culture pendant la durée du traitement, soit éliminé à 3 heures ou 24 heures post-irradiation.

C. Internalisation et localisation sub-cellulaire du carbène

Afin d'analyser la capacité du carbène à entrer dans la cellule, l'or intracellulaire a été quantifié par ICPMS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry ; Agilent 7500 Series du Laboratoire Magmas et Volcans). Les cellules ont été traitées avec 0,5µM de carbène pendant 3 heures, puis récupérées après élimination du milieu. Elles ont été par la suite dissoutes dans de l'acide (HCl 12,4M, HNO₃ 15,8M) dans des béchers en verre (Savillex) pendant au moins 3 heures. L'évaporation des solutions est ensuite réalisée à 100°C puis les échantillons ont été repris dans une solution de HNO₃ 0,4M, HF 0,05M contenant 2 ppm d' ¹¹⁵In utilisé pour la réalisation de la courbe standard. Les échantillons sont ensuite incubés à 90°C pendant une nuit une fois refroidis, ont été placés dans un bain à ultrasons pendant une heure. Si nécessaire, certains échantillons ont été dilués avec la solution d' ¹¹⁵In afin d'avoir une concentration d'or d' 1 à 2,5 ppm. Ils ont ensuite été soumis à l'ICPMS.

La localisation mitochondriale du carbène a été analysée suite à un fractionnement cellulaire en utilisant le Mitochondria Fractionation Kit (abcam) suivant les consignes du fabricant. Les trois fractions obtenues (cytosol, mitochondries et noyau) ont été dissoutes comme précédemment puis soumises à l'ICPMS. Le pourcentage d'or présent dans chaque fraction a été calculé par rapport à la quantité totale d'or présent dans l'ensemble des trois

fractions.

II. Analyse de la viabilité cellulaire

A. Survie cellulaire

Suite aux différents traitements (irradiations et/ou carbène), la survie cellulaire a été évaluée par un test MTT (voir paragraphe IC₅₀), toutes les 24 heures pendant 5 jours.

B. Clonogénicité

Les effets biologiques des irradiations vont induire une décroissance de la proportion de cellules vivantes capables de se diviser au fur et à mesure que la dose d'irradiation augmentera.

Le protocole utilisé est le même que celui décrit en pour la détermination de la GI₅₀. Les cellules ont ici été traitées avec différentes concentrations de carbène puis irradiées 3 heures après avec des doses d'irradiation allant de 0 à 8 Gy. Elles ont été incubées pendant 14 jours dans le milieu contenant le carbène ou après élimination de ce dernier 3 ou 24 heures après l'irradiation.

La survie a été calculée selon la formule suivante :

Survie_{nGy} = nombre de colonies comptées à nGy / nombre de colonies comptées à 0 Gy

Une courbe de survie permet de représenter les effets des irradiations seules ou de la combinaison des irradiations avec le carbène et a été générée pour chaque traitement (avec et sans carbène). Les tracés ont été modélisés grâce au logiciel Matlab (*MathWorks*) par l'équation linéaire quadratique ci-dessous:

$$\ln \text{ Survie} = -\alpha D - \beta D^2$$

avec :

D : dose d'irradiation (Gy)

α : tangente à l'origine de la courbe décrivant les liaisons létales immédiates

β : tangente de la courbe après l'épaule décrivant les liaisons létales secondaires.

En radiobiologie, un paramètre est souvent utilisé : il s'agit du SF2, la fraction de survie à 2Gy. Il correspond à la proportion de cellules capables de se diviser après une irradiation de 2Gy en combinaison ou non avec un composé organométallique. Un second paramètre a également été déterminé : le rapport d'amélioration de la sensibilisation (SER : *sensitizing enhancement ratio*). Il s'agit pour une dose d'irradiation donnée, du ratio de la fraction de survie en présence d'irradiations seules et de la fraction de survie lorsque le carbène est combiné aux irradiations, permettant de faire ressortir les effets du carbène sur l'irradiation et sur la survie cellulaire.

$$SER_{2Gy} = \frac{SF2 \text{ irradiations}}{SF2 \text{ carbènes+irradiations}}$$

III. Analyse des effets cellulaires et subcellulaires par cytométrie en flux

Les cellules ont été cultivées et traitées comme précédemment décrit. Différents paramètres précisés ci-après ont été analysés à différentes durées après irradiation : 0 min, 3, 6, 18, 24, 48, 72 et 96 heures) grâce au cytomètre FACS Calibur (BD Bioscience) sur la plateforme SYSTEM UCA PARTNER en utilisant le logiciel CellQuest Pro (BD Bioscience).

A. Analyse de la mort cellulaire

Pour cette expérience, le milieu de culture pouvant contenir des cellules en suspension suite à un processus de mort cellulaire a été conservé lors de la collecte des cellules. Des témoins positifs de l'apoptose ont été préparés à partir de cellules traitées la staurosporine (ApexBio) à une concentration de 2 à 4 μ M pendant 4 à 6 heures. Les cellules ont été collectées puis marquées en utilisant le kit Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor 488 & Propidium Iodide (Molecular Probes), en suivant les instructions du fabricant et en moyenne 3x 10000 événements sont analysés par échantillon. La fluorescence de l'Alexa Fluor 488 lié à l'annexine V a été déterminée à l'aide du laser à 488 nm et du filtre 530/30 nm et la fluorescence de l'iodure de propidium (IP) à l'aide du laser 488 nm et du filtre 475/24nm. Une compensation de fluorescence a été réalisée afin de corriger le chevauchement spectral entre l'Alexa Fluor 488 et l'IP. Pour cela, l'échantillon traité à la staurosporine a été utilisé, réparti en 4 tubes : un tube non marqué, un tube marqué à l'annexine V liée à l'Alexa Fluor 488 seul, un troisième marqué à l'IP seul et un quatrième tube doublement marqué ; ce qui a permis de régler,

respectivement, les paramètres relatifs aux cellules vivantes, uniquement marquées à l'annexine V liée à l'Alexa Fluor 488 seul, à l'IP seul et celles doublement marquées. Ces dernières ainsi que les échantillons ont été analysés sur un graphe représentant la fluorescence d'IP en fonction de celle de l'Alexa Fluor 488, à l'aide d'un quadrant délimitant les différentes sous-populations, vivante ou apoptotiques en appliquant les paramètres obtenus grâce à la compensation (**Figure 52**). Les données ont été analysées grâce au logiciel BD CellQuest Pro © (Becton, Dickinson and Company).

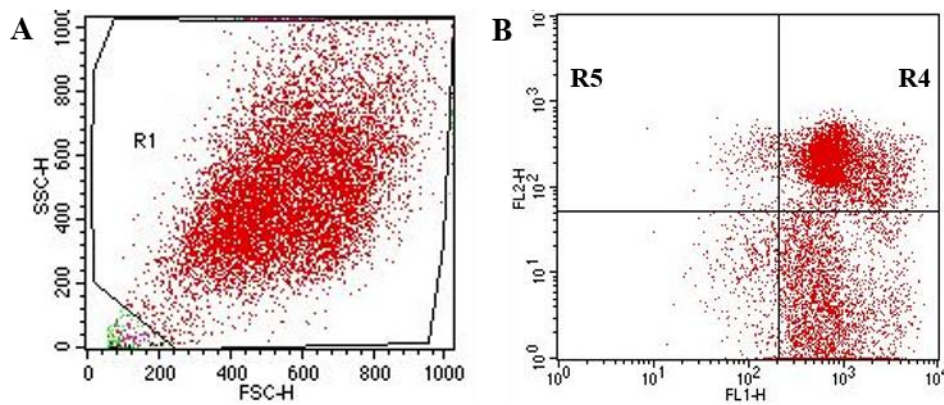


Figure 52 : Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux.

La population R1 permet d'exclure les débris (A). Le quadrant (B) représentant l'intensité de la fluorescence de l'iodure de propidium (BL2-A) en fonction de l'intensité de l'Alexa-Fluor 488 fixé à l'annexine V (BL1-A) permet de délimiter 4 populations: les cellules vivantes (R2), les cellules en apoptose précoce (R3), les cellules en apoptose tardive (R4) et les cellules nécrotiques (R5).

B. Analyse du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire a été réalisée sur environ $5 \cdot 10^5$ cellules qui ont été fixées à l'éthanol 70 % préalablement refroidi à -20°C . L'éthanol a ensuite été éliminé après centrifugation pendant 2 minutes à 2000 rpm et le culot cellulaire a été décollé par grattage puis incubé dans du PBS à 37°C pendant 30 minutes. Les tubes ont été de nouveau centrifugés pendant 2 minutes à 2 000 rpm afin d'éliminer le surnageant. Après décollement du culot cellulaire, l'ADN a été marqué à l'IP en utilisant le réactif FxCycle PI/RNase Staining Solution (Molecular Probes) puis les échantillons ont été incubés 15 minutes dans l'obscurité à température ambiante. La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (**Figure 53**) a été analysée grâce au canal FL2 (laser à 488nm et filtre 585/42nm). En moyenne, 3×10000 évènements ont été analysés par échantillon. L'analyse des données a été faite avec

le logiciel ModFit (version d'essai; Modfit LT, The Verity Team).

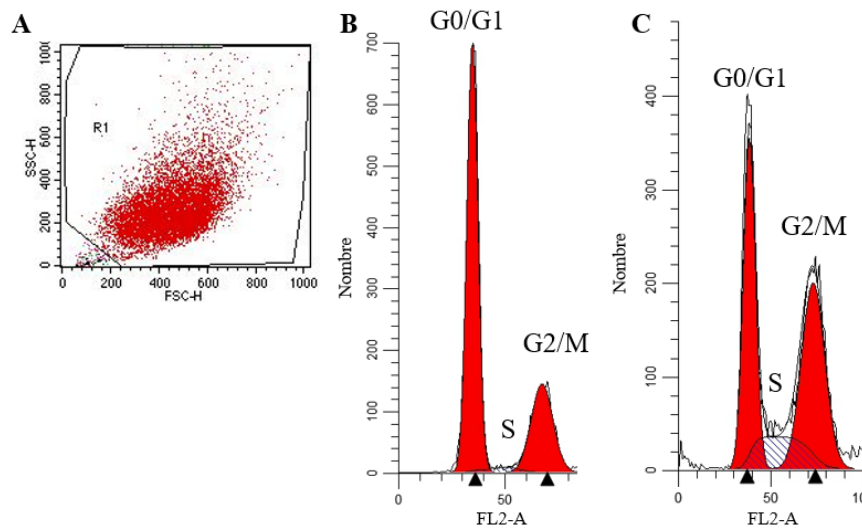


Figure 53: Analyse par cytométrie en flux de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Après l'exclusion des débris (A), une sélection des singulets est effectuée par le tracé de l'aire du signal FL2 (FL2-A) en fonction de la hauteur du signal FL2 (FL2-H). Les figures B et C représentent la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (nombre d'événements en fonction de l'intensité de fluorescence de l'iodure de propidium (FL2-A)). La figure C montre un blocage des cellules dans la phase G2/M.

C. Analyse du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$)

La mesure du potentiel de membrane mitochondrial a été faite sur environ $5 \cdot 10^6$ cellules traitées dans les différentes conditions. Après différents temps post irradiation, elles ont été récupérées et incubées à 37°C pendant 20 minutes en présence de la sonde JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolycarbocyanine iodide, Sigma Aldrich). La sonde JC-1 est un colorant lipophile et cationique qui s'accumule dans les mitochondries actives sous forme d'agrégats (fluorescence rouge, 590nm) ou de monomères (fluorescence verte, 529nm) lors de la chute du $\Delta\Psi_m$ (**Figure 54**). Les cellules ont été donc analysées par cytométrie grâce aux canaux FL1 (laser 488 et filtre 530/30) et FL2 (laser à 488nm et filtre 585/42nm). En moyenne 3 x 10000 événements ont été analysés par échantillon. Des cellules traitées au CCCP (100 μ M) pendant 20 minutes à 37°C ont servi de contrôle positif. Les données ont été analysées

grâce au logiciel BD CellQuest Pro © (Becton, Dickinson and Company) (*Figure 54*).

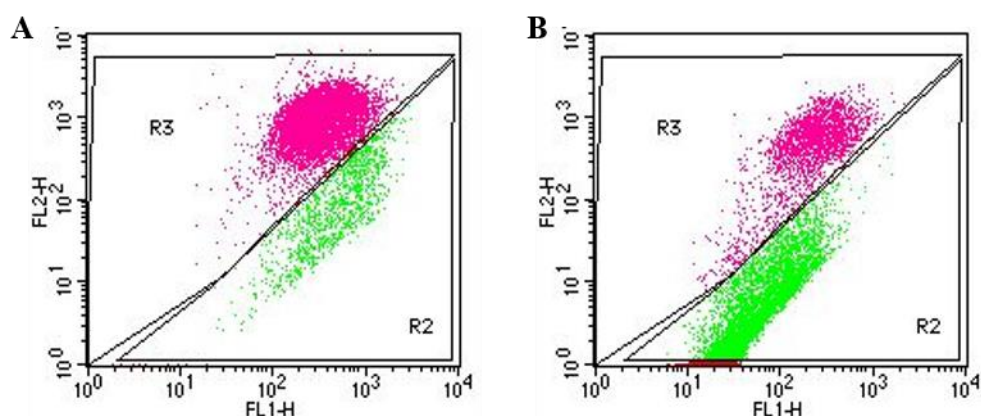


Figure 54: Mesure du potentiel de membrane mitochondrial par cytométrie en flux.

Après l'exclusion des débris cellulaires par la sélection de la population R1, les événements sont répartis dans un graphique représentant la fluorescence rouge (mitochondries polarisées) en fonction de la fluorescence verte (mitochondries dépolarisées). La figure B montre une chute du potentiel de membrane mitochondrial suite à un traitement au CCCP (100 μ M) pendant 20 minutes.

IV. Analyses sur les acides nucléiques

A. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait en utilisant le kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant à partir de culots cellulaires ($10^6 - 10^7$ cellules). Les ARN résiduels ont été éliminés par une étape supplémentaire en incubant les échantillons 5 minutes à 37°C avec de la RNase A (concentration ; Sigma Aldrich). Si nécessaire, l'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol 100% (25/10, v/v) et à l'acétate de sodium 3M (1/10 v/v) sur la nuit à -20°C et resuspendu dans 10 μ L d'eau (RNase-free; Ambion). La concentration et la pureté de l'échantillon ont été mesurées par Nanodrop (Thermo Scientific).

B. Southern Blot

L'ADN (1 μ g) a été digéré pendant 3 à 4 heures avec l'enzyme de restriction BamH1 (7,5 U) dans le tampon H (Promega), en présence de BSA 1X (Promega). L'ADN a ensuite été déposé sur du gel d'agarose 1% en présence de Safe Green (1X ; CliniSciences) et la migration a été effectuée à 100V. La migration a été contrôlée par visualisation de l'ADN aux UV (Fusion FX, Vilbert) puis le gel a été incubé pendant 10 minutes dans une solution de HCl 0,25N afin

de dépuriner l'ADN. Il est ensuite dénaturé dans une solution NaOH 0,5M, NaCl 1,5M pendant 30 minutes et enfin neutralisé pendant 45 minutes dans une solution de TrisHCl 1M pH8, NaCl 1,5M. Les fragments d'ADN ont été transférés sur la nuit par capillarité en présence de SSC 5X sur une membrane en nylon. L'ADN est ensuite fixé 2h à 80°C au four. La membrane a été hybridée avec une sonde mitochondriale et une sonde nucléaire (voir synthèse ci-dessous), toutes deux marquées au ³²P. Les membranes ont été préhybridées pendant 1 heure, puis hybridées sur la nuit à 60°C dans du tampon phosphate de sodium 0,25M pH 7,2 et SDS 7%. Les interactions aspécifiques sont éliminées par lavages une fois à 60°C pendant 10 minutes avec une solution de SSC 1X + SDS 0,5%, puis trois fois à 60°C pendant 10 minutes avec une solution de SSC 0,1X, SDS 0,1%. Les signaux d'hybridation sont observés par Phosphoimager (BioRad) et analysés par Image J.

Les matrices des sondes ont été synthétisées en amplifiant (95°C pendant 1 minute, 30 cycles de 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 1 minute ; puis 72°C pendant 5 minutes) 10ng d'ADN en présence de MgCl₂ (Promega), de dNTP (Promega), de polymérase (Gotaq ; Promega) en utilisant le Mastercycler gradient (Eppendorf). Les couples d'amorces sont répertoriés dans le **tableau 9**. Ensuite les matrices des sondes ont été purifiées en utilisant le kit Nucleospin Gel and PCR clean up (Macherey Nagel) en suivant les indications du fournisseur puis dosées au Nanodrop (Thermo Scientific). Enfin, la bonne amplification ainsi que la purification des matrices ont été contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose 1% + BET à 100V puis visualisées aux UV (Fusion FX, Vilbert).

Tableau 9: Liste des sondes utilisées pour le southern blot.

	Taille	Amorce sens (5' -> 3')			Amorce antisens (5' -> 3')		
		Position	Séquence	Température de fusion (°C)	Position	Séquence	Température de fusion (°C)
Sonde ADNmt	827	1671-1690	GCTAAACCTAGCCCCAA ACC	59,4	2478-2497	ACAGGCGGGGTAAAGATT TGC	59,4
Sonde 18S	502	900-921	CGGAACTGAGGCCATGA TTAAG	60,3	1381-1401	TAGCATGCCAGAGTCTC GTTC	59,8

V. Analyses sur les protéines

A. Extraction des protéines totales

Les cellules ont été traitées par le carbène et irradiées comme précédemment décrit. Plusieurs points de cinétique ont été pris en compte : 0, 15 minutes ; 1, 6, 24, 48, 72 et 96 heures post-irradiation selon la cible étudiée. À la fin du traitement, les cellules ont été récupérées par trypsinisation (en prenant soin de récupérer le milieu de culture) et reprises dans du Laemmli (TrisHCl 0.3 M pH 6.8, bleu de bromophénol 0.1 % (p/v), glycérol 50% (v/v) SDS 10% (p/v), β -mercaptoéthanol 25% (v/v)) auquel a été ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les lysats ont ensuite été traités aux ultrasons (10 secondes avec 50% d'impulsion) afin de fragmenter l'ADN. Le kit Protein Quantification Assay (Macherey Nagel) a été utilisé pour déterminer les concentrations, en suivant les recommandations du fabricant. Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à la réalisation du western blot.

B. Fractionnement cellulaire

Après la récupération des cellules aux différents points de cinétiques, elles ont été reprises dans du tampon de lyse (TrisHCl 50mM pH 7.8, NaCl 150 mM, nonidet P-40 1%, inhibiteurs de protéases) puis un fractionnement cellulaire a été réalisé en utilisant le Mitochondria Fractionation Kit (abcam), selon les instructions du fabricant. Ceci a permis d'obtenir trois fractions : une fraction cytosolique, une fraction mitochondriale et une fraction nucléaire. Les différentes fractions ont été reprises dans du Laemmli, traitées aux ultrasons (10 secondes avec 50% d'impulsion) et dosées comme précédemment décrit.

C. Western blot

Les protéines extraites (20 ou 50 μ g) ont été dénaturées pendant 5 minutes à 95°C. Elles ont ensuite été séparées par électrophorèse soit sur gels SDS-PAGE 10-12 % de polyacrylamide, soit sur gels gradient 4-15% (Biorad), dans un tampon de migration (Tris Base 25 mM, glycine 190 mM, SDS 0.1%) à 80-100 Volts constants. Ensuite, les produits de la migration ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose (GeHealthcare). Le transfert a été réalisé dans un tampon contenant 25 mM de Tris Base, 190 mM de glycine et 20 % d'éthanol absolu, à 200 mA constants, pendant 1h30. La qualité du transfert a été estimée par une coloration au rouge Ponceau (TCA 5%, rouge Ponceau 3%). Les membranes ont été par la suite

bloquées pendant 1 heure minimum à température ambiante et sous agitation dans du TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween 20 : Tris Base 20mM, NaCl 140mM, Tween 20 0,1%) contenant 5 % de lait écrémé. Suite à ce blocage, elles ont été incubées avec les anticorps primaires correspondants (**Tableau 10**) toute la nuit à 4°C sous agitation. Des séries de lavages au TBS-T ont ensuite été effectuées puis les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires correspondants couplés à la HorseRadish Peroxydase (HRP) (**Tableau 11**) pendant 1h30 à température ambiante, sous agitation. La détection des protéines, après 3 lavages au TBS-T, est réalisée grâce aux révélateurs Luminata™ forte western HRP Substrate (Milipore) ou SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific™) par caméra (Fusion FX, Vilbert). L'intensité des bandes après révélation a été quantifiée avec le logiciel Evolution Capt Edge (Vilbert).

Si nécessaire, les membranes ont été réutilisées par élimination des anticorps liés en les incubant dans du Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer selon le protocole du fournisseur (Thermo Scientific). Après des lavages au TBS-T et un blocage dans du TBS-T + 5 % de lait écrémé, l'expression d'autres protéines a été analysée comme précédemment décrit.

Tableau 10: Liste des anticorps primaires utilisés (WB: western blot; IF: Immunofluorescence).

Anticorps primaires					
Cibles	Masses moléculaires (kDa)	Dilutions WB (ou IF)	Production	Références	Anticorps secondaires
49 kDa	49	1/500	lapin	Fait maison	2
53BP1	214	1/2000 (1/250)	lapin	Novus 100-304	2,4
ATP5a	54	1/1000	souris	abcam ab110411	1
UQCR2	48				
SDHB	29				
COXII	22				
NDUFB8	18				
γH2AX	17	1/500 (1/250)	souris	Millipore 05-636-I	1,3
H3	17	1/2000	souris	abcam ab10799	1
LC3	17/19	1/2000	lapin	abcam ab48394	2
Parp	89	1/1000	souris	abcam ab110315	1
PDH	44	1/2000	souris	abcam ab110332	1
PGC1α	105	1/1000	lapin	abcam ab54481	2
Rieske	26	1/10000	lapin	Don (C. Godinot)	2
Tubuline	55	1/2000	lapin	abcam ab6046	2

Tableau 11: Liste des anticorps secondaires utilisés.

Anticorps secondaires			
Numéros	Types	Dilutions	Références
1	Lapin (HRP) anti-souris	1/10000	Sigma Aldrich A9044
2	Chèvre (HRP) anti-lapin	1/10000	Abliance BL2407
3	Chèvre (Alexa Fluor 488) anti-souris IgG3	1/1000	Molecular Probes A21151
4	Chèvre (Alexa Fluor 555) anti-lapin IgG3	1/1000	Molecular Probes A11034

VI. Analyses statistiques

Les résultats représentent la moyenne +/- SEM (Standard Error of the Mean) d'au moins trois expériences indépendantes. Les données ont été analysées statistiquement à l'aide du logiciel Xlstat (Addinsoft) en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi ou non de la correction de Bonferroni. Les comparaisons multiples par paires ont été effectuées par les tests de Dunn ou de Conover-Iman; $p < 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif.

RÉSULTATS

I. Caractérisation du carbène

A. Détermination de l'IC₅₀

L'étude plus précise du potentiel radiosensibilisateur du carbène nécessite un prérequis qui consiste à déterminer la cytotoxicité intrinsèque de ce composé synthétisé sur le site clermontois au sein de l'ICCF d'après le protocole décrit par Hickey et ses collaborateurs (Hickey et al., 2008). Ce paramètre n'ayant été jamais déterminé sur des lignées prostatiques, dans un premier temps, afin de déterminer la toxicité éventuelle du carbène sur les lignées cellulaires LNCaP et PC3, la concentration inhibitrice médiane, c'est-à-dire, l'IC₅₀ a été déterminée par test MTT. Il s'agit de la concentration en carbène nécessaire pour inhiber à moitié une fonction biologique ou biochimique et, plus exactement ici, l'activité métabolique cellulaire donc, indirectement, la viabilité des cellules. Celle-ci est estimée via l'activité de la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale dont l'activité sera le reflet du nombre de cellules vivantes (Kumar et al., 2018). Les cellules ont été mises en contact avec des concentrations croissantes de carbène (10^{-9} à 2×10^{-5} M) et la viabilité cellulaire a été analysée par dosage MTT au bout de 48 heures. Le carbène testé sera désigné FC-IX-19 dans la suite du manuscrit. Un tracé caractéristique est présenté dans la **figure 55**.

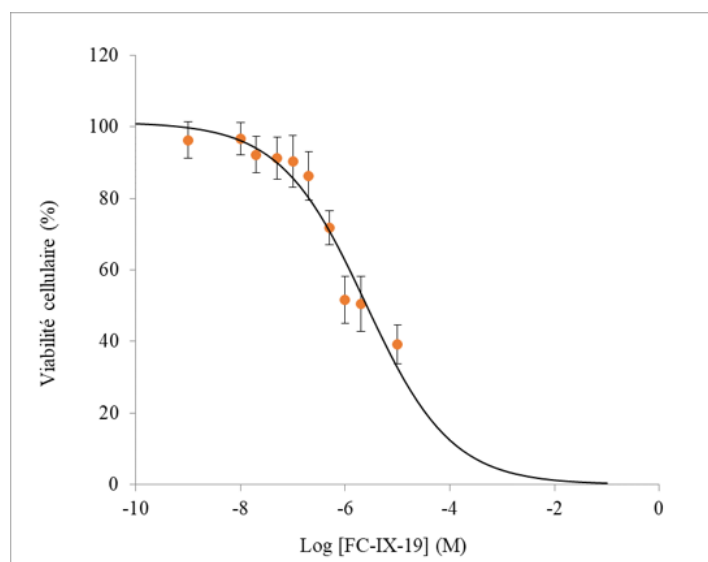


Figure 55: Détermination de l'IC₅₀ sur la lignée LNCaP (n=4).

24h après ensemencement, les cellules sont incubées 48h en présence de concentrations croissantes de carbène FC-IX-19. La viabilité, exprimée en % (moyenne +/- SEM), est déterminée par un test MTT et correspond au rapport entre la DO des cellules traitées et la DO du témoin DMSO.

Les données obtenues (**Tableau 12**) montrent une IC_{50} de 2,4 μ M pour la lignée cellulaire LNCaP et une IC_{50} de 4 μ M pour la lignée PC3. Ces valeurs restent similaires (μ M) même si nous pouvons en déduire que les cellules LNCaP semblent plus sensibles au carbène par rapport aux cellules PC3. De plus, elles concordent avec des valeurs issues de la littérature, notamment dans des études où ont été utilisés des carbènes d'or, de titane ou d'iridium ou des nanoparticules d'or sur divers types de lignées cellulaires cancéreuses dont les cellules PC3 et LNCaP (de Oliveira et al., 2013; Li et al., 2015; Massard et al., 2018; Mui et al., 2016; Rahman et al., 2009; Sun et al., 2016). Le carbène FC-IX-19 possède ainsi une activité cytotoxique, contrairement à certains types de carbènes (Zhang et al., 2018) et nanoparticules (Kong et al., 2008).

Cette première analyse montre ainsi la capacité du carbène FC-IX-19 à inhiber l'activité métabolique cellulaire et donc potentiellement inhiber la croissance cellulaire, avec un comportement différent observé avec les deux lignées cellulaires. Ceci suggère potentiellement des différences dans les mécanismes mis en place dans les deux lignées cellulaires, en lien avec leur statut AR, PTEN et/ou p53. Les effets du carbène sur la croissance cellulaire seront abordés dans le paragraphe suivant par la détermination de la GI_{50} .

Tableau 12: Cytotoxicité du carbène FC-IX-19. Détermination des IC_{50} à 48 heures par test MTT dans les lignées LNCaP et PC3.

FD-IX-19	IC_{50} (μ M)
LNCaP	2,4
PC3	4

B. Détermination de la GI_{50}

Notre première analyse par test MTT nous a permis de mettre en évidence les capacités cytotoxiques du carbène, autrement, sa capacité à diminuer la viabilité des cellules après 48 heures. Nos observations sont la résultante de l'induction de mécanismes de mort cellulaire et/ou d'une incapacité des cellules à se diviser. La potentielle capacité du carbène à inhiber la croissance cellulaire a donc été évaluée par la mesure de la GI_{50} . Il s'agit de la concentration de carbène nécessaire à l'inhibition de 50% de la croissance cellulaire. Elle a été déterminée par un test de clonogénicité, en incubant une faible densité de cellules avec des concentrations croissantes du composé. La lignée cellulaire LNCaP clonant difficilement dans nos conditions

de culture (efficacité de clonage de 4% (données non montrées)), ne seront pas analysées par cette approche. Cette expérience n'a donc été réalisée que sur des cellules de la lignée PC3.

Trois conditions expérimentales ont été mises en œuvre : soit les cellules ont été laissées en contact avec le carbène pendant toute la durée de l'expérience, c'est-à-dire 14 jours, soit le milieu a été changé au bout de 3 ou 24 heures de contact avec le carbène. Le nombre de colonies de plus de 50 cellules a été compté grâce à une coloration au cristal violet. Quatre concentrations de carbènes ont été testées en nous basant sur l'IC₅₀ de la lignée cellulaire PC3 : 0,5 ; 1 ; 2 et 4 μM.

Tableau 13: Analyse par test de clonogénicité de l'effet du carbène sur la croissance cellulaire.

Les cellules ont été incubées en présence de carbène pendant 3h, 24h ou 14J, puis les colonies de plus de 50 cellules ont été comptées au bout de 14J après coloration au cristal violet. Le pourcentage de survie est exprimé par rapport à la condition « DMSO ». Ces résultats sont issus d'au moins 5 répétitions indépendantes.

[FC-IX-19]	0	0,5μM	1μM	2μM	4μM
3h	100 (8)	93,0 (8)	94,74(8)	80,57(8)	73,7 (8)
SEM	0,0	5,4	11,3	16,8	11,1
24h	100,0 (14)	93,5 (14)	81,2 (14)	35,2 (14)	17,8 (14)
SEM	0,0	3,7	5,9	12,0	6,6
14j	100,0 (8)	71,3 (8)	28,4 (8)	0,0 (8)	0,0 (5)
SEM	15,6	9,4	14,8	0,0	0,0

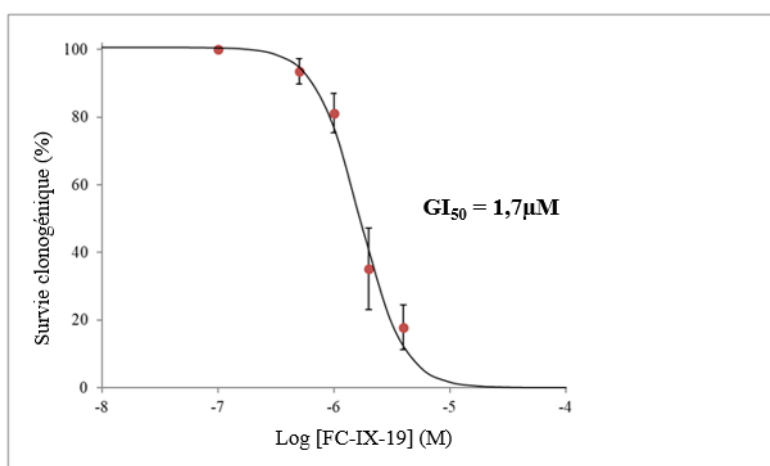


Figure 56: Effet du carbène sur la croissance cellulaire.

Estimation de la GI₅₀ pour les cellules traitées pendant 24 heures au carbène (cf tableau 13). Ces résultats sont issus de 14 répétitions indépendantes.

Les résultats obtenus montrent différents profils selon la durée de contact avec le carbène (**Tableau 13**). En effet, Alors qu'un faible effet (-7% de survie) est observé après 3h et 24h de contact avec 0,5 μ M de carbène, celui-ci est nettement plus marqué après 14 jours avec une chute de 38% environ. Une concentration double n'entraîne aucun effet pour une durée de contact de 3h contrairement à ce qui est observé pour 24h (-19%). Après 14 jours en présence de carbène 1 μ M, l'effet est drastique puisqu'environ $\frac{3}{4}$ des cellules ont perdu la capacité de se diviser. Bien qu'un effet dose-dépendant soit observé lorsque le carbène est maintenu dans le milieu pendant 3h, celui-ci reste faible comparé à celui observé à 24h. Pour cette dernière condition, une courbe effet-dose (**Figure 56**) permet d'estimer la concentration inhibant d'un facteur 2 la survie cellulaire ($GI_{50} = 1,7 \cdot 10^{-6}M$). Enfin, une concentration de carbène de 2 μ M maintenue 14 jours au contact des cellules entraîne l'incapacité de l'ensemble des cellules à se diviser. L'estimation de l' GI_{50} dans ces conditions, plus faible que celui mesuré à 24h, nécessiterait de tester des concentrations en carbène inférieures à 0,5 μ M. Les durées d'incubation appliquées pour la suite des expérimentations étant nettement inférieures à 14 jours, ce paramètre n'a pas été déterminé plus précisément.

Ces résultats montrent l'impact du temps de contact des cellules avec le carbène sur la capacité de division : plus le temps d'incubation est long, plus la croissance cellulaire est rapidement impactée et plus la valeur du GI_{50} est faible. Le carbène utilisé possède ainsi des capacités cytostatiques marquées sur les cellules PC3. De plus, les valeurs obtenues sont très similaires de celles retrouvées dans la littérature avec des carbènes-or sur la lignée cellulaire PC3 (Zhang et al., 2018). Il faut toutefois noter que ces valeurs sont corrélées au statut lipophile de la molécule de carbène et varient pour les PC3 entre 30nM et 1,44 μ M.

Dans notre contexte, l'objectif étant d'associer le carbène à des irradiations afin d'estimer leur capacité radiosensibilisatrices, des doses équivalentes mais aussi inférieures aux IC_{50} et donc de faible cytotoxicité, seront testées.

C. Mise en évidence de l'internalisation du carbène et de sa distribution subcellulaire

Dans le contexte de nos travaux, un potentiel effet radiosensibilisant du carbène, par ciblage mitochondrial, implique, à minima, que le carbène soit internalisé par la cellule et qu'il

s'accumule dans le compartiment mitochondrial. Contrairement aux nanoparticules, la visualisation *in situ* de ce composé étant impossible à cause de sa taille et de son absence de coloration ou de fluorescence, la quantification de l'or intracellulaire et sub-cellulaire a été réalisée par ICPMS après une mise en contact des cellules avec le carbène sur une durée de 3 heures. Cette expérimentation a été réalisée sur les deux lignées cellulaires en utilisant une concentration de carbènes de 0,5 μ M, soit 4,8 à 8 fois moins que les IC₅₀ respectifs des lignées LNCaP et PC3, afin de limiter la cytotoxicité du carbène, mais également, afin de nous permettre une meilleure sensibilité de l'appareil utilisé. Les cellules collectées après traitement sont soit directement dissoutes dans l'acide, soit soumises à un fractionnement cellulaire avant le dosage.

Le résultat présenté dans les **figures 57 A et B** révèle la présence d'or dans les deux lignées après une incubation de 3h en présence de 0,5 μ M de FC-IX-19. Aucun signal n'est observé dans les cellules non traitées au carbène.

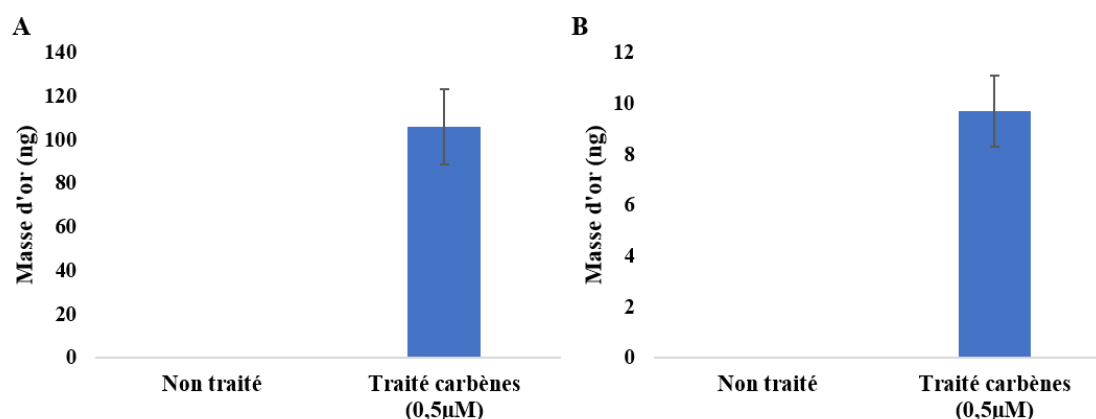


Figure 57: Analyse par ICPMS de l'accumulation de l'or par les cellules LNCaP et PC3.

A: Quantification l'or dans les cellules LNCaP (moyenne +/- SEM ; n=3); B: Quantification de l'or dans les cellules PC3 (moyenne +/- SEM ; n=3).

Les deux lignées cellulaires accumulent l'or. Toutefois, les données bien que différentes d'une lignée à l'autre – nous pourrions penser que les cellules LNCaP internalisent plus l'or que les cellules PC3 - ne peuvent pas être comparées puisque les conditions d'ensemencement, de croissance et de culture sont différentes pour les deux lignées : en outre, les expériences ont été faites sur des quantités différentes de cellules des deux lignées.

Un fractionnement cellulaire après un traitement de 3 heures au carbène a permis d'obtenir trois fractions subcellulaires (cytosol, mitochondries et noyau). La pureté des fractions a été validée par des analyses de western blot (**Figure 58**).

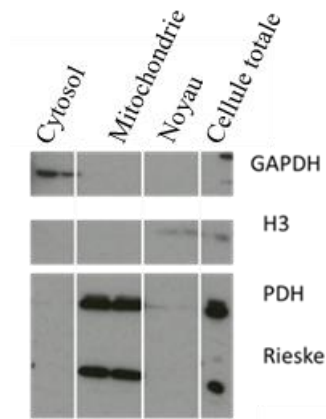


Figure 58: Analyse de la pureté des fractions subcellulaires ; n=3.

Ces 3 fractions ont été soumises au dosage ICPMS et la répartition de l'or dans les 3 compartiments collectés a été calculée. L'or est principalement retrouvé dans le compartiment mitochondrial (environ 65% dans la lignée LNCaP et 73% dans la lignée PC3) (**Figure 59**). La proportion d'or à l'intérieur du compartiment mitochondrial est très similaire d'une expérience à une autre et ceci quel que soit le type cellulaire considéré.

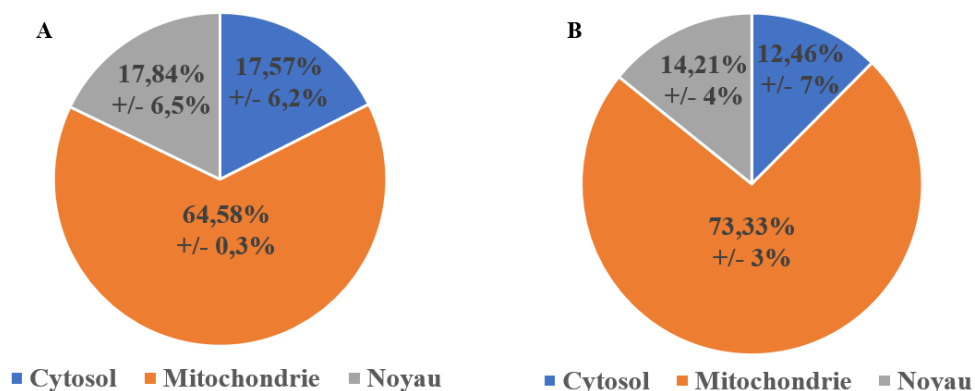


Figure 59: Analyse par ICPMS de la répartition subcellulaire de l'or.

A : Répartition subcellulaire de la masse d'or dans les cellules LNCaP (moyenne +/- SEM ; n=3); B: Répartition subcellulaire de la masse d'or dans les cellules PC3 (moyenne +/- SEM ; n=3).

Cette localisation mitochondriale du carbène est prévisible compte tenu de sa charge et de ses propriétés lipophiles. De plus, une interaction des carbènes avec des sélénoprotéines comme la thioredoxine réductase mitochondriale a été démontrée dans plusieurs études (Holenya et al., 2014; Zhang et al., 2019; Zou et al., 2018). C'est l'exemple de l'auranofin, un composé organo-métallique contenant de l'or en l'occurrence, et utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde mais possédant également des caractéristiques anticancéreuses. Dans leur étude, Zhang et ses collaborateurs ont montré que la cytotoxicité de ce composé, passant par l'inhibition de l'activité mitochondriale et l'induction de stress oxydant serait une conséquence de sa liaison à TrxR (Zhang et al., 2019). Cette enzyme existe sous une forme cytosolique (TrxR1) et mitochondriale (TrxR2). Elles jouent un rôle important dans les systèmes antioxydant et la régulation rédox de la cellule (Arner & Holmgren, 2000; Rackham et al., 2011).

La présence d'or dans les autres compartiments (cytosol et noyau), dans des proportions similaires, peut s'expliquer de plusieurs façons :

- la purification n'est pas efficace à 100%
- l'adressage mitochondrial n'est pas total d'autant plus qu'il y a une notion de temps de rétention dans chaque compartiment
- la cible mitochondriale TrxR2 existe également sous forme cytosolique: TrxR1, qui pourrait aussi se complexer avec carbène

La littérature fait état d'expériences similaires réalisées sur différentes lignées cancéreuses dont celles de la prostate, en se servant de carbènes-or ou iridium. De la même manière, ces métaux ont été retrouvés dans les cellules avec une localisation marquée dans le compartiment mitochondrial après des temps de contact variant entre 15 minutes et 24 heures (M. Ouyang et al., 2017; Xiong et al., 2016). D'autres études ont également mis en évidence une distribution cytoplasmique et mitochondriale de différents types de carbènes dans des cellules PC3 (Gautier & Cisnetti, 2012; Visbal et al., 2016). Le ciblage mitochondrial a été également réalisé dans des études utilisant des nanoparticules d'or ou de gadolinium, sur des lignées cellulaires de cancer du sein, de glioblastomes, ou encore de la prostate (Morrison et al., 2014).

II. Réponses cellulaires de la combinaison du carbène aux irradiations

Le composé FC-IX-19 est bien internalisé par les deux lignées cellulaires. Sa cytotoxicité a été également démontrée dans les deux lignées, et ses capacités cytostatiques a été mise en évidence dans la lignée cellulaire PC3 avec la détermination du GI_{50} après 24h de contact. Toutefois, nous avons pu observer qu'à faible concentration (0,5 μ M), ces effets restent limités avec une viabilité (test MTT) de, respectivement, 71% et 96% à 48h pour les LNCaP et PC3 et une survie cellulaire (clonogénicité) de 71% à 14 jours pour les cellules PC3.

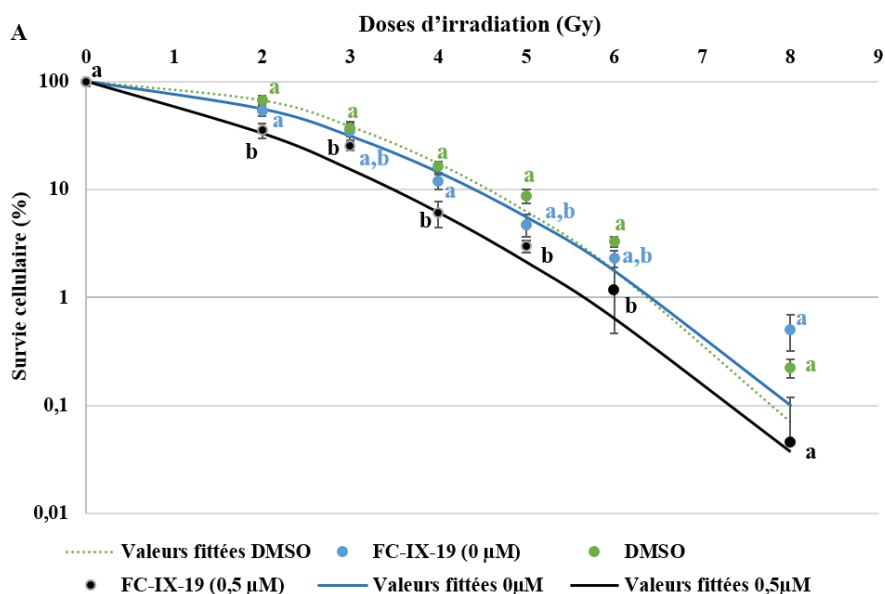
Les effets des irradiations sur la viabilité et la prolifération cellulaires ont été décrits dans la littérature. Cependant, la combinaison de ce composé aux irradiations X sur des cellules de la lignée PC3 est une approche originale. Nous nous sommes donc maintenant intéressés aux effets des irradiations lorsque celles-ci sont réalisées sur des cellules ayant internalisé le carbène-or afin de, rappelons-le, mettre en évidence une éventuelle contribution du métallobcarbène à une augmentation du dépôt de dose consécutif à l'irradiation. Dans cet objectif, les effets du composé FC-IX-19 et des irradiations ont été analysés d'abord séparément puis en combinaison. Ceci s'est fait à plusieurs niveaux et, selon le type d'analyse, sur des temps allant de 0 à 120 heures post-irradiations. Dans certaines conditions, l'élimination du carbène par changement du milieu immédiatement ou 24h après le traitement aux rayons X, nous a permis d'évaluer l'impact du carbène au moment de l'irradiation. Dans un premier temps, la survie cellulaire a été analysée par des tests complémentaires : la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT et la capacité des cellules à se diviser par des tests de clonogénicité. Ces deux paramètres étant en balance avec la mort cellulaire, dans un second temps, une analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux, nous a permis d'analyser et d'identifier le ou les mécanisme(s) de mort cellulaire mis en jeu et éventuellement modifiés dans nos différentes conditions de traitements. Ces études ont été complétées par l'analyse, par western blot de l'accumulation de certaines protéines impliquées dans différents types de mort cellulaire. Enfin, afin de compléter ces données, les effets du composé et/ou des irradiations sur le cycle cellulaire et l'analyse de dommages à l'ADN ont été effectués.

A. Effets sur la viabilité et la prolifération cellulaires

1. Test de survie clonogénique

Face à la difficulté de clonage des cellules de la lignée LNCaP, comme évoquées précédemment, ce test n'a pu être effectué que sur des cellules PC3. Le traitement par le métallobisphénol A a été combiné à différentes doses d'irradiation selon le protocole décrit précédemment. Les cellules ont été soumises à trois concentrations en carbène (0,5, 2 et 4 μ M) et 6 doses d'irradiation (2, 3, 4, 5, 6 et 8 Gy). Les résultats ont été représentés selon le modèle linéaire quadratique décrit par l'équation précédemment décrit : « $\ln \text{Survie} = -\alpha D - \beta D^2$ ».

Dans la **figure 60, tracé A**, nous observons dans un premier temps que la condition DMSO n'est pas significativement différente de la condition « milieu de culture seul ». En effet, visuellement, les courbes « 0 μ M » et « DMSO » sont très proches, même si les paramètres α et β semblent différents (**Figure 60 B**). L'analyse de nos données montre que le solvant n'a pas d'effet intrinsèque sur la sensibilisation des cellules de la lignée PC3.



B

	α	β	Dose pour 10% de survie (Gy)	Dose pour 50% de survie (Gy)	SF2 (%)	SF4 (%)	SF5 (%)
FC-IX-19 (0 µM)	0,1051	0,0946	4,41	2,21	53,96	11,91	4,76
DMSO	-0,0312	0,1172	4,57	2,57	67,61	16,36	8,74
FC-IX-19 (0,5 µM)	0,4107	0,072	3,48	1,36	35,38	6,11	2,99

C

	2Gy	4 Gy	5Gy
SER	1,9	2,7	2,9

Figure 60: Analyse de la survie clonogénique sur la lignée cellulaire PC3.

Les cellules ont étéensemencées puis traitées avec le carbène et irradiées 3 heures après. Les colonies de plus de 50 cellules sont comptées au bout de 14 jours. Les résultats sont issus d'au moins 4 expériences indépendantes ayant chacune 3 répétitions techniques. A : Les analyses ont été faites verticalement avec un test de Kruskal-Wallis et une correction de Dunn (les données ont été analysées par dose d'irradiation, par exemple: 0µM+2Gy contre DMSO + 2Gy contre 0,5µM + 2Gy) et les différences significatives sont matérialisées par des lettres différentes; $p < 0,05$ (moyenne +/- SEM ; $n=4$ minimum). B: Tableau résumant différents paramètres issus de l'analyse des données. Les paramètres α et β ont été calculés en utilisant l'équation linéaire quadratique $S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$. C: Tableau résumant les SER à 2, 4 et 5Gy calculés par rapport à la condition « DMSO ».

Nous observons sur le tracé de la courbe Survie = f (dose) (**Figure 60, tracé A**) que la présence de 0,5µM du composé FC-IX-19 d'une lors de l'irradiation entraine une augmentation de la pente à l'origine (paramètre α) qui passe de -0,0312 en présence de DMSO seul à 0,4107 avec le carbène (**Figure 60 ; Tableau B**). Rappelons que le paramètre α reflète la contribution des lésions létales d'emblées. Il apparait donc que les dommages qui vont entrainer la mort

immédiate des cellules sont largement augmentés en présence de 0,5 μ M de carbène. Les dommages secondaires, exprimés par le facteur β , sont, quant à eux, faiblement impactés par une variation d'un facteur 1,6 (0,1172 contre 0,072). Cette radiosensibilisation se manifeste par une diminution de la survie cellulaire lorsque les cellules sont irradiées à 2Gy de 68% en présence de DMSO à 35 % en présence du composé FC-IX-19, ce qui correspond à un SER de 1,9. Ce dernier paramètre signifie que le composé augmente l'efficacité des irradiations sur la survie cellulaire et donc la sensibilité des cellules d'un facteur 1,9 (**Figure 60 C**). Cette tendance vers une potentialisation est d'autant plus importante à 4 Gy avec un SER de 2,7. En effet, ce facteur semble augmenter avec les doses croissantes d'irradiation, sans toutefois avoir d'impact sur les effets de la combinaison étant donné que ces doses d'irradiation ont un déjà un fort impact : aucune différence significative n'est observée.

Dans les mêmes conditions, c'est-à-dire, de maintien du carbène dans le milieu, des analyses ont également été réalisées avec des concentrations de 2 et 4 μ M mais aucune colonie n'a été observée à la fin de l'expérimentation, du fait de la cytotoxicité du carbène à ces concentrations.

C'est pourquoi, afin de limiter cet effet et analyser plus finement le processus de radiosensibilisation proprement dit, une nouvelle série d'observations a été réalisée en réduisant l'incubation avec le carbène à 24h post irradiation (soit 24h + 3h = 27h de présence), voire, par la suite, en l'éliminant immédiatement après l'irradiation (soit 3h de présence du carbène) (**Figures 61 et 62**).

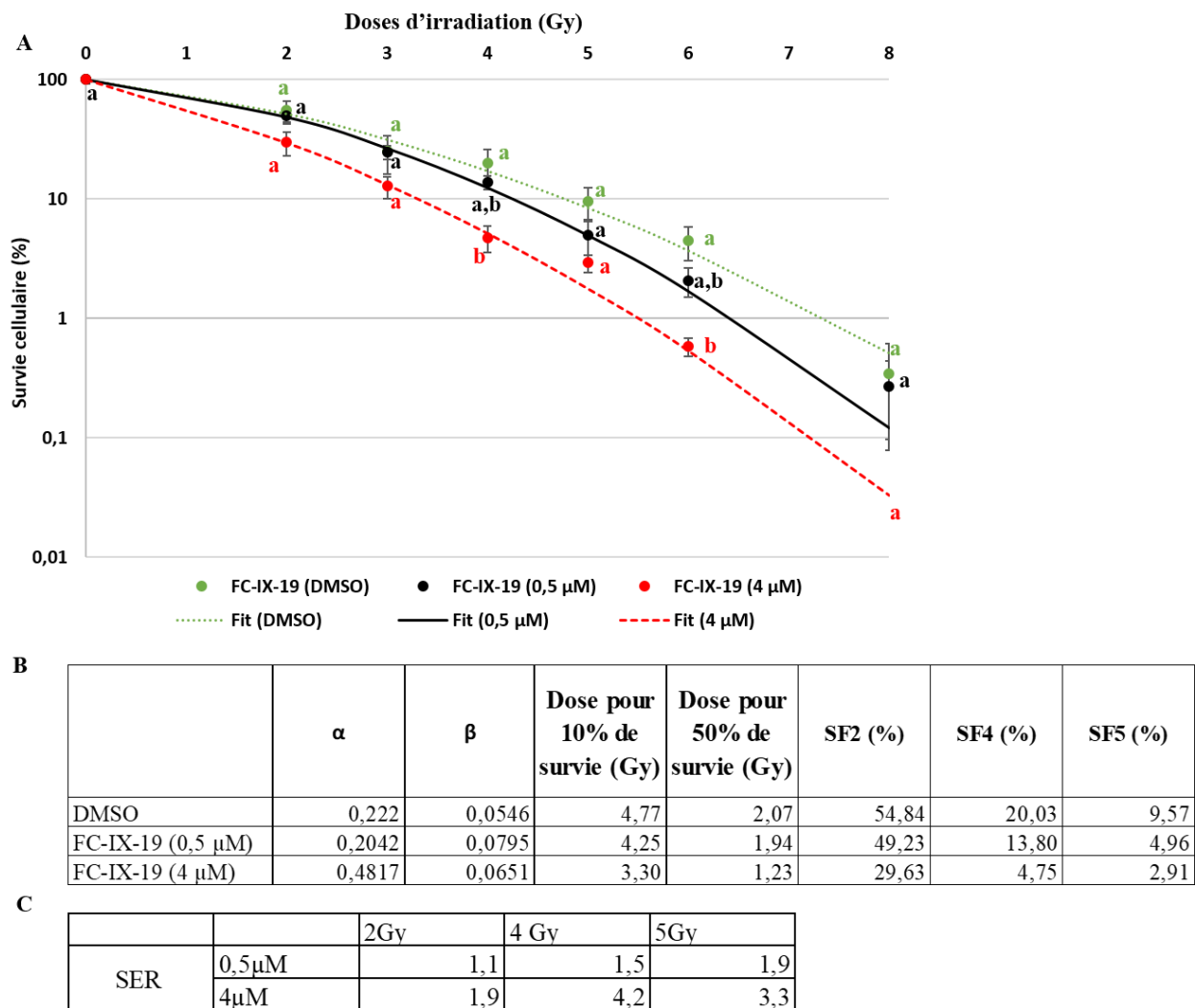


Figure 61: Survie clonogénique sur PC3.

Les cellules ont étéensemencées puis traitées avec le carbène et irradiées 3 heures après. Le milieu de culture a été changé 24 heures après irradiation. Les colonies de plus de 50 cellules sont comptées au bout de 14 jours. Les résultats sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes ayant chacune 3 répétitions techniques. A: Les analyses ont été faites verticalement avec un test de Kruskal-Wallis et une correction de Dunn (les données ont été analysées par dose d'irradiation, par exemple: 0 μ M+2Gy contre DMSO + 2Gy contre 0,5 μ M + 2Gy) et les différences significatives sont matérialisées par des lettres différentes; $p < 0,05$ (moyenne +/- SEM ; $n=3$ minimum). B: Tableau résumant différents paramètres issus de l'analyse des données. Les paramètres α et β ont été calculés en utilisant l'équation linéaire quadratique $S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$. C: Tableau résumant les SER à 2, 4 et 5Gy.

Comme le montre **la figure 61**, lorsque le carbène n'est maintenu que pendant 24 heures après irradiations (soit 27 heures au total), les effets observés à 2Gy se perdent avec la concentration de 0,5 μ M : aucune différence significative n'est observable entre les deux

courbes (0,5 μ M et DMSO). Cela se reflète également au niveau des paramètres α et β par comparaison entre les deux conditions. Les SER sont respectivement de 1,1 ; 1,5 et 1,9 à 2, 4 et 5Gy. Un comportement similaire est observé avec la concentration de 4 μ M sauf aux doses d'irradiation de 4 et 6Gy où on note une différence significative. Ce comportement cellulaire sous-entendrait une implication des carbènes dans le processus de radiosensibilisation. Concernant les paramètres α et β se rapportant aux lésions respectivement létales et sublétales, nous observons qu'à la concentration de 4 μ M, ils sont respectivement de 0,4817 et 0,0651 contre 0,204 et 0,079 à 0,5 μ M. Ainsi, les dommages immédiats sont augmentés en présence de 4 μ M du composé.

L'augmentation du temps de contact avec le carbène de 3h à 27h (voire 14 jours pour la concentration de 0,5 μ M) va de pair avec une augmentation des paramètres α . Cela implique une notion d'augmentation de la sensibilité cellulaire aux irradiations, mais certainement corrélée à la toxicité du carbène qui est soit additive, soit synergique. De plus, le passage de la concentration de carbène à 4 μ M augmente fortement le facteur α , de 0,2042 à 0,4817. Cela signifie clairement que l'incubation avec de fortes concentrations de carbène (IC₅₀) induit des perturbations qui rendront la cellule plus susceptible aux effets des irradiations et surtout aux dommages létaux d'emblée. Il est toutefois essentiel de savoir si la radiosensibilisation des cellules est quand même biaisé par la cytotoxicité du carbène.

À cet effet, nous avons analysé l'influence que peut avoir la durée de présence du carbène sur les différents paramètres. La **figure 62** représente les courbes de survie obtenues après un contact cellules/carbène de 27h et 14 jours mais aussi de 3h et ce, pour des concentrations en carbène de 0,5 μ M (**A**) et 4 μ M (**B**). Les paramètres mesurés correspondant sont présentés, respectivement, dans les **figures 62 C et D**. En comparant les courbes obtenues avec une concentration de 0,5 μ M en maintenant le composé dans le milieu de culture ou en changeant ce dernier tout juste après irradiation ou 24 heures après, nous observons une augmentation des dommages immédiats corrélée à la durée du carbène dans le milieu. Les dommages secondaires, représentés par β n'évoluent quasiment pas (**Figures 62 A et C**). L'impact de la durée de la présence du carbène dans le milieu est surtout observé pour des doses d'irradiation comprises entre 2 et 5Gy ; aucune différence significative n'est observée entre les trois courbes au-delà de 5Gy.

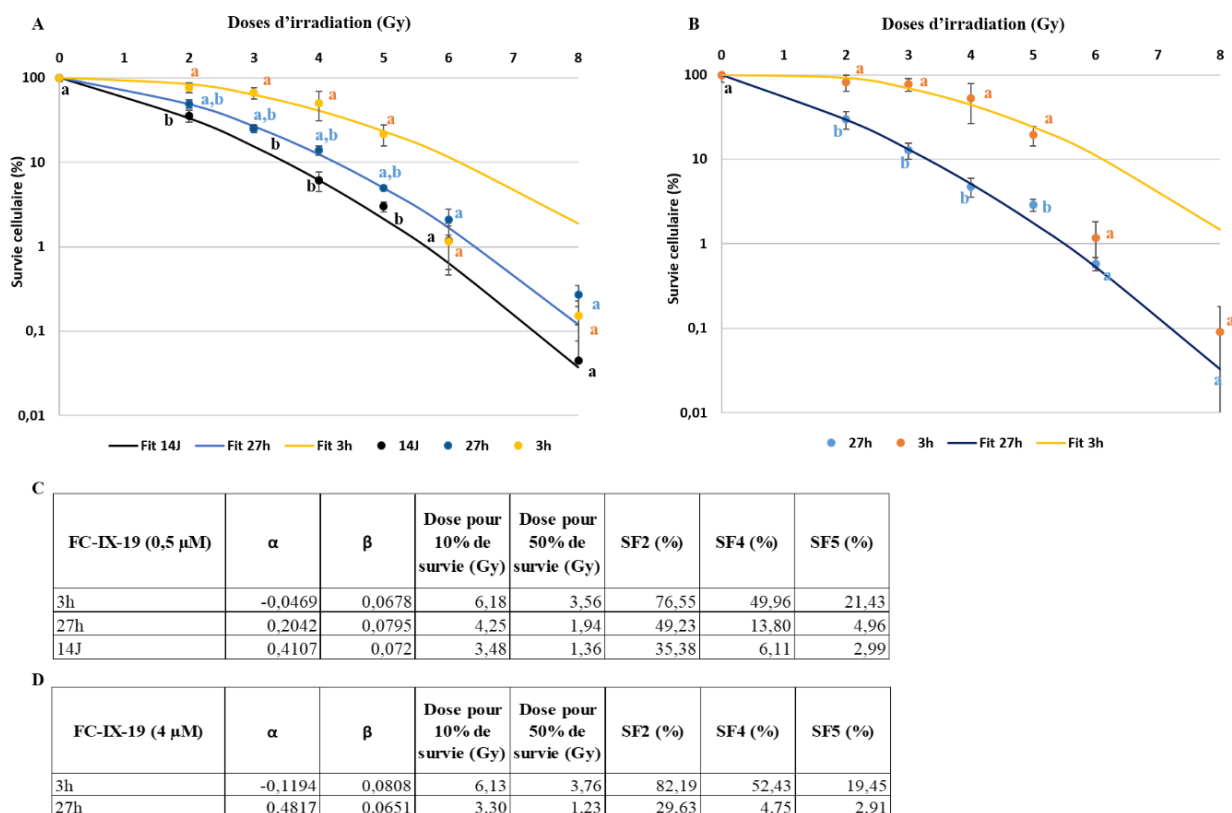


Figure 62: Survie clonogénique sur PC3: effets de la durée du maintien du carbène à 0,5μM (A) ou 4μM (B) dans le milieu de culture sur la survie cellulaire.

Les cellules ont étéensemencées puis traitées avec le carbène et irradiées 3 heures après. Le milieu de culture a été maintenu ou changé 3 ou 27 heures après le carbène. Les colonies de plus de 50 cellules sont comptées au bout de 14 jours. Les résultats sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes ayant chacune 3 répétitions techniques. Les analyses ont été faites verticalement avec un test de Kruskal-Wallis et une correction de Dunn (les données ont été analysées par dose d'irradiation, par exemple: 0,5μM+2Gy (14J) contre 0,5μM+2Gy (27h) contre 0,5μM+2Gy (3h)) et les différences significatives sont matérialisées par des lettres différentes; $p < 0,05$ (moyenne +/- SEM; $n=3$ minimum). C et D: Tableaux résumant différents paramètres issus de l'analyse des données. Les paramètres α et β ont été calculés en utilisant l'équation linéaire quadratique $S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$.

Des observations similaires sont faites avec la concentration de 4μM (**Figures 62 B et D**). En comparant les conditions où le carbène est maintenu pendant 3 et 27 heures (rappelons que la condition 14J n'est pas possible compte tenu de la cytotoxicité du composé), une différence de comportement est observée, matérialisée par une nette augmentation de α et une légère diminution de β . Ce comportement entre les conditions 3 et 27h n'est cependant pas observé avec la concentration de 0,5μM. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le carbène à

très faible concentration (8 fois moins que l'IC₅₀), en ne le maintenant que pendant 3 ou 27h, induirait certes des dommages (augmentation du paramètre α observée), mais ces dommages ne seraient pas irréparables, contrairement aux dommages induits par une concentration supérieure de carbène.

En somme, une radiosensibilisation des cellules est observée avec une concentration de 0,5 μ M, 8 fois inférieure à l'IC₅₀, avec une potentialisation des effets des irradiations d'un facteur 1,9. Dans leur études, l'utilisation de nanoparticules d'or dans le but de radiosensibiliser différents modèles de cellules humaines (L132 : cellules épithéliales pulmonaires normales, et deux lignées tumorales : DU145 (cellules prostatiques) et MDA-MB-231 (cellules mammaires)), Jain et ses collaborateurs ont montré qu'il n'y avait pas d'augmentation de la sensibilisation des cellules tumorales prostatiques pour des énergies qui sont de l'ordre de 160 keV (similaire à celle de l'irradiateur utilisé pour nos travaux) (Jain et al., 2011). Même si certaines études ne rapportent aucune différence de l'effet radiosensibilisateur des nanoparticules quelle que soit l'énergie des rayonnements ionisants utilisée (keV ou MeV) sur différents types de lignées tumorales, la sensibilisation de lignées prostatiques avec ces types de molécules n'apparaît que pour des énergies de l'ordre de 6 MeV en photons ou en électrons (Butterworth et al., 2012, 2013; Khadem Abolfazli et al., 2015). Même si ces effets sont lignées cellulaires dépendants, puisque la lignée MDA-MB-231 présente un fort SER (1,41) dès 160 keV (Jain et al., 2011), les différences avec nos travaux pourraient s'expliquer par l'utilisation d'un composé organo-métallique ayant une nature biochimique totalement différente de celles des nanoparticules, même si les deux études ont en commun l'utilisation de l'or comme élément à haut Z. De plus, même si les deux études portent sur un modèle cellulaire de tumeur de la prostate, les lignées cellulaires utilisées diffèrent de par leur origine biopsique (métastase cérébrale pour les cellules DU145 et métastase osseuse pour les cellules PC3) mais également par leurs statuts PTEN et p53. Enfin, une autre explication des différences serait la localisation sub-cellulaire de l'or, majoritairement mitochondriale dans notre cas, et lysosomale dans l'étude de Jain et ses collaborateurs. Par ailleurs, nos résultats montrent également un effet intrinsèque au carbène puisque ses potentielles capacités radiosensibilisatrices dépendent de son maintien dans le milieu.

Les effets du carbène sur la division des cellules devraient impacter leur prolifération et survie.

2. Test MTT

Les analyses de clonogénicité ont montré un potentiel effet radiosensibilisant du carbène. Elles restent toutefois limitées par la durée de l'expérience (14j) qui induit de fait des difficultés à analyser les fortes concentrations de carbènes. De plus, les informations fournies permettent de comprendre les effets des carbènes, de l'irradiation, ou de la combinaison après plusieurs cycles de division (entre 6 et 8 cycles). Afin de compléter l'analyse, nous avons poursuivi l'étude sur des durées plus courtes entre 24 et 120h post-irradiation par un test d'activité MTT. Les résultats présentés ici ne porteront que sur la lignée PC3, en effet cette partie de nos expérimentations n'a pas pu être réalisée sur les LNCaP du fait d'un problème récurrent d'adhérence observé avec cette lignée. Par ailleurs, les temps d'analyse s'étalant de 24 à 120 heures et plusieurs concentrations en métallo-carbène et doses d'irradiation ayant été testées, seuls quelques résultats représentatifs seront présentés ici. L'ensemble des résultats sera présenté dans les **annexes 1 à 5**.

Les analyses de nos données nous permettent de confirmer que la présence DMSO (dilué ici au 1/5000ème) n'a pas d'effet sur la viabilité mesurée par le test au MTT, les mesures étant identiques à celles obtenues avec la condition « milieu de culture seul » (données non présentées). Tous nos résultats sont donc exploités avec, comme référence, la condition « DMSO ».

À 0,5 μ M le carbène n'a pas, ou seulement un très faible, effet sur la viabilité et la prolifération des cellules. En effet, que la durée d'incubation soit inférieure (24h) ou supérieure (48h et plus) à celle d'un cycle cellulaire, le résultat est identique au témoin DMSO. Par contre, pour des concentrations 4 ou 8 fois supérieures, un faible effet est observé à 24h, celui-ci n'apparaît cependant significatif, par rapport au DMSO, que pour la concentration la plus élevée. Le métallo-carbène entraînerait donc, à de telles concentrations et sur une courte durée, la mort d'une petite partie des cellules. Au-delà de 24h, l'effet est plus prononcé et clairement significatif. Toutefois, un net « décrochage » entre les 2 concentrations est observé à 96h, avec un effet plus drastique pour la concentration 4 μ M (IC_{50}) : à 2 μ M la viabilité passe de 70% à 50% entre 48 et 120h contre 65% et 19% à 4 μ M. Il semblerait donc qu'à 2 μ M une mort cellulaire soit provoquée mais une grande partie des cellules conserve sa capacité de prolifération (la viabilité se maintient aux alentours de 50% par rapport au témoin), alors qu'à 4 μ M la mort cellulaire, ou tout au moins l'incapacité à proliférer, serait prédominante (la

viabilité diminue d'un facteur 2 en 24h entre 72 et 120h) (**Figure 63**).

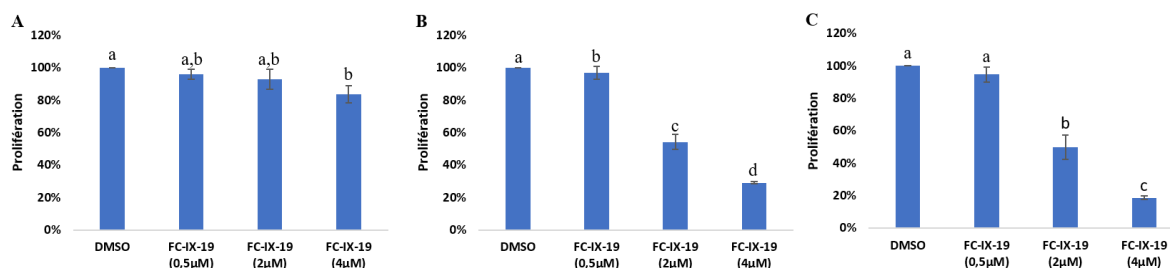


Figure 63: Effets du carbène sur la prolifération cellulaire à 24 (A), 96 (B) et 120 heures (C).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$.

Les capacités antiprolifératives des carbènes ont également été mises en évidence avec des carbènes or, argent, titane, platine ou encore de palladium dans des modèles cellulaires et murins de divers types de cancers dont le cancer de la prostate. Certaines de ces études ont démontré une liaison des carbènes à des sélénoprotéines, ou encore à l'ADN, et une activation de voies de mort cellulaire telles que l'apoptose dépendant de p53, un arrêt du cycle cellulaire ou encore une augmentation des ROS intracellulaires. Par ailleurs, en utilisant l'AFM (Atomic Force Microscopy), certains auteurs ont mis en évidence la liaison de carbènes-platine à l'ADN, induisant des cassures (Harlepp et al., 2019).

Nos résultats montrent que le comportement cellulaire varie fortement en fonction de la concentration du composé. En effet, à $0,5\mu\text{M}$, l'inhibition de la prolifération des cellules est quasiment inexistante par rapport aux deux autres concentrations. Ceci fait penser dans un premier temps à une mise en quiescence des cellules ou à une sélection de cellules résistantes après le traitement au carbène, qui, grâce à la mise en place de mécanismes de réparation, d'activation (voire une suractivation) de voies de survie et de prolifération, parviennent à se multiplier, faisant perdre l'effet observé entre 72 et 96 heures. L'étude de la mort cellulaire et du cycle cellulaire pourrait nous permettre d'avoir un penchant sur ce qui se passe dans les cellules : meurent-elles ? S'arrêtent-elles dans leur cycle ? Contrairement à cette concentration, les concentrations de $2\mu\text{M}$ et $4\mu\text{M}$ ont un effet assez précoce : 48 et 24 heures respectivement. De plus, leurs effets sont maintenus dans le temps. L'impact de ces concentrations serait trop

important pour que les cellules arrivent à survivre. Certes, il pourrait également avoir une sélection de cellules résistantes, mais en plus faible nombre, ne permettant pas d'inverser la tendance, du moins sur nos temps d'étude. Il serait alors intéressant de poursuivre l'analyse de la prolifération au-delà des 120 heures afin d'étudier le comportement des cellules en présence de ces concentrations. De même, l'analyse de voies de survie, de prolifération et de mort cellulaire permettra de compléter cet aspect. Le récepteur aux androgènes jouant un rôle important dans la prolifération des cellules tumorales prostatiques, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences sur des cellules de la lignée LNCaP, qui elles expriment ce récepteur contrairement aux cellules de la lignée PC3.

La figure 64, illustre l'effet des irradiations seules à des doses de 2Gy ou 5Gy sur la survie/prolifération cellulaire de 48 à 120h après l'irradiation. Les 2 doses testées ont un effet sur la prolifération cellulaire. Celui-ci se manifeste plus de 48h après le traitement, en effet, aucune différence significative n'est observée entre 24 et 48 heures et ce, quelle que soit la dose d'irradiation. Les premiers effets sont notés à 72 heures pour les deux doses, avec des intensités similaires : une inhibition de prolifération de 18% et 26 % est observée pour les doses de 2 et 5Gy respectivement. Par la suite (après 72h), l'impact de l'irradiation à 2Gy sur la prolifération cellulaire ne se manifeste plus de façon prononcée : en effet, l'inhibition de la prolifération, de 18%, passe à 13% pour atteindre 21% à 120h. Par contre, une dose de 5Gy n'a pas le même impact, puisqu'une inhibition progressive de la prolifération est observée jusqu'à 120h où elle atteint 50%.

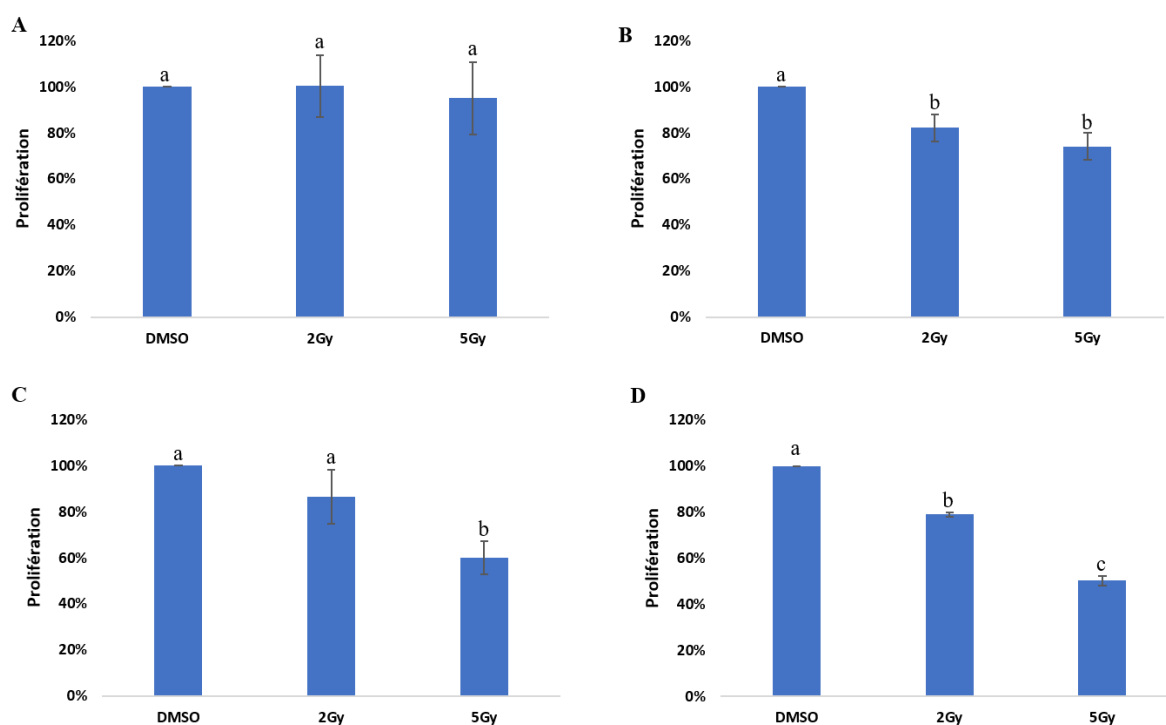


Figure 64: Effets des irradiations sur la prolifération cellulaire à 48 (A), 72 (B), 96 (C) et 120 heures (D).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$.

Dans le cas particulier de l'irradiation, les dommages susceptibles d'être produits sur les biomolécules sont largement documentés et l'ADN figure parmi les sites particulièrement sensibles: des lésions de la molécule d'ADN apparaissent suite à des effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur la molécule (Bienert et al., 2007; Lennicke et al., 2015). La différence de comportement observée dans nos conditions de traitement des cellules PC3 pourrait s'expliquer par le nombre de dommages à l'ADN, non réparables, subits par la cellule : en effet, à 5Gy, la cellule subit plus de dommages à l'ADN qu'à 2Gy (**Tableau 6**). La réparation de ces dommages, dont dépend la reprise de la prolifération cellulaire, plus rapide à 2Gy (parce que générant entre autre moins de dommages) permettrait à une partie des cellules de poursuivre leur cycle cellulaire et de proliférer: c'est ce qui pourrait expliquer l'observation faite à 24 et 48 heures (pas de conséquence sur la prolifération) pour les deux doses et au-delà de 72 heures pour la dose de 2Gy (stabilisation du niveau d'inhibition). La prolifération plus faible observée

à 72 heures serait due à la mort de cellules incapables de réparer ces dommages. À 5Gy, les dommages sont plus importants avec notamment une production plus élevées de ROS, responsables des effets indirects. Or les dommages par effets indirects sont fortement impliqués dans la formation de cassures simple brin (CSB) et double-brins (CDB) et, d'une manière générale, dans les dégâts à l'ADN. Les CDB, plus complexes à restaurer, font partie des lésions les plus délétères pour la cellule, ce qui pourrait expliquer l'impact plus marqué et prolongé observé avec cette dose d'irradiation. Dans ce cadre, il pourrait être intéressant de comparer la production de ROS dans ces 2 conditions d'irradiation pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Plusieurs études ont mis en évidence des mécanismes impliqués dans la mort radio-induite dans différents modèles de cancers : des doses s'étalant entre 0,5 et 60 Gy ont induit une augmentation de la production de ROS, activation de l'apoptose couplée à une perte de potentiel membranaire induisant une baisse de la prolifération cellulaire (De Ruyscher et al., 2019; Li et al., 2014; Mendes et al., 2015). Contrairement à ce qui a pu être observé puis discuté avec le carbène, il est difficile dans le cas des irradiations de proposer une éventuelle corrélation/relation entre la baisse de prolifération et une incapacité des cellules à se diviser. En effet, comme discuté précédemment, les effets des irradiations sont connus et sont multiples. Leurs effets sur la cellule ne se limitent pas aux dégâts causés à l'ADN. L'altération de lipides, de protéines, suite à l'exposition aux rayonnements peut être également impliquée dans la perturbation du fonctionnement normal des cellules. Dans ce système complexe, c'est la balance entre dégâts et systèmes de réparation et de défense qui va conditionner la survie et la croissance cellulaires. Dans ce contexte, une expérience d'immunofluorescence, avec une analyse de foci γ H2AX et 53BP1 pourrait nous apporter une information permettant d'étayer cette hypothèse. De même, une analyse du cycle cellulaire, permettrait de compléter ces données en donnant l'état des cellules dans leur cycle : comment, à quelle vitesse prolifèrent-elles ? Sont-elles arrêtées dans une phase du cycle ?

Chaque type de traitement ayant été étudié de manière indépendante nous allons maintenant analyser les effets du double traitement sur la prolifération cellulaire. Comme précédemment, lors du test de clonogénicité, les cellules sont traitées par une concentration donnée de carbène (**0,5 μ M : figure 65, 2 μ M : figure 66 et 4 μ M : figure 67**) puis soumises, 3 heures plus tard, à une irradiation à 2 ou 5Gy. La prolifération cellulaire est mesurée toutes les 24h pendant 120h. Le but étant d'analyser la potentialisation ou non des effets des

irradiations par le carbène, nous comparerons les conditions où les cellules sont seulement irradiées aux conditions où elles sont traitées avec le carbène puis irradiées, tout en prenant en compte les effets du carbène seul. Seuls quelques temps seront montrés dans cette partie. L'ensemble des figures est présenté dans les **annexes** 3 à 5.

La **figure 65** présente les résultats obtenus après 48, 72, 96 et 120h avec la concentration la plus faible du métallo-carbène. Même si, 72h après les traitements, une différence est observée entre les cellules traitées et non traitées, aucun effet significatif de la combinaison du métallo-carbène avec une irradiation de 2 ou 5Gy n'est constaté de 24 à 96 heures post irradiations. À 120 heures cependant, et uniquement avec une irradiation de 5Gy, une différence significative est observée entre l'effet des irradiations seules et celui de la combinaison du carbène avec le rayonnement ionisant (inhibition de 50% contre 43% respectivement), sachant que le carbène seul n'a, quant à lui, pas d'effet. Toutefois, puisque les irradiations seules ont plus d'effets que la combinaison on parlera, ici, plutôt d'antagonisme (l'effet combiné des deux types de traitement est moins toxique que les effets individuels) et non de potentialisation. Comme suggéré précédemment, une sélection de cellules résistantes pourrait se mettre en place avec la concentration de 0,5 μ M (lui faisant perdre ses effets au-delà de 72h), permettant alors aux cellules de proliférer, même après irradiation.

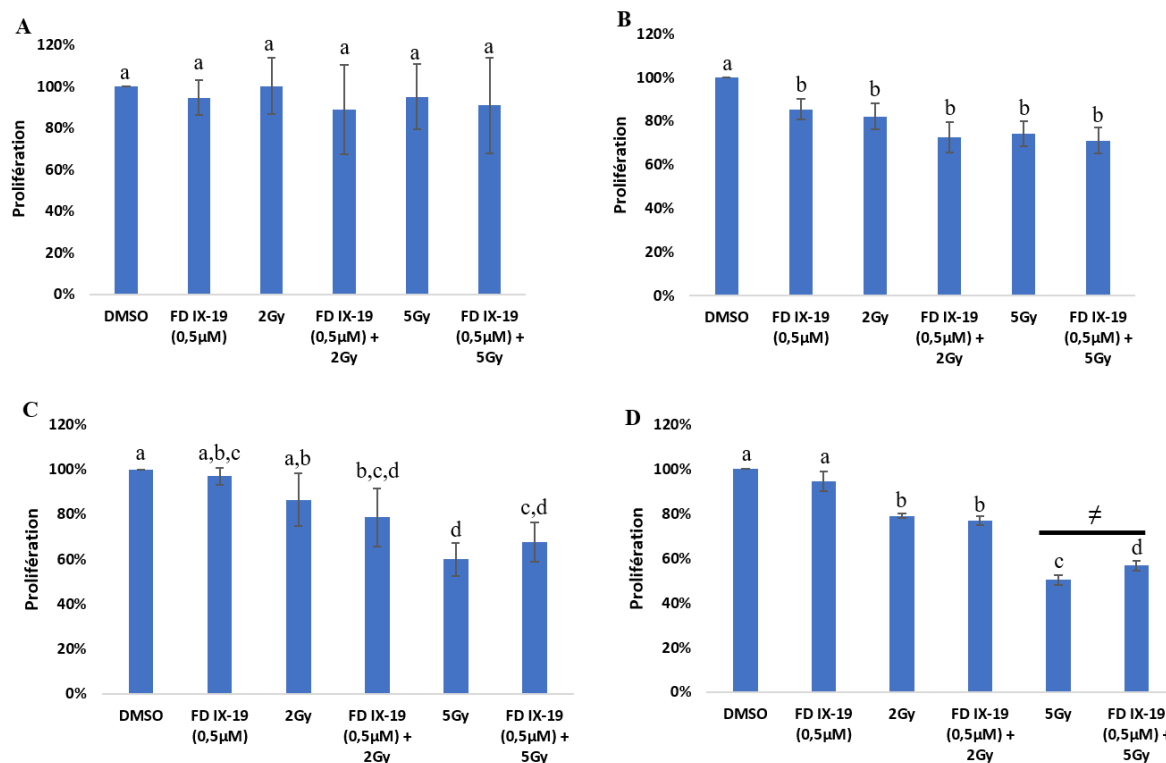


Figure 65: Effets de la combinaison carbène (0,5µM) /irradiations sur la prolifération cellulaire à 48 (A), 72 (B), 96 (C) et 120 heures (D).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$; (≠ représente les situations de potentialisation).

Le profil obtenu avec la concentration de 2µM (**Figure 66**) est différent. Alors que, jusqu'à 48 heures et pour les 2 doses d'irradiation (**graphe A**), aucune différence significative n'est observée entre les effets dus au rayonnement seul et ceux résultant de la combinaison irradiations-carbène, celle-ci devient significative à 72h (**graphe B**). Toutefois, il apparaît clairement que l'effet observé suite au double traitement est principalement dû à la cytotoxicité du carbène, on ne peut donc conclure sur une potentialisation. Cependant, à partir de 96 heures, une différence significative est notée entre le double traitement et le traitement seul -à la fois celui du carbène et celui de l'irradiation-, tout d'abord pour une dose de 5Gy (96h - **graphe C**) puis pour les 2 doses, 2 et 5Gy (120h - **graphe D**). Si le carbène seul a un effet sur la prolifération cellulaire, il n'est, à ces durées, pas similaire à la celui de la combinaison. On pourra alors, dans ces conditions, parler de potentialisation. À 120 heures, il y a certes un effet

du carbène 2 μ M (50%) d'une part et de l'irradiation (50 à 5Gy %) d'autre part, mais la combinaison produit un effet plus fort à la fois à 2Gy (63% de baisse) et à 5Gy (68%).

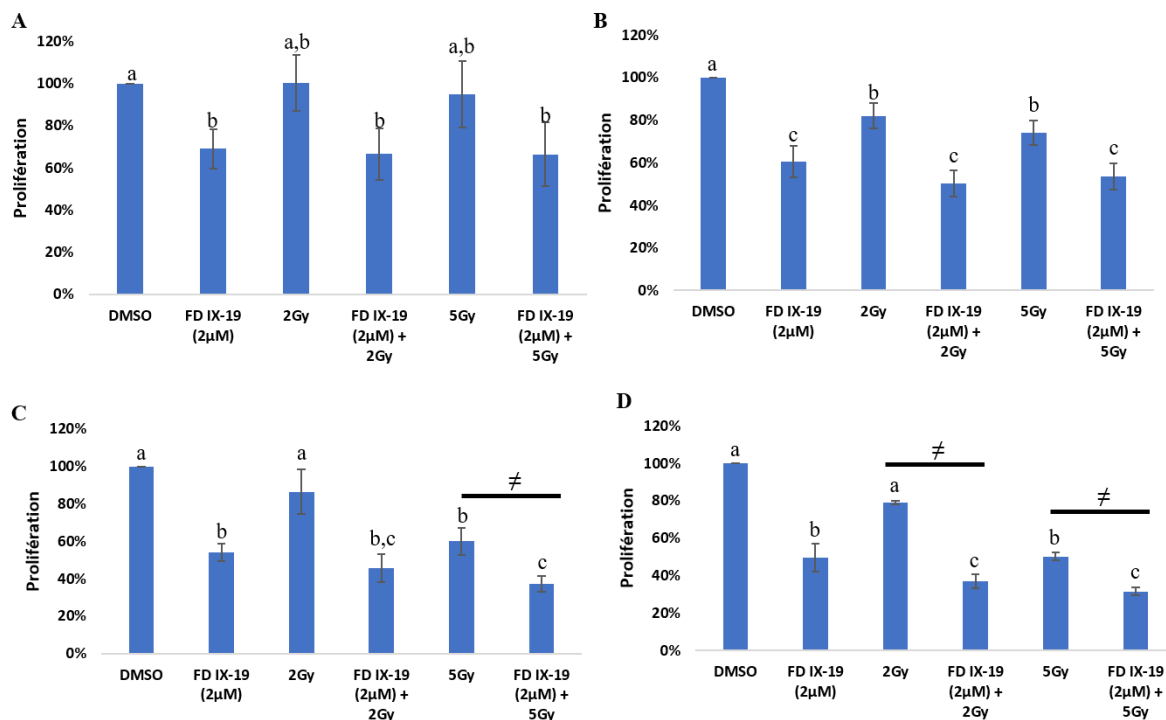


Figure 66: Effets de la combinaison carbène (2 μ M) /irradiations sur la prolifération cellulaire à 48 (A), 72 (B), 96 (C) et 120 heures (D).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$; (\neq représente les situations de potentialisation).

Le profil obtenu avec la concentration de 4 μ M (**Figure 67**) est relativement similaire à celui obtenu avec la concentration de 2 μ M [à la différence près que les effets sont plus précoces]. Comme précédemment, dès 48 heures, on note un effet significatif de la combinaison à 2Gy par rapport à l'irradiation seule (**graphe A – 48h**) mais, cet effet est attribuable à la cytotoxicité du carbène (63% de prolifération dans les 2 cas). La même tendance est observée jusqu'à 96 heures où une différence significative entre le double traitement et, d'une part les irradiations seules (77% contre 13% et 75% contre 40% d'inhibition respectivement à 2 et 5Gy), d'autre part le traitement au carbène seul est observée. Toutefois l'impact du carbène 4 μ M sur la prolifération est tel que la différence de prolifération avec le double traitement, même si elle

est significative, ne permet pas de conclure sur un effet potentialisateur exploitable en radiochimiothérapie. D'ailleurs, cet effet potentialisateur n'est plus observé à 120 heures. Les observations faites ici avec 4 μ M de carbène-or sont tout à fait en accord avec ce qui a été obtenu auparavant ; pour rappel, cette concentration correspond à l'IC₅₀ mesuré pour les cellules PC3 après 48h de traitement et le test de clonogénicité nous a permis de montrer qu'à cette concentration les cellules sont dans l'incapacité de se diviser. Ceci confirme donc que, dans l'objectif d'utiliser le carbène FC-IX-19 comme agent radiosensibilisateur, seules des concentrations 2 à 8 fois inférieures à l'IC₅₀ peuvent être envisagées. Nos résultats seraient en faveur d'un compromis à 2 μ M / 2Gy mais la balance bénéfique/risque est faible avec 42% d'efficacité supplémentaire par rapport à l'irradiation 2Gy seule mais seulement 13% par rapport au carbène seul.

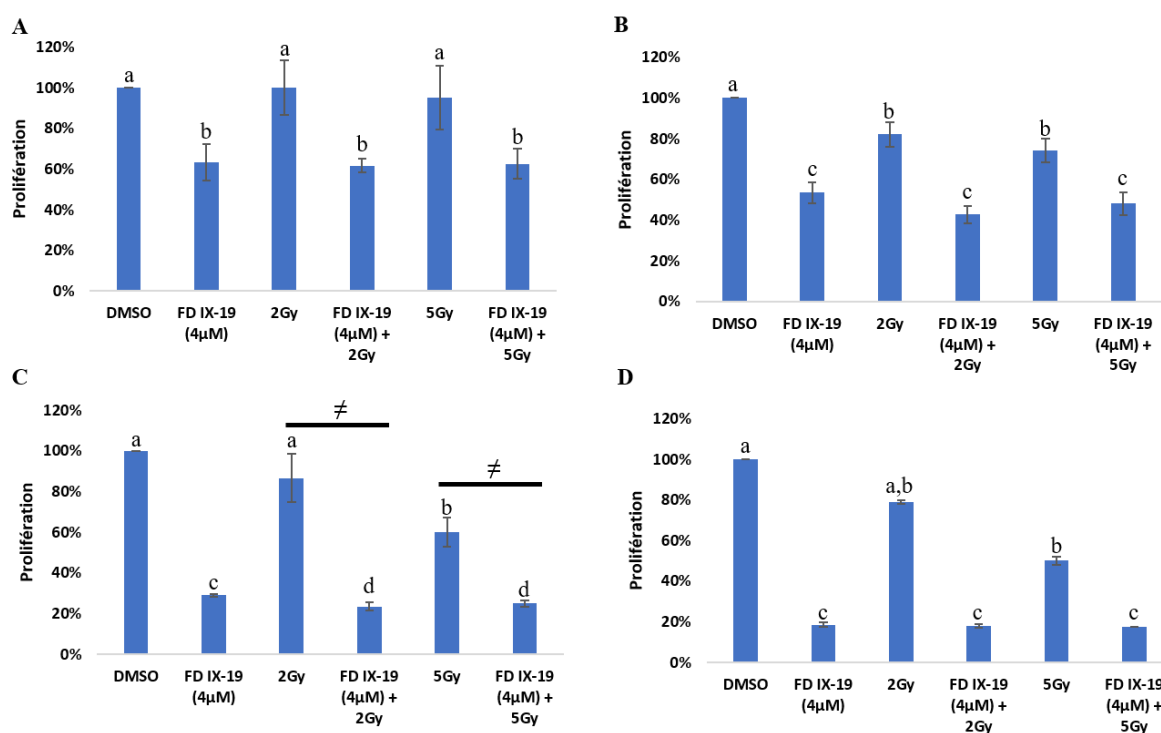


Figure 67: Effets de la combinaison carbène (4 μ M) / irradiations sur la prolifération cellulaire à 48 (A), 72 (B), 96 (C) et 120 heures (D).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$; (\neq représente les situations de potentialisation).

Plusieurs remarques peuvent être faites suite à cette partie de nos travaux. A une concentration de $4\mu\text{M}$, la cytotoxicité du carbène est telle qu'aucun effet potentialisateur, additif ou encore synergique ne peut être observé. À des concentrations inférieures nous avons observé un effet antagoniste à 120h avec la combinaison $0,5\mu\text{M} + 5\text{Gy}$. Ceci suggère, que cette faible concentration, peu cytotoxique, pourrait induire, sur du long terme, une sélection de cellules résistantes aux effets cytotoxiques du carbène et/ou capables d'activer des mécanismes de réparation et de survie leur permettant finalement d'être également radiorésistantes. Ceci pourrait être confirmé par des mesures sur des temps plus longs afin de voir si le taux de prolifération continue à croître. Il est cependant surprenant de ne pas observer cet effet antagoniste avec une irradiation de 2Gy. Par contre à une concentration de $2\mu\text{M}$ le carbène entraîne une diminution progressive de la prolifération qui se manifeste clairement à partir de 48h. Associée à une irradiation de 2Gy, dont l'effet est relativement stable après 72h, l'effet du carbène est un peu plus marqué (significatif à 120h) sans qu'il y ait pour autant un effet additif. Les dommages créés par le carbène ne s'ajouteraient donc pas à ceux dus à l'irradiation mais seraient cependant plus importants lorsque celui-ci est combiné à l'irradiation.

L'originalité de notre projet repose d'une part sur le fait qu'aucune combinaison avec des irradiations n'a été faite avec des carbènes à ce jour. Cependant, plusieurs études montrent des effets radiosensibilisants de nanoparticules d'éléments à haut Z tels que le gadolinium, le cuivre, l'argent ou l'or. Concernant ce dernier, les études réalisées sur des modèles cellulaires et murins abondent et font ressortir un effet potentialisateur de ces nanoparticules quelle que soit l'énergie des particules utilisés (keV ou MeV) pour la plupart des cancers, sauf sur le cancer de la prostate, notamment, des cellules PC3, avec lesquels les effets potentialisateurs n'ont été obtenus qu'avec des photons de 6 MeV (N. Chen et al., 2015; Hainfeld et al., 2008, 2012; Wolfe et al., 2015). Parmi les mécanismes impliqués, l'augmentation de phénomènes apoptotiques est récurrente (pour revue, Her et al., 2017; Paunesku et al., 2015).

B. Effets sur la mort cellulaire

Compte tenu des effets observés sur la prolifération et la survie cellulaire, nous nous sommes intéressés aux effets du carbène et/ou des irradiations sur la mort cellulaire. En effet, il apparait important de réaliser une analyse plus fine des perturbations globales observées lors des expérimentations de survie cellulaire. Dans cette première approche, nous avons constaté

une diminution de la survie cellulaire (test de clonogénicité) avec une baisse de moitié des valeurs de SF2 et un SER de 1,9 en présence de 0,5 μ M de carbène. Cette atteinte de la prolifération peut être la conséquence de différents facteurs dont des modifications des modalités de mort cellulaire. Nous avons donc procédé, dans un premier temps, à une analyse des processus apoptotiques par cytométrie en flux, complétée par une analyse par western blot de l'accumulation d'acteurs impliqués dans la survie cellulaire (Akt) et dans différents types de mort cellulaire (PARP pour l'apoptose, LC3 pour l'autophagie). Les différents protocoles sont décrits dans le Matériels et Méthodes.

1. Analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux

Grâce à l'utilisation de deux marqueurs (IP et annexine V couplée à l'Alexa-Fluor 488), l'analyse par cytométrie en flux nous permet de distinguer 4 populations de cellules : les cellules vivantes (négatives aux deux marqueurs), les cellules en apoptose précoce (positives à l'annexine V et négatives à l'IP), les cellules en apoptose tardive (doublement positives), et enfin, celles en nécrose (positives à l'IP et négatives à l'annexine V) (Crowley et al., 2016). Cette distinction entre apoptose tardive et nécrose résulte du fait que dans certains modèles, la nécrose apparaît comme une étape secondaire suite au déclenchement de l'apoptose (Honda et al., 2000). Nous aborderons dans un premier temps les effets des traitements sur l'évolution de la population des cellules vivantes, puis par la suite des différentes populations de cellules en mort cellulaire. Nous traiterons, comme cela a été fait jusque-là, les effets du carbène seul, des irradiations seules et enfin, de la combinaison. La staurosporine (STS), un inhibiteur de protéines kinases et de la topoisomérase II connu pour sa capacité à induire l'apoptose, sert de contrôle positif. Ces expériences ont été réalisées avec des concentrations de carbène similaires entre les cellules PC3 et LNCaP soit 0,5 μ M, ainsi que, selon la lignée, la concentration correspondant à 50% de l'IC₅₀ et à l'IC₅₀ caractéristique de chacune (soit, respectivement, 2 et 4 μ M pour la lignée PC3 et 1,2 et 2,4 μ M pour la lignée LNCaP). Seuls quelques graphes caractéristiques seront présentés ici. Pour une vue générale des résultats sur les deux lignées cellulaires, se reporter aux **annexes 6 à 15**.

Dans un premier temps, une différence notable est observée entre les deux lignées cellulaires concernant leur réponse au traitement à la STS. En effet, elles ont été toutes deux traitées pendant 4 heures avec 1 μ M de STS pour la lignée LNCaP mais 4 μ M pour la lignée

PC3, aucun effet étant détectable en dessous de 4 μ M pour cette lignée cellulaire. De plus, bien qu'ayant été traitées avec une concentration de STS 4 fois supérieure par rapport aux cellules LNCaP, les cellules PC3 montrent tout de même une moindre activation de la mort cellulaire puisqu'elles présentent une proportion de cellules vivantes supérieures à celle de la lignée LNCaP (**Figures 68 et 69 / STS**). Ce comportement est en accord avec les travaux de qui montrent que les différentes lignées de cellules cancéreuses prostatiques répondent différemment à la staurosporine avec une résistance nettement marquée des cellules PC3 par rapport aux LNCaP et ce, du fait d'un engagement différent dans les voies apoptotiques ou plus globalement, de mort cellulaire (Marcelli et al., 2000).

La **figure 68** illustre l'impact du carbène seul sur les proportions relatives des quatre populations de cellules PC3 3h post traitement (0h) puis toutes les 24h jusqu'à 96h comparativement au témoin positif (STS) et aux témoins sans (0 μ M) et avec DMSO.

Nous pouvons noter dans un premier temps que les conditions « contrôle » présentent des profils très similaires avec environ 95% de cellules non apoptotiques ou nécrotiques. Jusqu'à 48h, la présence de carbène n'a pas d'incidence sur cette population cellulaire et ce n'est qu'à partir de 72h qu'un effet significatif marqué, assez similaire au témoin positif, est visible principalement pour la concentration 4 μ M pour laquelle la population de cellules vivantes diminue au profit de celles en apoptose tardive ainsi que nécrotique, ces deux populations augmentant et devenant majoritaires à 96h. Les observations faites ici, bien qu'étonnantes par rapport à ce qui a été obtenu lors du test de survie/prolifération cellulaire (test au MTT) sur cette lignée, ne sont pas contradictoires. En effet une baisse importante de la prolifération a été observée en présence de 4 μ M mais aussi de 2 μ M de carbène et ce, dès 48h. Ceci peut s'expliquer par le fait que le test de survie s'appuie sur la détection d'une activité métabolique (Kumar et al., 2018) alors que l'analyse réalisée ici met en jeu d'autres processus liés à la membrane cellulaire.

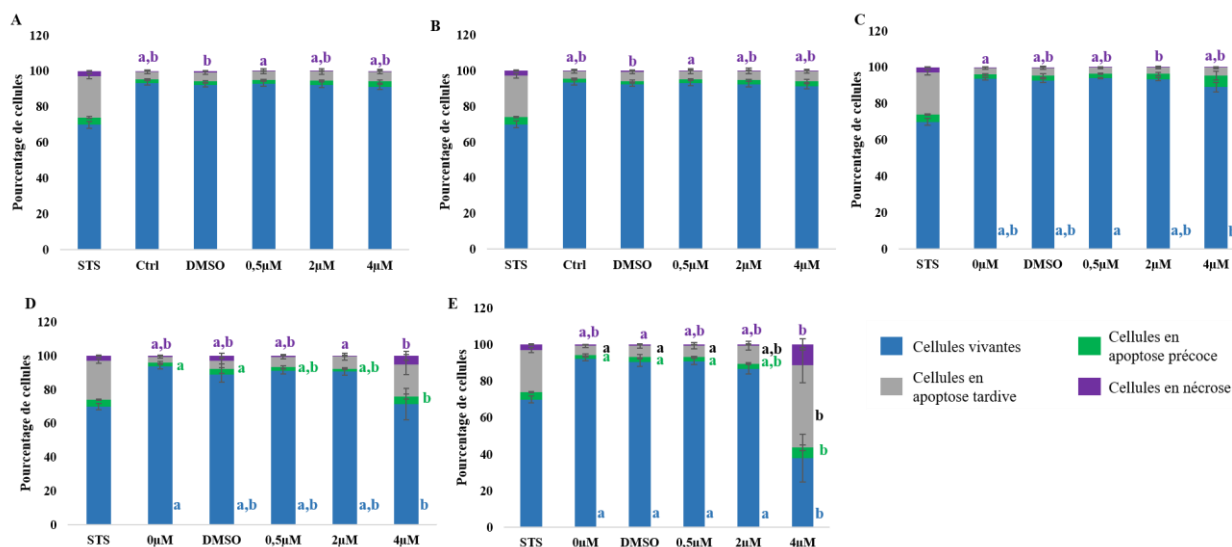


Figure 68: Analyse par cytométrie en flux des effets du carbène sur la mort cellulaire dans les cellules PC3 à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Concernant les cellules LNCaP (**Figure 69**), le comportement global est différent de la lignée PC3, tant vis-à-vis des conditions (témoins et traitements) que des durées (0h à 96h). Comme dit précédemment, le témoin staurosporine lui-même est différent, ce qui est tout à fait en accord. Il n'est donc pas étonnant de constater que les cellules LNCaP ne répondent pas de la même manière au traitement par le carbène. Dès les temps courts, les cellules LNCaP montrent dans les conditions « contrôle » et « DMSO », une proportion non négligeable de cellules est en phase d'apoptose précoce, tardive ou nécrose et des proportions respectives de 57%, 13%, 16%, 14% et 62%, 15%/, 16%, 7% respectivement sont observées à 72h pour ces deux conditions.

Concernant la réponse au carbène de cette lignée cellulaire, elle se distingue de celle observée pour la lignée PC3 dans la mesure où une baisse importante de la population de cellules vivantes s'amorce dès 24h avec la concentration de 2,4µM (42%) pour atteindre à peine 10% à 72h puis 6% à 96h, valeurs très différentes de celles observées avec le témoin positif. Une concentration 2 fois plus faible de carbène entraîne une baisse nettement moins marquée,

la proportion de cellules vivantes restant relativement stable, voisine de celle observée avec la staurosporine, au-delà de 48h. En présence de carbène 2,4 μ M, c'est la population de cellules en phase d'apoptose tardive qui devient progressivement majoritaire.

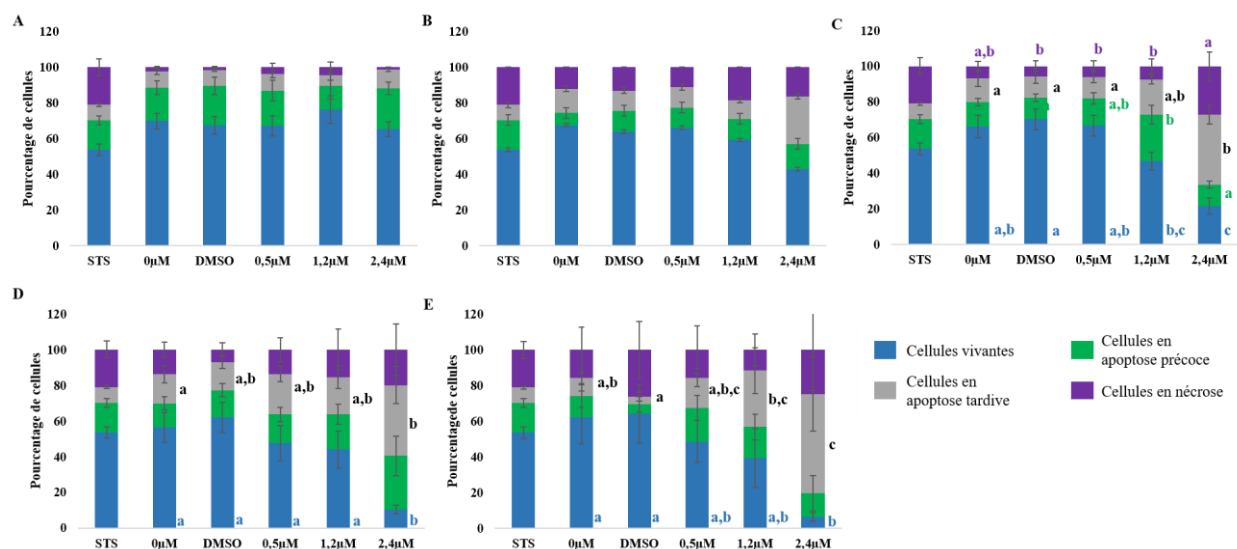


Figure 69: Analyse par cytométrie en flux des effets du carbène sur la mort cellulaire dans les cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Après les effets chimiques, nous analysons les effets des rayonnements sur les deux lignées. L'effet des irradiations 2 et 5Gy (avec ou sans DMSO) sur les cellules PC3 est faible (**Figure 70**). Les premiers effets sont observés à 48 heures, et uniquement avec la dose d'irradiation de 5Gy. La proportion de cellules vivantes est toutefois maintenue élevée (plus de 80%) jusqu'à 96 heures post irradiation. Il est toutefois important de remarquer que la baisse de 20% de la viabilité à 96h avec une dose de 5Gy se rapproche de celle observée lors du test de prolifération au MTT (baisse de 40%), corrélant ainsi nos deux approches.

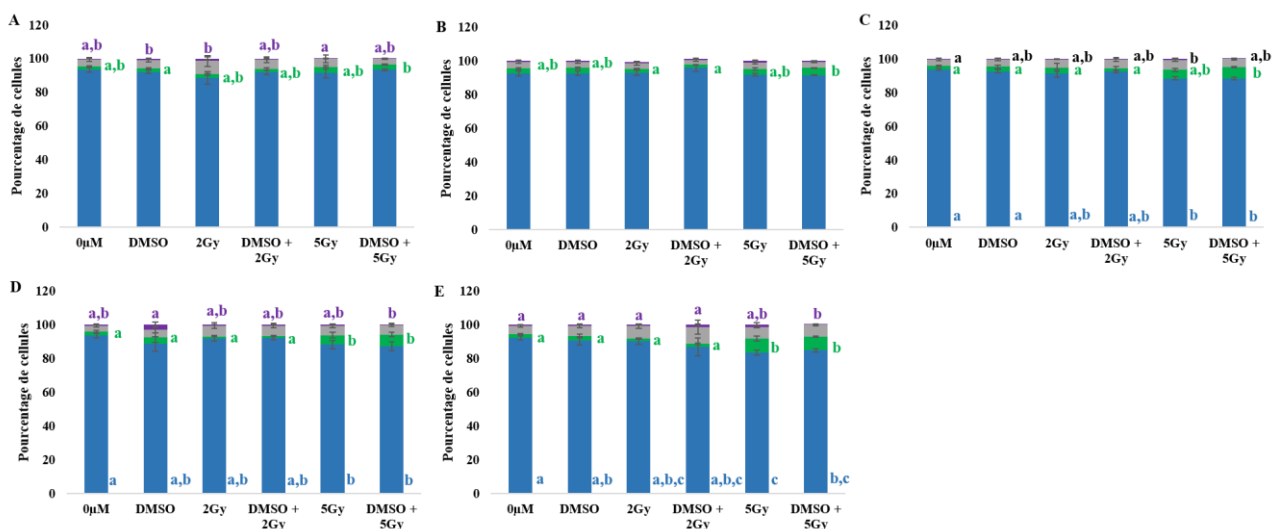


Figure 70: Analyse par cytométrie en flux des effets des irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules PC3 à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Concernant les cellules LNCaP (**Figure 71**), comparativement aux 2 conditions contrôle, un impact des irradiations 2 et 5Gy (avec ou sans DMSO) est observé. Une relative variabilité est cependant observée au cours du temps. Alors que les effets, bien que faibles, soient comparables après 24h, ils deviennent plus marqués pour les conditions 5Gy +/- DMSO après 48h pour finalement rester stables, avec toutefois une augmentation significative de la proportion de cellules en apoptose tardive. À l'inverse, l'effet de l'irradiation à 2Gy, semble s'amplifier au cours du temps, la proportion de cellules vivantes atteignant environ 34 et 44% (2Gy, sans et avec DMSO respectivement) contre 63 et 54% (valeurs proches des contrôles) pour la dose supérieure à 96h.

Finalement, l'analyse des effets de différentes doses d'irradiation (2 et 5Gy) sur les cellules PC3 et LNCaP montre, à l'image de ce qui a été observé avec le carbène seul, que les irradiations ont relativement peu d'impact sur le déclenchement des processus de mort sur les cellules PC3. Aucune modification de la proportion de cellules vivantes n'est vraiment notée jusqu'à 48h post-irradiation. Seule une petite augmentation de la population de cellules en apoptose est visible à partir de 48h pour une dose de 5Gy. Cet effet devient notable, tout en

restant faible, 96h post-irradiation.

Les effets des traitements ayant été analysés de façon individuelle, nous nous intéressons maintenant à leur combinaison. Dans ce cadre, seuls quelques graphes caractéristiques seront présentés ici. Pour une vue générale des résultats sur les deux lignées cellulaires, se reporter aux **annexes 8-10 (PC3) et 13-15 (LNCaP)**.

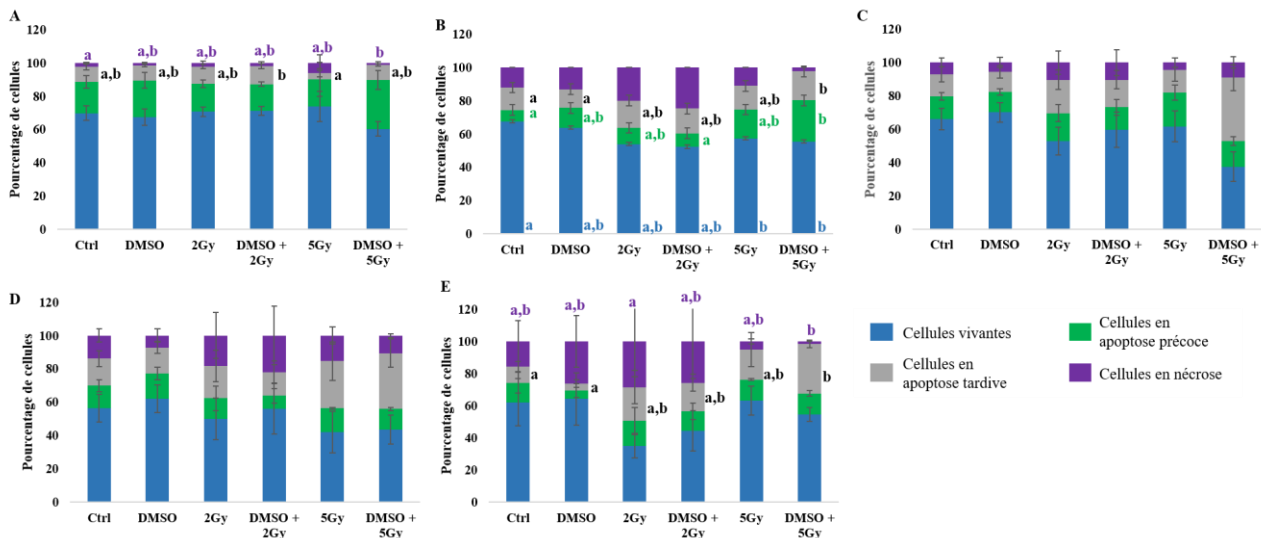


Figure 71: Analyse par cytométrie en flux des effets des irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Pendant les 48h suivant les traitements, aucune différence significative n'est observée sur les cellules de la lignée cellulaire PC3 lorsque l'on compare les effets des traitements individuels avec ceux obtenus lors de leur combinaison. Seule la combinaison carbène 4 μ M associé à une irradiation de 5Gy donne un effet significatif mais seulement 72h après le traitement, effet qui s'amplifie à 96h avec, alors, seulement 3,4% de cellules vivantes, la quasi-totalité des cellules étant en état d'apoptose tardive (**Figure 72**). Ceci est en accord avec ce qui a été observé avec cette concentration lors des tests de clonogénicité où aucune cellule n'apparaissait en mesure de se diviser. L'analyse de l'effet du double traitement sur la prolifération cellulaire ne permettait pas de montrer un éventuel effet potentialisateur du

carbène du fait de la cytotoxicité marquée qu'il exprime lors du test MTT. Nous observons ici, à 72h mais surtout 96h, un fort impact de la combinaison carbène 4 μ M/irradiation 5Gy, supérieur à celui du carbène seul ou de l'irradiation seule mais aussi supérieur à la combinaison des 2 effets ce qui serait alors en faveur d'une synergie conduisant à une potentialisation de l'irradiation par le carbène.

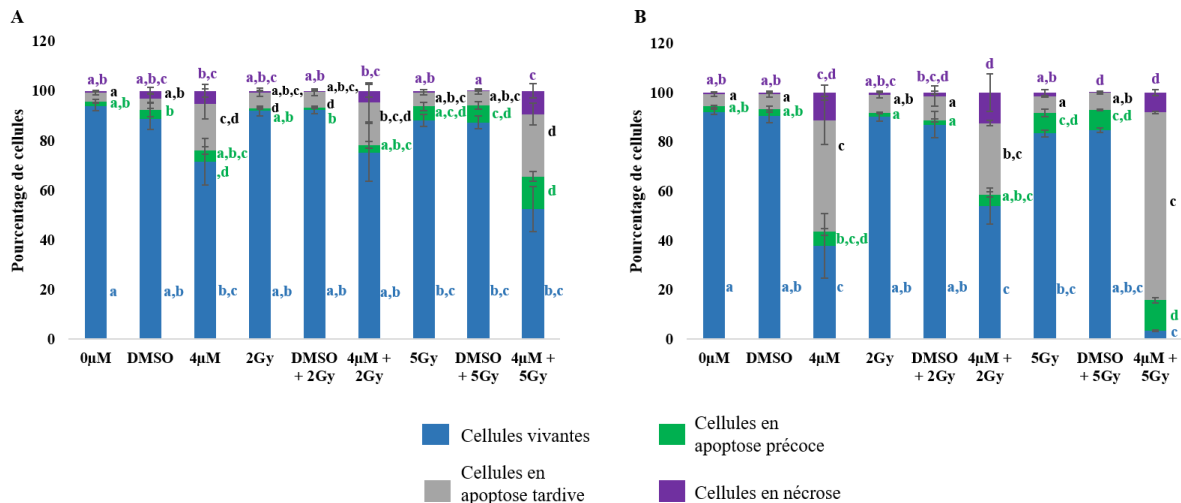


Figure 72: Analyse par cytométrie en flux des effets de la combinaison du carbène à 4 μ M aux irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules PC3 à 72h (A) et 96h (B).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Concernant les cellules LNCaP aucun effet propre à la combinaison des 2 traitements n'est observé lorsque le carbène est peu concentré (0,5 μ M). En effet, aucune différence significative de la proportion de cellules vivantes n'est à noter entre les différentes conditions (témoins, traitements individuels et traitements combinés) (**non présenté**). À 1,2 μ M (**non présenté**) et, de façon plus marquée, à 2,4 μ M (**Figure 73**), le double traitement entraîne un effet plus marqué que les traitements individuels et ce, rapidement après l'irradiation (**temps 0h – encadrés rouges**). Cet effet s'accroît 24h après le double traitement « 2,4 μ M + 5Gy » est en faveur d'une synergie potentialisatrice puisque l'effet du double traitement est nettement supérieur à la combinaison des 2 effets (**encadrés verts**), les cellules passant alors, pour la plupart, en état d'apoptose précoce ou tardive. Cependant, au-delà de cette durée, une éventuelle

amplification de la mort cellulaire, si elle existe, est masquée par l'effet cytotoxique du carbène à cette concentration (**encadrés marron**).

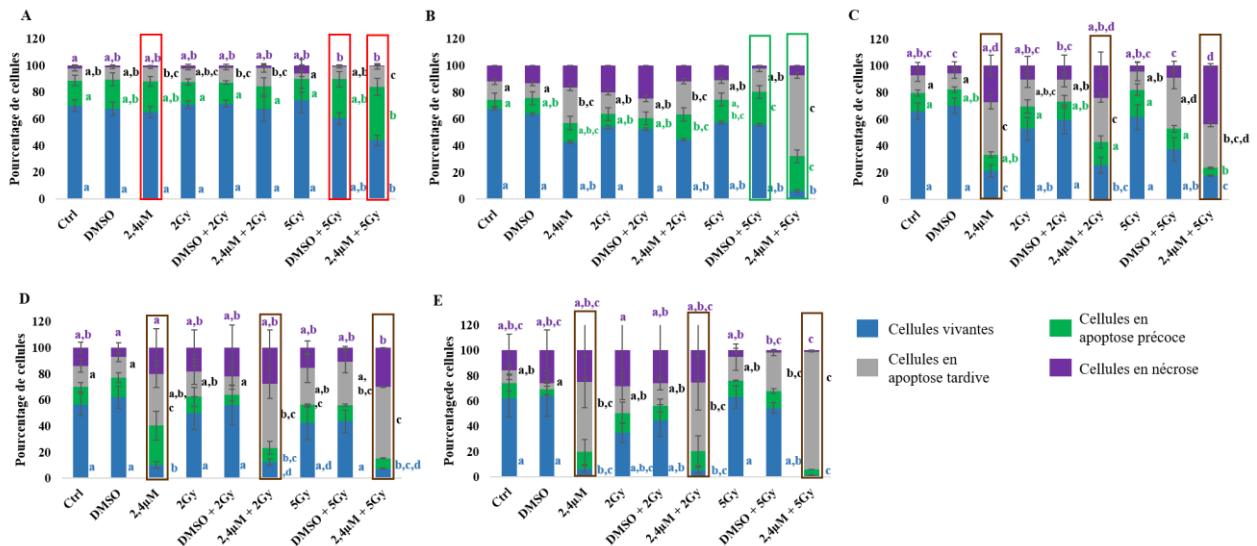


Figure 73: Analyse par cytométrie en flux des effets de la combinaison du carbène à 2,4µM aux irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Après avoir décrit de façon globale le comportement des populations de cellules LNCaP et PC3, en présence de carbène et/ou d'irradiations, nous allons nous concentrer sur les différents processus de mort cellulaire mis en jeu.

Rappelons que l'effet significatif du carbène n'a été observé qu'à 72 et 96 heures post irradiation et uniquement avec la concentration de 4µM sur les cellules de la lignée PC3 (**Figure 68**). La **figure 74** illustrant l'évolution des 3 populations caractéristiques de la mort cellulaire au court du temps révèle, qu'en effet, aucune variation significative des proportions de ces 3 populations n'est observée jusqu'à 48h (les échelles des deux graphes ne sont pas les mêmes). Par contre à partir de 72h une nette augmentation de la population de cellules en apoptose tardive et, dans une moindre mesure à 4µM (**Figure 74 B**), de la population de cellules

nécrotiques, est amorcée. Avec les concentrations 2 μ M (**Figure 74 A**) et 0,5 μ M (**non montrée**), l'augmentation du nombre de cellules en apoptose tardive est observée mais est nettement moins marquée. Il semble donc que, sur les cellules PC3, le carbène tendrait à engager les cellules vers la voie apoptotique de mort cellulaire et, pour une petite partie d'entre elles, vers la voie nécrotique.

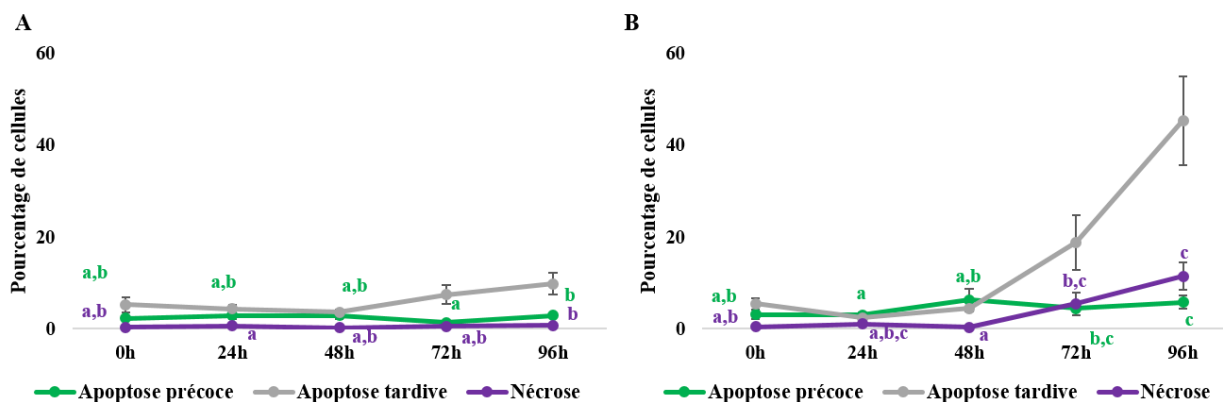


Figure 74: Évolution au cours du temps des proportions relatives des populations de cellules PC3 en apoptose précoce, tardive et nécrose suite au traitement carbène à 2 μ M (A) et 4 μ M (B).

Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Concernant la lignée cellulaire LNCaP, comme déjà mentionné, les cellules semblent assez sensibles à la mort cellulaire puisque dès les temps courts, une proportion non négligeable de cellules présente les caractéristiques de cellules apoptotiques et nécrotiques (**Figure 75**). La baisse des proportions de cellules vivantes observées sur les cellules de la lignée LNCaP suite au traitement par le carbène est corrélée à une augmentation des 2 types de mort cellulaire avec une tendance plus marquée de l'augmentation, au cours du temps, du nombre de cellules en apoptose tardive et ce, pour les concentrations 1,2 μ M et 2,4 μ M. On notera que les cellules de la lignée LNCaP montrent un état basal de nécrose plus marqué que les cellules PC3. La proportion de cellules en état de nécrose fluctue au court du temps et, bien que plus élevé 48h et 72h après traitement comparativement au contrôle DMSO, aucune sensibilité au carbène ne peut être affirmée à partir de ces observations.

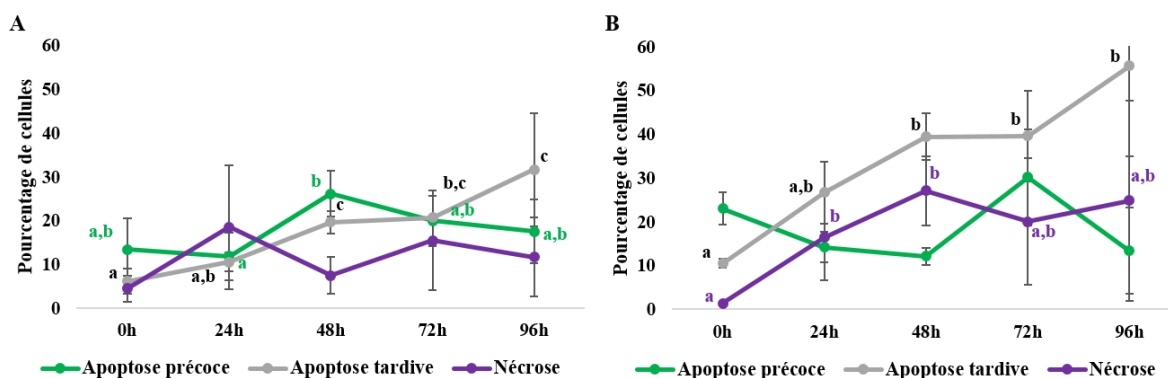


Figure 75: Évolution au cours du temps des proportions relatives des populations de cellules LNCaP en apoptose précoce, tardive et nécrose suite au traitement carbène à 1,2µM (A) et 2,4µM (B).

Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Concernant l'effet des irradiations sur les processus de mort cellulaire nous observons, sur les cellules PC3 (**Figure 76**), qu'une dose de 2Gy entraîne une augmentation progressive de la proportion de cellules en phase d'apoptose tardive par rapport au contrôle DMSO. Une dose de 5Gy quant à elle, est suivie de l'augmentation successive des proportions de cellules en apoptose précoce puis tardive. Ceci pourrait suggérer le passage progressif d'une phase à l'autre. Par ailleurs, aucune variation marquée de la population de cellules nécrotiques n'est observée, ce qui suggère que la mort cellulaire induite par l'irradiation X est, là aussi, principalement de type apoptotique.

Contrairement à ces dernières, les résultats sur la lignée LNCaP (**Figure 77**) montrent une évolution des populations en apoptose précoce et tardive après irradiation 5Gy, la première tendant à diminuer au profit de la seconde ; elles atteignent respectivement environ 15% et 38% à 48h puis restent relativement stables. Ce comportement suggère un passage progressif des cellules d'apoptose précoce à apoptose tardive dans les 48h premières heures post-irradiation 5Gy. Concernant l'état nécrotique, celui-ci est toujours fluctuant au cours du temps et ne permet pas de conclure sur une sensibilité particulière de cette population aux irradiations.

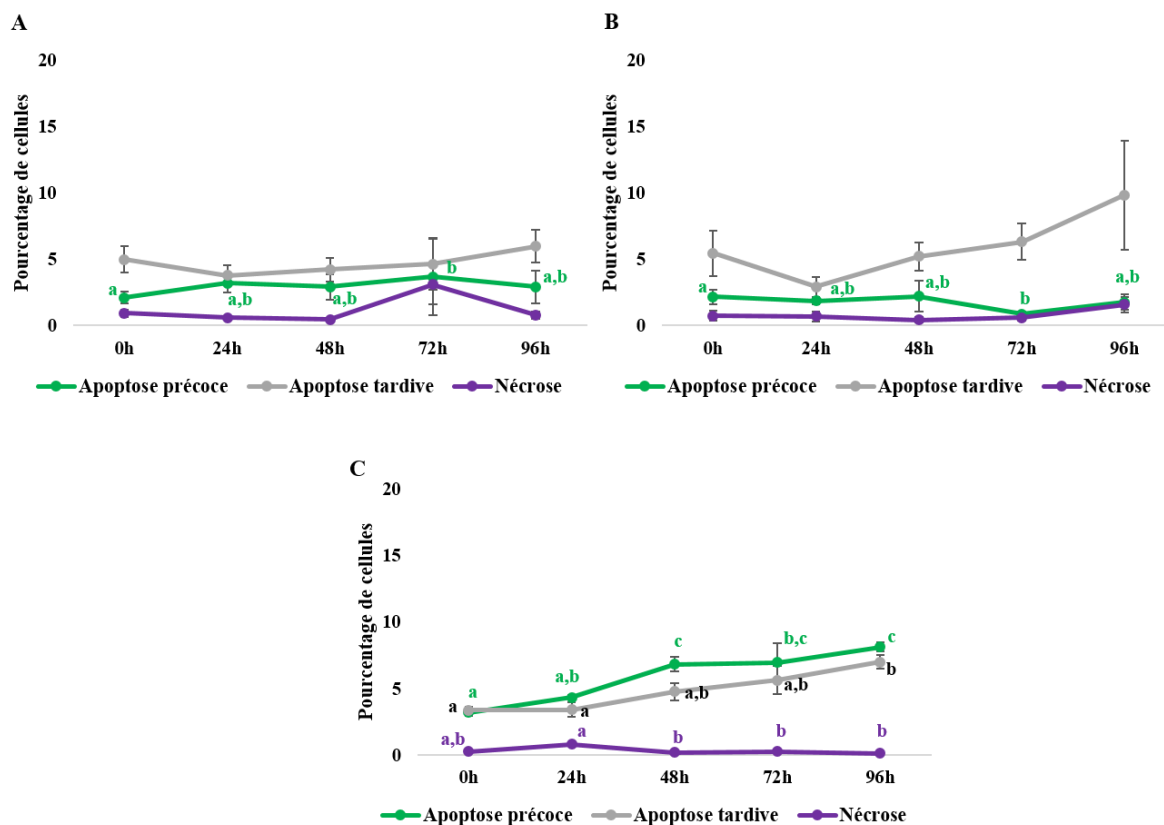


Figure 76: Évolution au cours du temps des proportions relatives des populations de cellules PC3 en apoptose précoce, tardive et nécrose en présence de DMSO (A) ou suite aux irradiations à 2 (B) et 5Gy (C).

Les données (moyenne \pm SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Il apparaît donc que les cellules PC3 et LNCaP répondent à l'irradiation par un engagement des cellules vers les voies apoptotiques de mort cellulaire et qu'une proportion relativement importante mais fluctuante de cellules meurt par nécrose indépendamment du traitement.

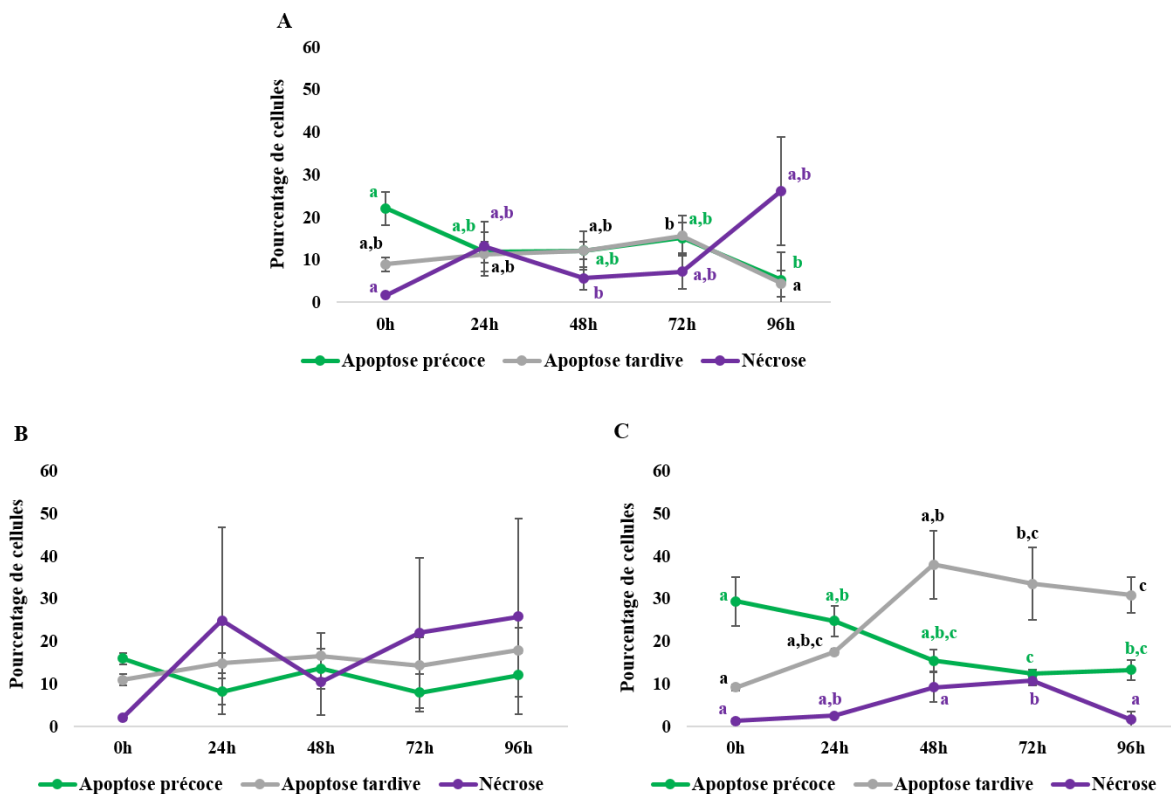


Figure 77: Évolution au cours du temps des proportions relatives des populations de cellules LNCaP en apoptose précoce, tardive et nécrose en présence de DMSO (A) ou suite aux irradiations à 2 (B) et 5Gy (C).

Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Les premières différences significatives entre les conditions « irradiations seules » (**Figure 76**) et « combinaison » (**Figure 78**) sur les cellules de la lignée PC3 ne sont observées qu'à partir de 72 heures post irradiation, uniquement sur la proportion de cellules en apoptose tardive. Cependant, cet effet est uniquement dû au carbène puisque les profils « 4 μ M » (**Figure 74**) et « 4 μ M + 5Gy » sont similaires. Le même constat est fait à 96 heures post irradiations avec toutefois une proportion plus importante de cellules en état d'apoptose tardive lors du double traitement (25% et 75%, à 72 et 96h respectivement, pour le double traitement contre 20% et 45% pour le carbène 4 μ M seul). Aucune variation de la proportion de cellules en nécrose consécutive au double traitement n'est observée. Le double traitement 4 μ M+5Gy tend donc à augmenter la proportion de cellules PC3 engagées dans un processus de mort par apoptose

comparativement aux traitements individuels.

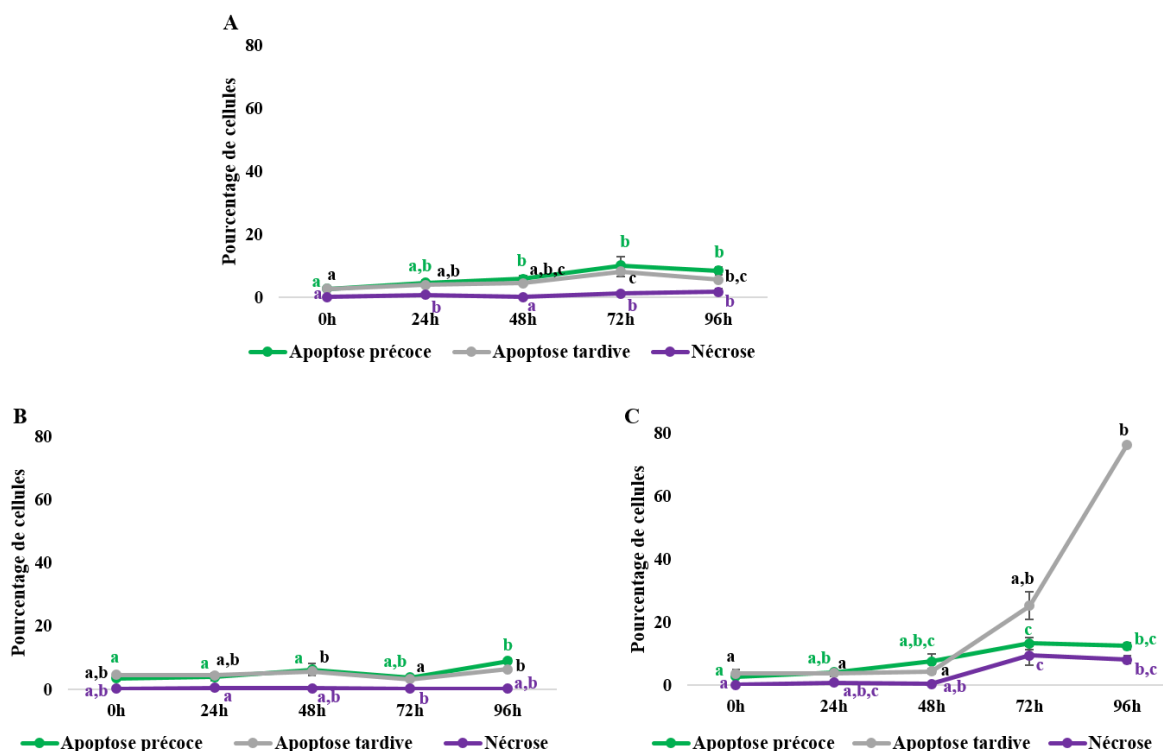


Figure 78: Évolution au cours du temps des proportions relatives des populations de cellules PC3 en apoptose précoce, tardive et nécrose suite aux combinaisons des irradiations à 5Gy avec 0,5µM (A), 2µM (B) et 4µM (C)

Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

De manière étonnante, une proportion non négligeable de cellules LNCaP en apoptoses précoce et tardive est observée dès 0 heure (immédiatement après irradiation) mais ces populations étant également observées sur le témoin DMSO à cette même durée (**Figure 77**), il ne s'agit pas ici d'un effet dû au traitement. Une faible concentration de carbène (0,5µM) associée à une irradiation de 5Gy ne modifie pas la distribution des cellules entre apoptose et nécrose. Pour des concentrations supérieures, c'est, là encore, le processus d'apoptose qui prend de l'ampleur avec une augmentation de la proportion de cellules en apoptose tardive. De façon notable, la combinaison « 2,4µM+5Gy » induit, dès 24h, une augmentation significative de la proportion de cellules en apoptose tardive comparativement aux irradiations et carbène pris

séparément (**Figure 79**).

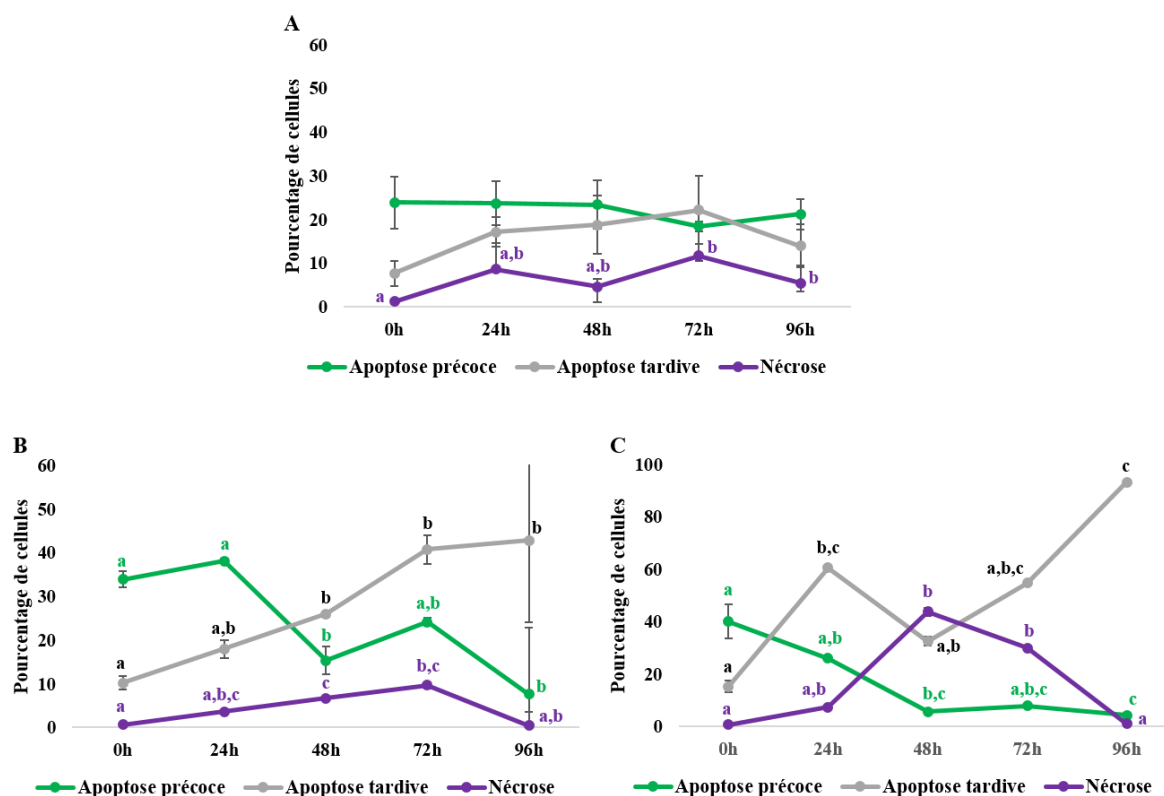


Figure 79: Évolution au cours du temps des proportions relatives des populations de cellules LNCaP en apoptose précoce, tardive et nécrose suite aux combinaisons des irradiations à 5Gy avec 0,5µM (A), 2µM (B) et 4µM (C).

Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Comme dit précédemment, plusieurs études ont rapporté une induction de l'apoptose par les carbènes dans divers types de cancers. Par exemple, une activation de l'apoptose par des carbènes or et argent internalisés dans les lysosomes de cellules cancéreuses de poumons et de pancréas (Visbal et al., 2016) a été mise en évidence. Une autre étude impliquant des carbènes or montre également une activation de l'apoptose par l'inhibition de la (TrxR) couplée à une augmentation de phospho-p53, induisant alors une activation de la caspase 3 par clivage de la procaspase 3, un clivage de PARP et une inhibition de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique (Gupta et al., 2019; Holenya et al., 2014; Karaca et al., 2017; Nandy et al., 2016; Zou et al.,

2018). Concernant plus particulièrement le cancer de la prostate, l'induction de l'apoptose a été observée sur des cellules PC3 suite à un traitement à l'auranofin à la concentration de l'IC₅₀ au bout de 72 heures (Curado et al., 2019), ce qui concorde avec nos données. Toutefois, compte tenu de leur statut p53 différent, il serait intéressant de disséquer les voies apoptotiques impliquées dans chacune de nos lignées cellulaires. En effet, les cellules LNCaP expriment P53, alors que ce gène est non fonctionnel dans la lignée PC3 (Carroll et al., 1993), ce qui expliquerait le faible déclenchement de l'apoptose, une apoptose qui serait du coup p53-indépendant. L'analyse de l'expression des céramides, ou de Fas/FasL, TNF ou encore de l'AIF pourrait nous permettre de compléter cet aspect. Toutefois, malgré les différences existant entre les deux lignées cellulaires, leur comportement semble similaire lorsque la plus forte concentration de carbène est prise en compte. Par ailleurs, aucune observation n'a été faite sur les données obtenues avec les concentrations de 0,5µM et 2µM alors qu'elles induisent une baisse significative de la prolifération cellulaire dès 48 heures pour la concentration de 2µM et dès 72 heures pour celle de 0,5µM. Il faut noter que les expériences de prolifération cellulaire (test MTT) se basent sur l'activité mitochondriale. Ainsi, les résultats obtenus par le test MTT et ceux obtenus par cytométrie reflèteraient une population de cellules métaboliquement plus ou moins actives mais vivantes ou capables de se maintenir en vie ; le processus de mort cellulaire étant enclenché plus tardivement.

Face aux irradiations, les deux lignées cellulaires restent similaires par rapport à la dose de 2Gy mais les cellules LNCaP semblent être plus sensibles que les cellules PC3 lorsqu'elles sont irradiées à 5Gy. Des effets similaires ont été observés dans des études mettent en évidence des mécanismes différents dans les deux lignées cellulaires. L'entrée en apoptose serait liée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M pour les deux lignées et un arrêt du cycle en phase G1 plus uniquement pour la lignée LNCaP. De même, cette différence de comportement serait liée au statut p53 des deux lignées cellulaires et impliquerait également l'activation d'AMPK (Rae & Mairs, 2019). Cette dernière induit des dommages à l'ADN et des catastrophes mitotiques (Castedo et al., 2004).

Enfin, la combinaison des traitements induit une synergie potentialisatrice mais seulement pour les fortes doses (IC₅₀ et 5Gy), ce qui est encourageant pour une sensibilisation des cellules cancéreuses aux irradiations mais sous-entend usage limité par la cytotoxicité du carbène et la dose d'irradiations relativement aiguë. Pour cette dernière, un fractionnement de la dose est toutefois possible. Rappelons la potentialisation observée sur cellules PC3 en

présence de 0,5 μ M + 2Gy obtenue avec nos données de survie clonogénique : en effet, ces données ont été obtenues sur des temps plus longs et font ressortir la capacité du carbène à induire une inhibition de la croissance cellulaire. Combiné aux irradiations, le carbène à de faibles concentrations induirait donc une inhibition de la croissance cellulaire, sans pour autant augmenter la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Ceci ajoute un poids à notre hypothèse de sélection de cellules qui mettraient en place des mécanismes de résistance. L'analyse de données moléculaires pourrait toutefois nous permettre d'expliquer d'une part, les effets du carbène et des irradiations seuls et d'autres parts, les effets de la combinaison des deux, nous aidant à mieux expliquer le comportement des cellules. C'est dans ce sens que nous avons analysé par western blot, la conversion de LC3, une protéine impliquée dans un autre type de mort cellulaire : l'autophagie.

2. Western blot

L'étude moléculaire de voies de survie et ainsi que l'analyse d'autres types de mort cellulaire pourraient permettre d'expliquer ou de tendre vers une explication du comportement des cellules, vis-à-vis du carbène, des irradiations et de la combinaison des deux. Elles pourraient également expliquer l'absence de potentialisation des effets des irradiations.

L'analyse moléculaire de la mort cellulaire a été réalisée par western blot en étudiant le clivage de la PARP et, événement intervenant dans le processus d'apoptose, mais également la conversion de LC3, un acteur impliqué dans l'autophagie. La première analyse n'ayant pas été concluante, nous n'évoquerons que les résultats obtenus avec LC3. LC3 existe sous deux formes : une forme libre cytosolique (LC3-I) et une forme où cette protéine est associée au phagosome (LC3-II) et dont la mobilité électrophorétique en SDS-PAGE est supérieure à celle de la première forme. C'est cette forme lipidée qui sert de marqueur à l'autophagosome. Ainsi, une augmentation du ratio LC3-II / LC3-I signifie une entrée en autophagie (Giménez-Xavier et al., 2008).

Les analyses ont été réalisées sur la lignée PC3 sur des temps allant de 0 à 96 heures par intervalles de 24 heures (**Figure 80**). Nos résultats ne mettent en évidence aucune variation sensible du rapport LC3-II/LC3-I au cours du temps que ce soit en présence de concentration croissante de carbène, d'une irradiation 2Gy ou de la combinaison des 2 traitements. Il semble

donc que ni le carbène, ni l'irradiation, ni leur combinaison, n'entraîne l'enclenchement de phénomènes autophagiques.

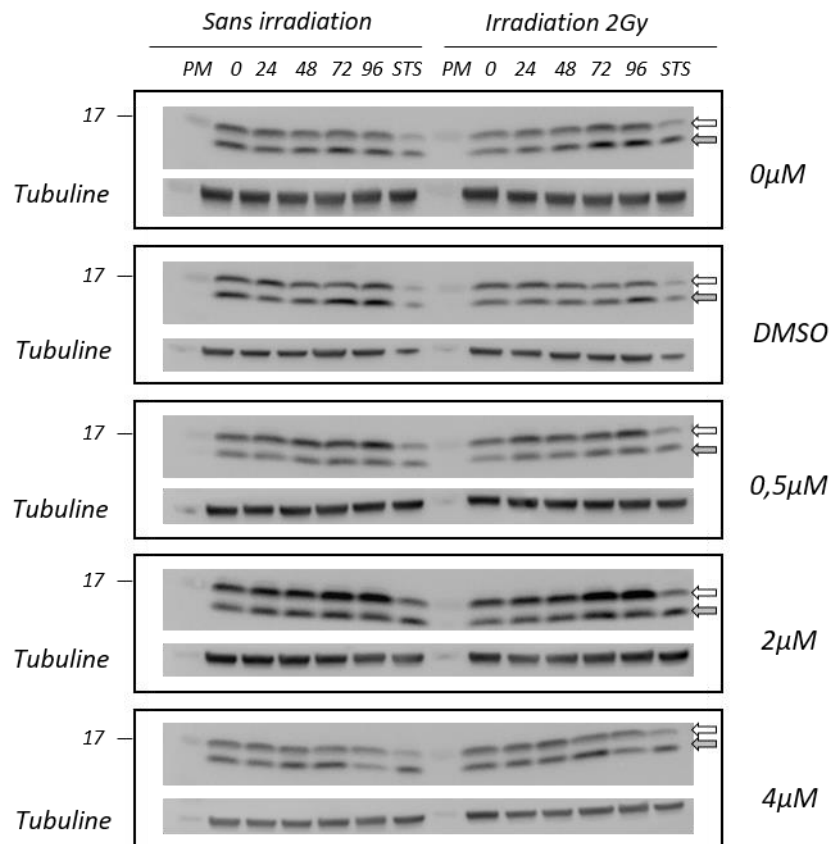


Figure 80: Analyse par Western-blot des effets du carbène en présence ou en absence d'une irradiation de 2Gy, sur le comportement des formes LC3-I et LC3-II de cellules PC3.

PM : Poids moléculaires (17 : position du marqueur 17kDa), les chiffres indiquent les durées post-irradiation (0h à 96h), *STS* : traitement à la staurosporine. La bande inférieure dans chaque cadre présente le témoin de dépôt, la tubuline ; (n=1).

Toutefois, dans leurs études, Lee et ses collaborateurs ont démontré l'inhibition de voies de signalisation telles que Wnt ou Shh mais également une activation de l'autophagie par des composés de type carbène associés à de l'or dans des modèles cellulaires de cancer du sein (MCF-7). L'activation de l'autophagie a été observée dès 3 heures (Lee, Patil, et al., 2017). À ce jour, l'étude de l'induction de l'autophagie par des composés organo-métalliques type dans des modèles de cancer de la prostate n'existent pas. Par contre, l'induction de l'autophagie par des nanoparticules d'or est assez bien renseignée, notamment dans les gliomes où elles amélioreraient les effets de la chimiothérapie (Li et al., 2010; Ruan et al., 2019). À la lumière

de ces observations, il semble qu'une analyse sur des temps courts pourrait apporter de nouvelles informations sur cet aspect.

Il faut cependant garder à l'esprit que le déclenchement d'un processus autophagique n'est pas systématique dans la progression tumorale puisque ce dernier peut être activé ou inhibé en fonction des conditions de stress dans lesquelles se trouve la cellule (Amaravadi et al., 2016; Mulcahy Levy et al., 2017). En effet, l'inhibition de l'autophagie a été montrée comme sensibilisant les cellules du cancer des ovaires et de l'œsophage à la radiothérapie (Chen et al., 2015; Liang et al., 2012) alors que son efficacité dans l'induction de la mort cellulaire a été démontrée dans d'autres types de cancers tels que les myélomes, leucémies, cancers du sein ou de la prostate (Chen & Karantza, 2011; Galluzzi et al., 2017).

Le suivi de la mitophagie par l'analyse de l'expression de PINK1, ou de la sénescence par l'analyse de p21 ou de p16 pourrait compléter ces résultats. Il serait également intéressant d'étudier l'activation d'Akt afin de la mettre éventuellement en lien avec l'autophagie, les deux voies étant interconnectées via les AMPK, par exemple. Par ailleurs, compte tenu de l'inhibition de p53 par les voies d'autophagie menant ainsi à la progression tumorale, des analyses sur la lignée LNCaP pourraient compléter ces résultats.

C. Effets sur le cycle cellulaire

Les cellules exposées à des radiations ionisantes subissent des modifications de leur progression dans le cycle cellulaire et notamment un arrêt en phase G2 qui, s'il n'est pas effectif, pourrait augmenter la mort cellulaire par apoptose. Dans un même ordre d'idée, les dommages à l'ADN associés aux irradiations activent le contrôle en phase G1 induisant alors un potentiel arrêt avant la progression en phase S. L'analyse du cycle cellulaire dans nos différentes conditions de traitement pourrait donc apporter des pistes de compréhension ou d'explication des observations décrites dans les précédents chapitres.

Les analyses ont été réalisées sur les deux types cellulaires selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Comme précédemment, nous évoquerons dans un premier temps les effets du carbène seul (aux mêmes concentrations à savoir 0,5 μ M, $\frac{1}{2}$ IC₅₀ et IC₅₀), puis des irradiations seules (2 et 5Gy) et, enfin, des combinaisons carbène-irradiations.

Les analyses statistiques ont été faites par phase de cycle entre conditions expérimentales différentes.

La **figure 81** présente, pour les deux lignées cellulaires, la proportion de cellules dans chaque phase du cycle, dans les conditions contrôle (avec ou sans DMSO) et suite au traitement par le carbène pendant 3h.

Notons tout d'abord que la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle, en absence de tout traitement (0 μ M), est en accord avec les données de la littérature. La différence majeure entre les deux lignées cellulaires se situe dans la proportion relative des différentes phases entre elles. En effet, la lignée PC3 présente des proportions de cellules en phase G2/M et S environ 50% supérieur à ce qui est observé chez les LNCaP. Par ailleurs, aucun effet du carbène n'est observé après ce temps court.

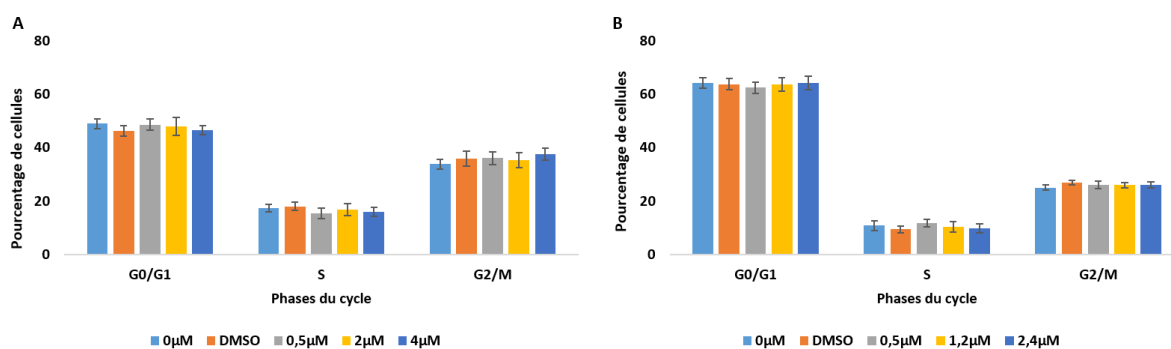


Figure 81 : Effet d'un traitement de 3 heures de carbènes sur les différentes phases du cycle des cellules PC3 (A) et LNCaP (B).

Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

L'analyse du cycle cellulaire toutes les 24h jusqu'à 96h ne met pas en évidence d'effet marqué du carbène sur le cycle cellulaire. Aucun changement significatif des proportions de cellules dans les 3 phases du cycle n'a été observé sur la lignée PC3 (**non montré**).

Concernant la lignée LNCaP (**Figure 82**), l'effet du carbène le plus marqué est observé à 24h avec une augmentation significative du nombre de cellules en phase G0/G1 au dépend du

nombre de cellules en phase S. Toutefois, les variations sont faibles et l'effet observé ne semble pas dose-dépendant. La phase G2/M quant à elle n'est pas modifiée. Des durées de contact supérieures avec le carbène n'entraînent pas de différences significatives par rapport aux témoins. L'augmentation de la proportion de cellules en phase G0/G1 à 0,5 μ M et 1,2 μ M, de même que la baisse de la proportion en phase S pour 1,2 μ M et 2,4 μ M soulèvent cependant plusieurs remarques. Tout d'abord, ces perturbations sont fugaces (24h et rien au-delà). La brièveté de la perturbation suggère bien un effet du carbène sur le cycle cellulaire des cellules LNCaP mais aussi, en parallèle, la capacité de ces cellules à mettre en place rapidement une correction. L'éventuel arrêt en phase G0/G1 avec augmentation de la phase subG1 est un signal fort pour le déclenchement de l'apoptose (Wu et al., 2016). Toutefois, dans l'analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux, cela ne se manifeste pas par une augmentation de l'apoptose au-delà de 24h à 1,2 μ M de carbène, si ce n'est à des temps plus longs (96h – **Figure 75**).

De façon plus générale, alors que les concentrations correspondant aux IC₅₀ (4 μ M, PC3 et 2,4 μ M, LNCaP) ont un fort impact sur la survie cellulaire avec une augmentation importante du nombre de cellules en apoptose tardive, aucune modification majeure du cycle cellulaire, notamment en phase G2/M, n'est observée au cours du temps quelle que soit la concentration en carbène présente dans le milieu. L'apoptose tardive observée alors dans ces conditions apparaît indépendante d'un contrôle du cycle en phase G2.

Quant aux effets des irradiations sur les cycles des deux lignées cellulaires (**Figures 83 et 84**), nous notons une différence de comportement révélant une plus forte sensibilité des cellules à ce type de traitement. Sur les cellules PC3 (**Figure 83**) l'effet le plus notable est observé uniquement pour la dose 5Gy avec une diminution de la proportion de cellules en phase G0/G1 au profit de la phase S. Cet effet semble s'amorcer à 24h et 48h puis se confirme à 72h. Aucune modification significative de la phase G2/M n'est par contre observée. Rappelons que les cellules PC3 ont révélé, lors de l'analyse par cytométrie des processus de mort cellulaire, une très faible sensibilité à l'irradiation que notre analyse ici tendrait à confirmer. La mort des cellules suite à ce traitement passerait principalement par un processus apoptotique qui ne serait pas dépendant d'un contrôle du cycle en phase G2 mais, éventuellement, d'un contrôle altéré en phase G0/G1.

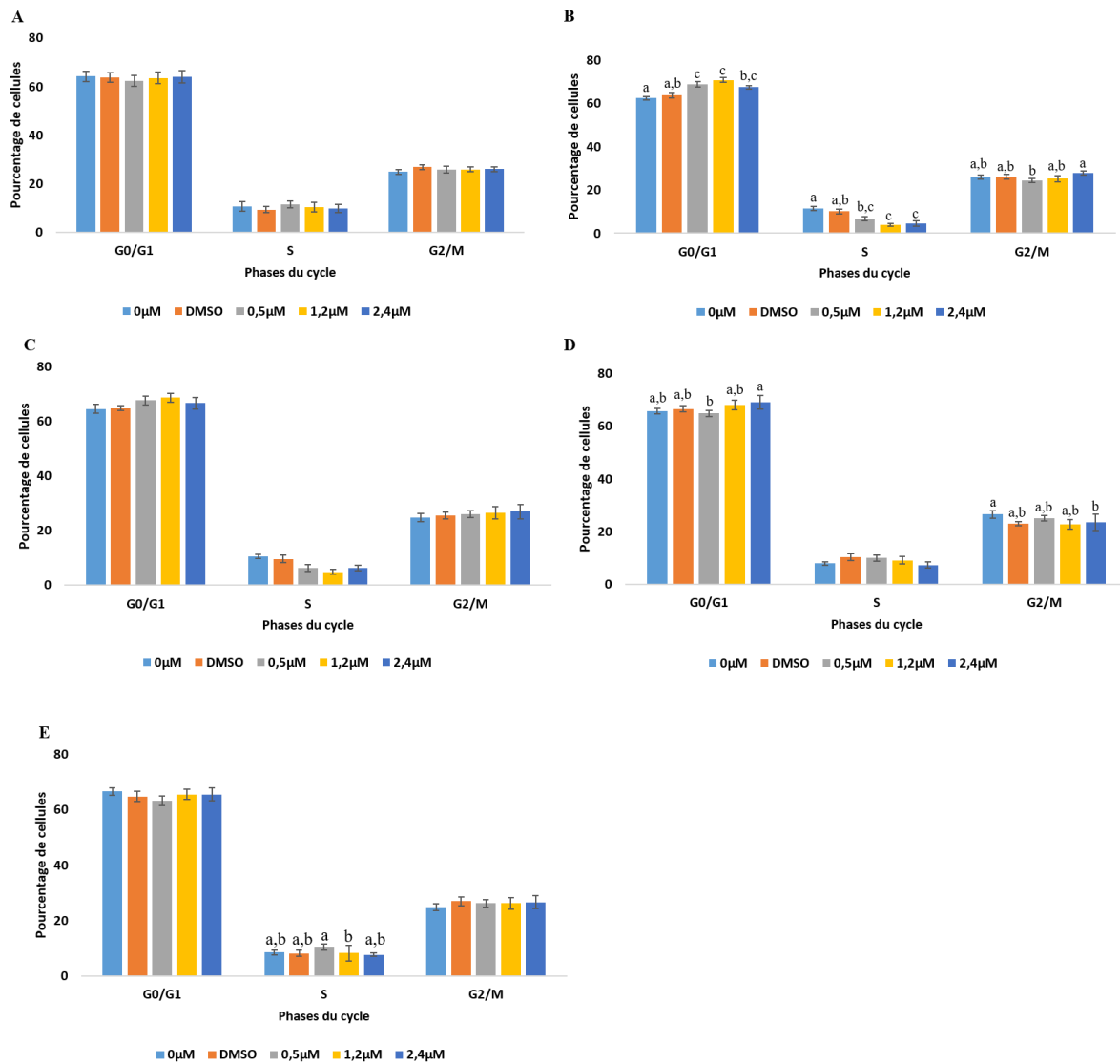


Figure 82: Analyse par cytométrie en flux des effets du carbone sur le cycle cellulaire dans les cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

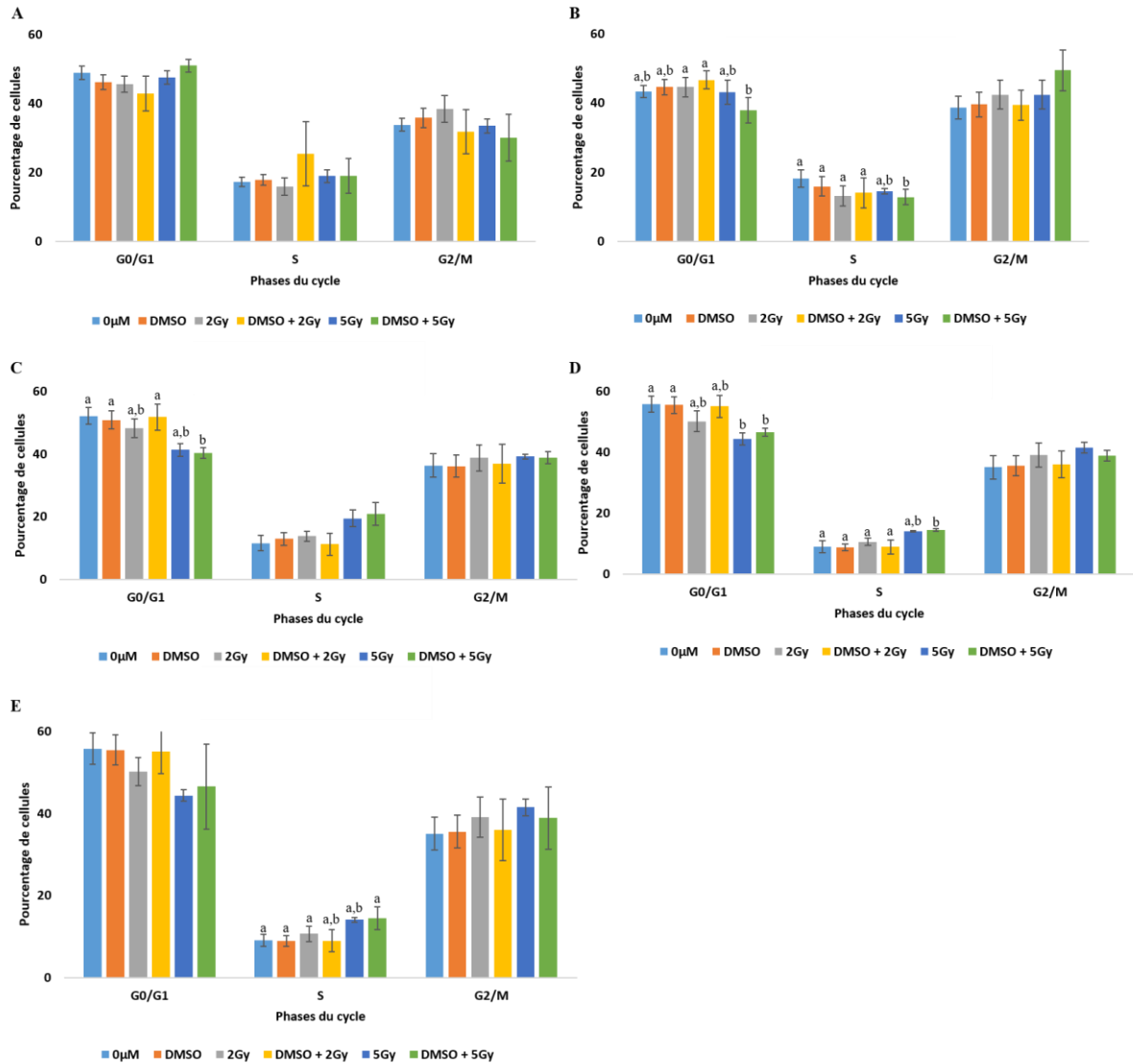


Figure 83: Analyse par cytométrie en flux des effets des irradiations sur le cycle cellulaire des cellules PC3 à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Concernant la lignée cellulaire LNCaP (**Figure 84**), déjà plus sensible aux irradiations par rapport à la lignée cellulaire PC3, un effet des irradiations est observé dès 24h avec des variations des proportions de cellules dans chaque phase du cycle. L'effet le plus remarquable est une augmentation de la proportion de cellules en phase G2/M suite à l'irradiation 5Gy. En parallèle les baisses concomitantes de proportions de cellules en phase G0/G1 et S à 5Gy, vont dans le sens d'un blocage dans la phase ultérieure. Cet état se confirme par la suite et, bien que moins marqué, apparaît également avec une dose de 2Gy. Ainsi la proportion de cellules en phase G2/M, de moins de 30% au temps 0h, passe à une valeur proche de 40% dès 48h après le traitement 5Gy suggérant un blocage au niveau du contrôle G2/M. La perturbation du cycle cellulaire et l'engagement d'une relativement forte proportion de cellules dans des processus de mort par apoptose semblent corrélés pour ce type cellulaire.

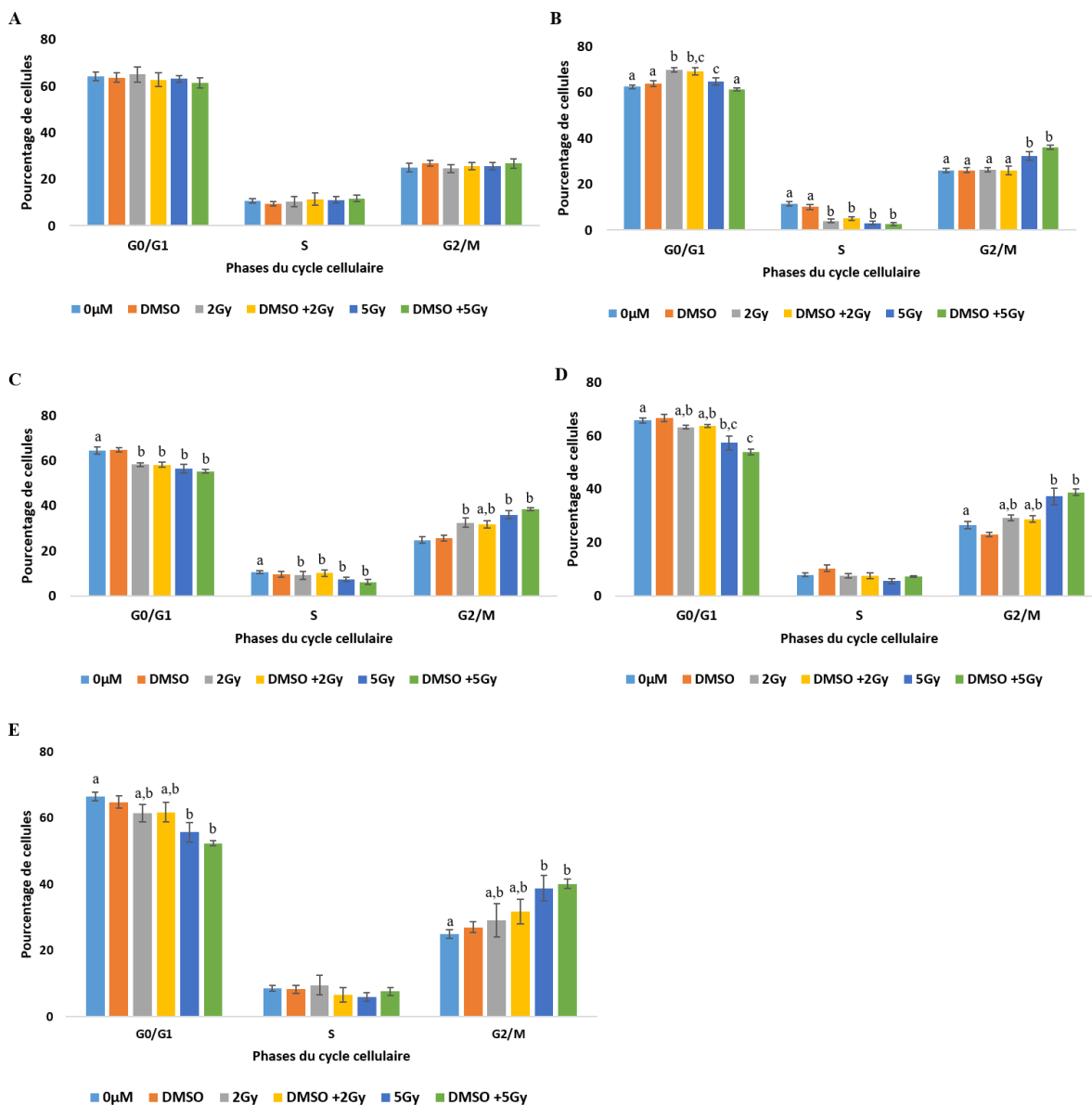


Figure 84: Analyse par cytométrie en flux des effets des irradiations sur le cycle cellulaire des cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Mais qu'en est-il lorsque les irradiations sont combinées au carbène ?

Les combinaisons de traitements étant nombreuses nous avons fait le choix, afin de clarifier l'analyse, de ne montrer que quelques résultats significatifs. L'effet de différentes combinaisons, comparé à celui des traitements est présenté sous l'angle chronologique (0h à 96h).

Le comportement des cellules LNCaP au cours du temps est très peu altéré quel que soit le traitement individuel ou combiné (**non montré**). Par contre, pour les cellules PC3 (**Figure 85**), l'irradiation 5Gy (**A**) entraîne, à 24h, une diminution marquée de la population en phase G0/G1 au profit de la population en phase G2/M. Les proportions reviennent à leur état initial dès 48h. Cet effet est retrouvé lors du traitement combiné.

Concernant l'effet carbène seul (**B1 à B3**), une augmentation progressive de la population en phase G0/G1 au dépend de la phase S, suggérant un contrôle accru avant la réplication de l'ADN, est observée. La phase G2/M n'est, quant à elle, pas significativement impactée. L'engagement en phase S (réplication de l'ADN nucléaire) est une étape fortement dépendante d'un apport énergétique (Kondo et al., 2000). Or nos expériences ont montré une localisation préférentielle du carbène dans les mitochondries. Cette localisation pourrait provoquer une perturbation du métabolisme énergétique justifiant cet arrêt en phase G1.

Pour chaque dose de carbène, la combinaison avec l'irradiation 5Gy induit une répartition différente des phases du cycle avec, cette fois-ci, une surreprésentation de la phase G2/M impliquant un arrêt du cycle cellulaire, celui-ci est le plus marqué avec la concentration 2 μ M (**C1 à C3**).

L'effet de blocage en G2/M initié par l'irradiation est amplifié lorsque le carbène est présent dans le milieu, ce qui suggère de façon nette une potentialisation de l'irradiation par cette molécule sur la capacité d'arrêt du cycle.

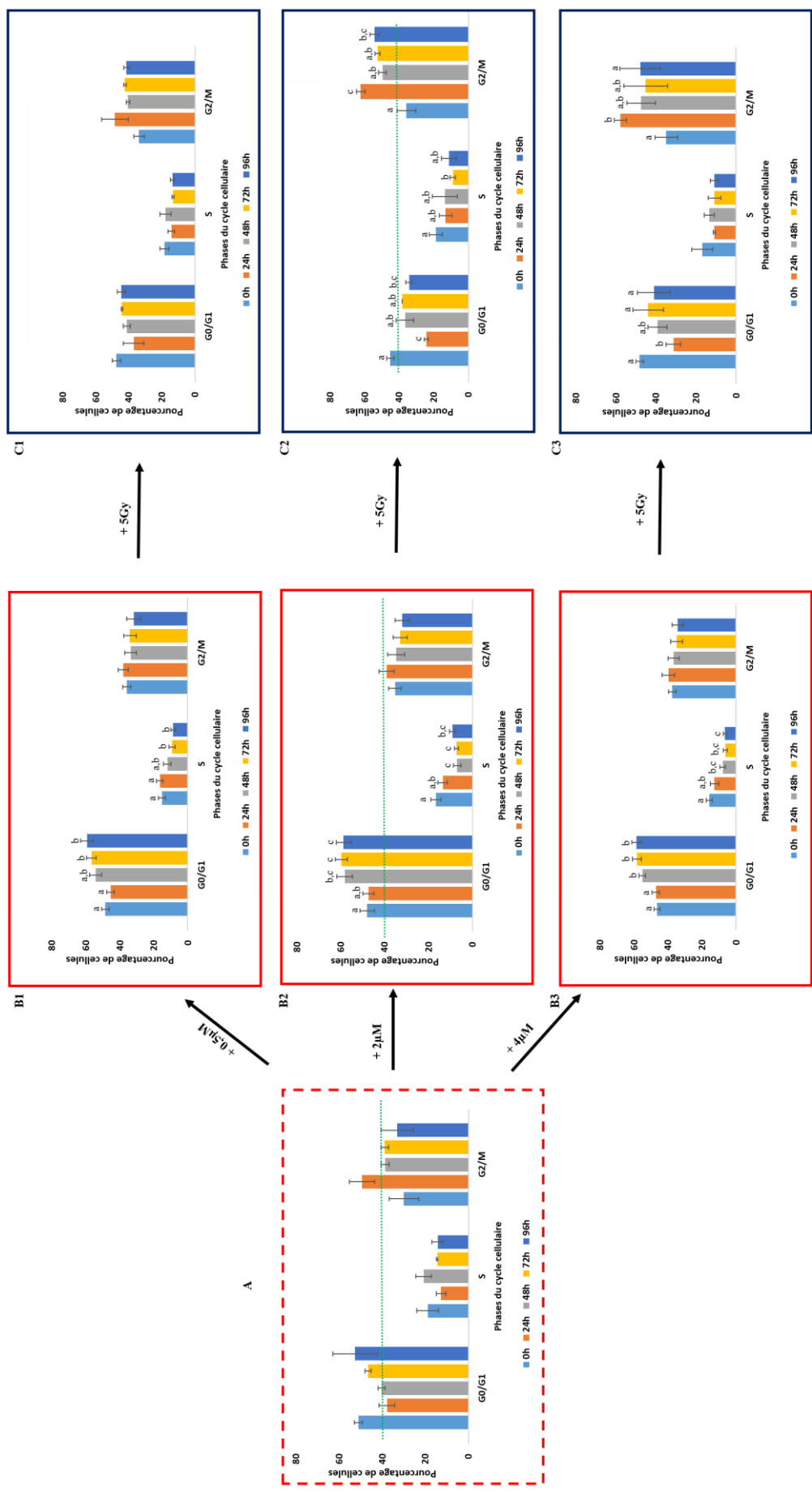


Figure 85 : Évolution du cycle cellulaire des cellules PC3 au cours du temps.

A : Effets de l'irradiation 5Gy. B : Effets du carbène seul à 0,5µM (B1), 2µM (B2) et 4µM (B3). C : Effets de la combinaison irradiation + carbène 0,5µM (C1), 2µM (C2) et 4µM (C3). Les traits pointillés verts indiquent le seuil 40% pour les conditions 5Gy, carbène 2µM, carbène 4µM/5Gy). Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

De récentes études ont montré un arrêt de phases du cycle cellulaire induit par des carbènes d'or et de rhénium respectivement sur des cellules de cancer colorectal et pancréatiques. Dans le premier cas, l'arrêt, en phase G1/S était indépendant du statut p53 des cellules mais serait plutôt la cause d'une induction de p21. Dans le deuxième exemple, les complexes de rhénium induisaient un arrêt du cycle en phase G2/M, avec une implication de la phosphorylation de la kinase Aurora-A (Dabiri et al., 2019; Simpson et al., 2017). Globalement, nos résultats montrant un arrêt en phase G0/G1 pour les cellules LNCaP et aucun effet pour les PC3 ne semblent tout de même pas contradictoires et feraient plutôt ressortir l'implication de p53 dans ce phénomène cellulaire.

L'exposition de cellules aux rayonnements ionisants a pour conséquence l'activation de multiples voies impliquées dans le maintien de leur intégrité génétique. Des mécanismes de réparation tels que la recombinaison homologue et la jonction d'extrémités non homologues sont des réponses importantes des mammifères aux CSB, mais la régulation du cycle cellulaire est peut-être le déterminant le plus important de la sensibilité aux rayonnements ionisants. Par exemple, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire est une réponse cellulaire courante suite aux dommages à l'ADN, afin de permettre aux mécanismes de réparation de l'ADN de se mettre en place. Dans le cas échéant, un arrêt irréversible de la croissance cellulaire entraîne les cellules vers la mort par apoptose ou par nécrose. L'implication de gènes tels que BRCA, CDK, p21, ATM et surtout de P53 a été montré dans la coordination de la réparation de l'ADN avec la progression du cycle cellulaire et la mort cellulaire. Cet acteur clé, P53, est impliqué dans la transition G2/M et plus significativement dans la transition G1/S. Par ailleurs, la phase du cycle cellulaire détermine la radiosensibilité relative des cellules : celles en phase G2 étant les plus radiosensibles, par rapport à celles en phase G1, encore plus radiosensibles que celles en phase S (pour revue, Pawlik & Keyomarsi, 2004).

Concernant les effets des irradiations sur les deux lignées cellulaires, il a été observé des différences de comportement en fonction de la dose d'irradiation mais également du type cellulaire : globalement, les cellules de la lignée LNCaP sont sensibles dès 2Gy et subissent un blocage en G2/M assez précoce et maintenu dans le temps avec la dose d'irradiation de 5Gy, contrairement aux cellules de la lignée PC3 dont le cycle cellulaire n'est pas affecté par les irradiations. En effet, même si aucune modification n'est observée au niveau de la phase G2/M, néanmoins, il a été observé une diminution des proportions de cellules dans les phases G0/G1 et S. Cette différence de comportement est notamment due au statut de la protéine p53 dans les

deux lignées cellulaires. En effet, il est bien décrit par la littérature que les blocages dans les phases G0/G1 et G2/M, observés suite à des irradiations dépendent de la protéine p53 fonctionnelle (Graves et al., 2000; Hsu et al., 2000; Kastan et al., 1991). Une analyse de la prolifération des cellules de la lignée PC3, en se basant sur l'expression de Ki67, un marqueur de prolifération, permettra de compléter les résultats obtenus sur cette lignée cellulaire.

De manière intéressante, les cellules LNCaP ont montré un arrêt transitoire de leur cycle cellulaire en phase G0/G1 suite au traitement aux carbène et un arrêt en phase G2/M suite aux irradiations, montrant un effet différentiel des deux traitements. Cependant, aucun effet n'a été observé avec chacune des combinaisons, ce qui pourrait suggérer une mise en place de systèmes de réparations suite au traitement avec le carbène, qui empêcherait une quelconque potentialisation des effets des irradiations. Ceci renforce une fois de plus, notre hypothèse sur une potentielle sélection de cellules résistantes.

Contrairement aux cellules LNCaP, les cellules PC3 ont montré une insensibilité face et au carbène, et aux irradiations mais de manière intéressante, un arrêt du cycle dans la transition G2/M a été mis en évidence par notre étude. Le rôle ou l'implication de p53 semble tout de même ressortir de la différence flagrante entre les deux lignées cellulaires.

L'analyse des cassures générées pourrait également permettre d'expliquer le comportement des cellules, étant donné que la radiorésistance des cellules n'est pas en lien avec l'arrêt ou la durée de l'arrêt du cycle cellulaire mais plutôt avec le nombre de CDB non réparées (Dikomey et al., 1998).

La quantification des cellules en sub-G1 (mortes) aurait également pu compléter les résultats d'analyse de la mort cellulaire. Cependant, l'outil d'analyse utilisé ne nous a pas permis de déterminer ce paramètre.

L'ensemble de ces résultats montrent des perturbations cellulaires dus d'une part par le carbène et d'autre part par les irradiations. De manière intéressante, des différences de comportement semblent ressortir entre les deux lignées cellulaires probablement du fait de leur statut p53, et ce, sur plusieurs aspects (survie, cycle cellulaire, mort cellulaire), mais également aussi par rapport à leur statut AR et PTEN. Ces perturbations cellulaires, pourraient être le reflet de perturbations mitochondriales ou encore engendrer ces dernières. Une analyse des effets du carbène et/ou des irradiations sur certains paramètres mitochondriaux nous permettra de faire

le point ou du moins, nous donner des pistes de réflexion.

III. Réponses mitochondriales aux différents traitements

La perméabilisation des membranes mitochondriales, en conduisant à la mort cellulaire par relargage des protéines pro-apoptotiques dans le cytosol, est une étape importante du processus apoptotique. D'une manière plus générale, l'effondrement du potentiel de membrane est un facteur de prédiction de l'apoptose particulièrement fiable. Dans notre étude, nous avons observé que certaines combinaisons carbène/irradiation conduisaient à une potentialisation de l'effet de l'irradiation sur la survie cellulaire et que le processus de mort cellulaire impacté était plus particulièrement l'apoptose. Par ailleurs, l'analyse du cycle cellulaire met en évidence des perturbations dans la transition G1/S du cycle ainsi qu'un blocage en G2/M consécutif à une irradiation 5Gy celui-ci étant amplifié par le carbène. De plus, la localisation mitochondriale de l'or pourrait suggérer une perturbation de l'intégrité de la membrane mitochondriale. Ces différentes observations nous ont donc conduits à nous intéresser à l'implication éventuelle de la mitochondrie dans les phénomènes observés. Nous avons tout d'abord étudié l'impact des différents traitements sur le potentiel de membrane mitochondrial.

A. Effets sur le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

Le potentiel de membrane a été étudié par cytométrie en flux selon le protocole décrit dans la rubrique Matériels et Méthodes. Dans cette partie, nous aborderons dans un premier temps, les effets du carbène seul, puis des irradiations seules et nous terminerons par les effets des différentes combinaisons sur le potentiel de membrane mitochondrial des lignées cellulaires PC3 et LNCaP. Les analyses ont été réalisées sur les temps « habituels » post-irradiation soit 3h de carbène suivi ou non d'une irradiation (temps 0h, 24, 48, 72 et 96 heures), mais aussi sur des durées plus courtes (0, 3, 6 et 18 heures). Le CCCP, un découplant mitochondrial, est utilisé afin d'engendrer une baisse de potentiel membranaire significative et ainsi valider la sonde utilisée (JC-1).

Suite au traitement par le CCCP, une dépolarisation supérieure à 90%, quel que soit le modèle cellulaire, est observée (**Figure 86**), validant ainsi la méthodologie mise en œuvre. Les cellules PC3 soumises à des doses croissantes de carbène montrent une augmentation de la

dépolarisation à partir de 24h avec un effet significatif de la concentration 4 μ M. À partir de 48h, cet effet semble dose-dépendant, toutefois alors qu'il persiste à 4 μ M, il s'estompe au cours du temps pour les concentrations les plus faibles. Les cellules LNCaP quant à elles (**Figure 87**) se distinguent par des valeurs élevées de dépolarisation (de l'ordre de 40%) dès 3h, quel que soit le traitement (contrôle et carbène). Cependant, comme pour les PC3, le potentiel de membrane est sensible à la plus forte concentration (IC₅₀ - 2,4 μ M) à partir de 72h avec toutefois une perte de potentiel plus marquée, équivalente à celle obtenue avec le découplant suggérant une plus grande sensibilité de leur part.

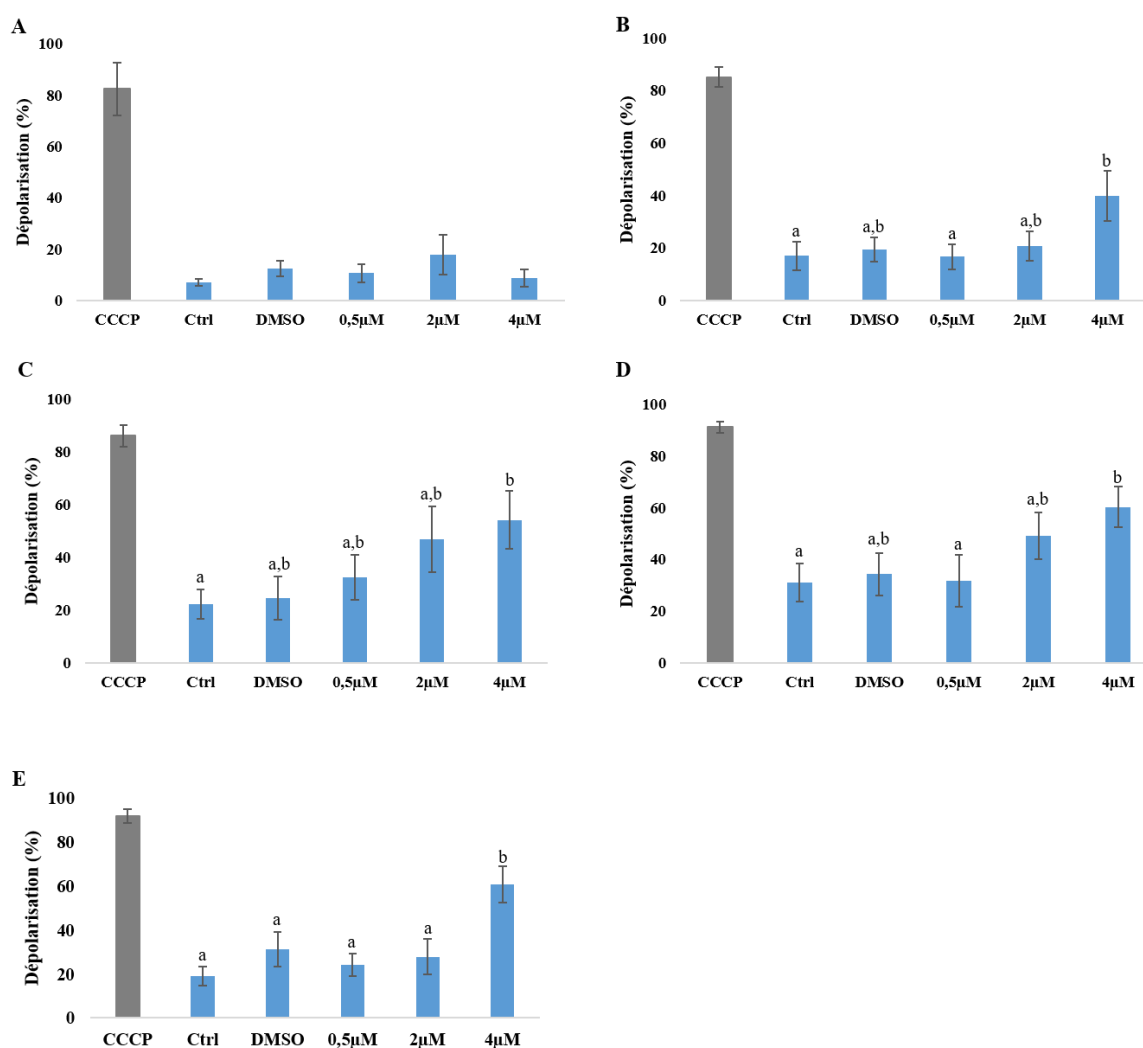


Figure 86: Analyse par cytométrie en flux des effets du carbène sur la dépolarisation de la membrane mitochondriale des cellules PC3 exprimée en proportion (%) de cellules dépolarisées par rapport à la population totale à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

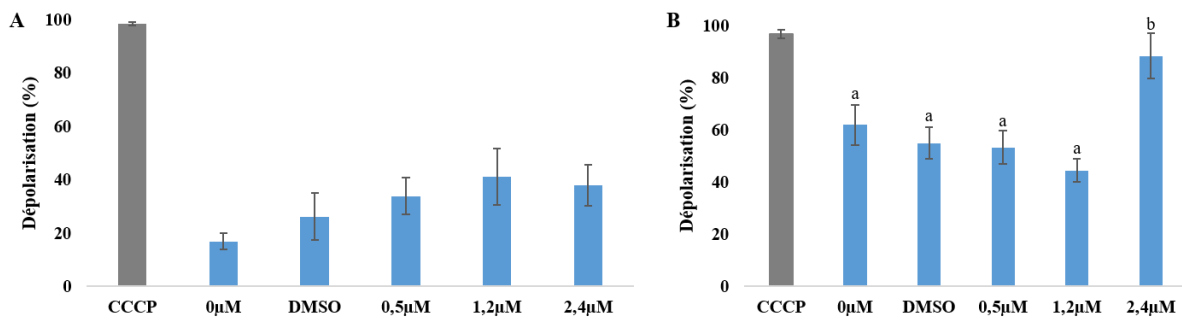


Figure 87 : Analyse par cytométrie en flux des effets du carbène sur la dépolarisation de la membrane mitochondriale des cellules LNCaP exprimée en proportion (%) de cellules dépolarisées par rapport à la population totale à 0h (A) et à 96h (B).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Le carbène interfère donc avec les processus impliqués dans le maintien du potentiel de membrane mitochondrial mais seulement pour des concentrations élevées et pour des temps relativement longs.

Lorsque ces cellules sont soumises à des irradiations (**Figures 88 et 89 – graphes c et d**), le potentiel de membrane est perturbé mais seulement avec une dose de 5Gy. Cette perturbation est initiée après 6h pour les cellules PC3 et plus rapidement pour les cellules LNCaP (0h). À l'image de ce qui est observé pour l'effet du carbène, les cellules LNCaP sont plus sensibles que les cellules PC3, avec une perte de potentiel à 18h équivalente à celle du découplant mais comme cela a été noté précédemment, les cellules LNCaP présentent un niveau basal de dépolarisation relativement élevé (**Figure 89, graphe a**).

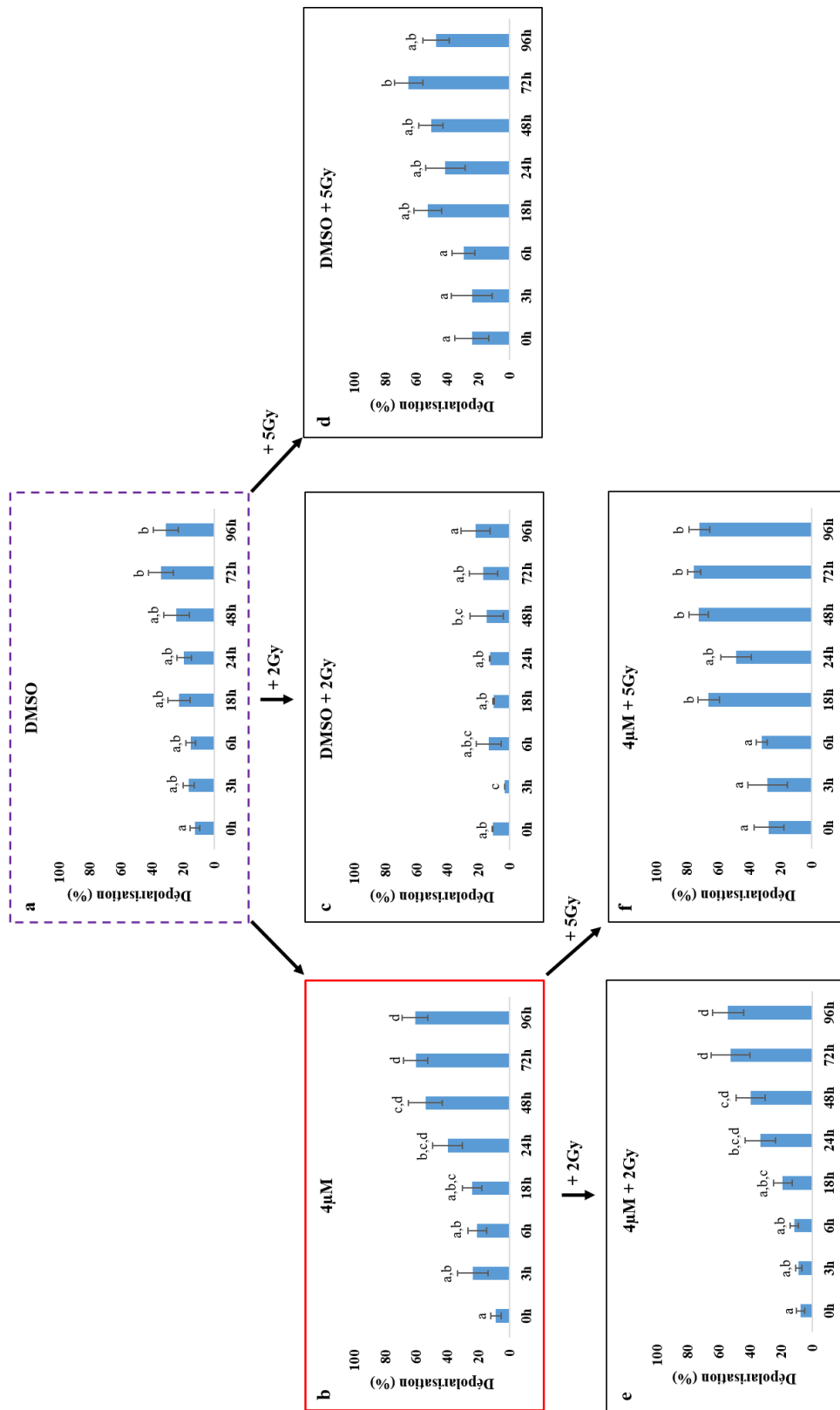


Figure 88 : Analyse par cytométrie en flux du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules PC3 au cours du temps, a) en absence de traitement carbène ou irradiation (témoin DMSO), b) en présence de carbène 4µM ; c) et d) suite à une irradiation 2 et 5Gy respectivement ; e) et f) suite au double traitement.

Les cellules ont été ensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

Dans le cas des cellules LNCaP, ces observations peuvent être mises en parallèle avec les résultats obtenus lors de l'analyse des processus de mort cellulaire par cytométrie. En effet, un taux relativement élevé de cellules en apoptose précoce et tardive a été observé dans les conditions basales (**Figure 73**) et accentué suite aux traitements par le carbène (**Figure 75**) et les irradiations (**Figure 77**). De la même façon la corrélation entre potentiel de membrane et apoptose est visible dans le cas des cellules PC3 avec une chute de potentiel membranaire initiée entre 24 et 48h avec 4 μ M de carbène suivie de la mort cellulaire par apoptose (**Figure 74**). L'ensemble de ces phénomènes suggère la part importante de l'apoptose d'origine mitochondriale dans ces processus de mort cellulaire liés au carbène ou aux irradiations.

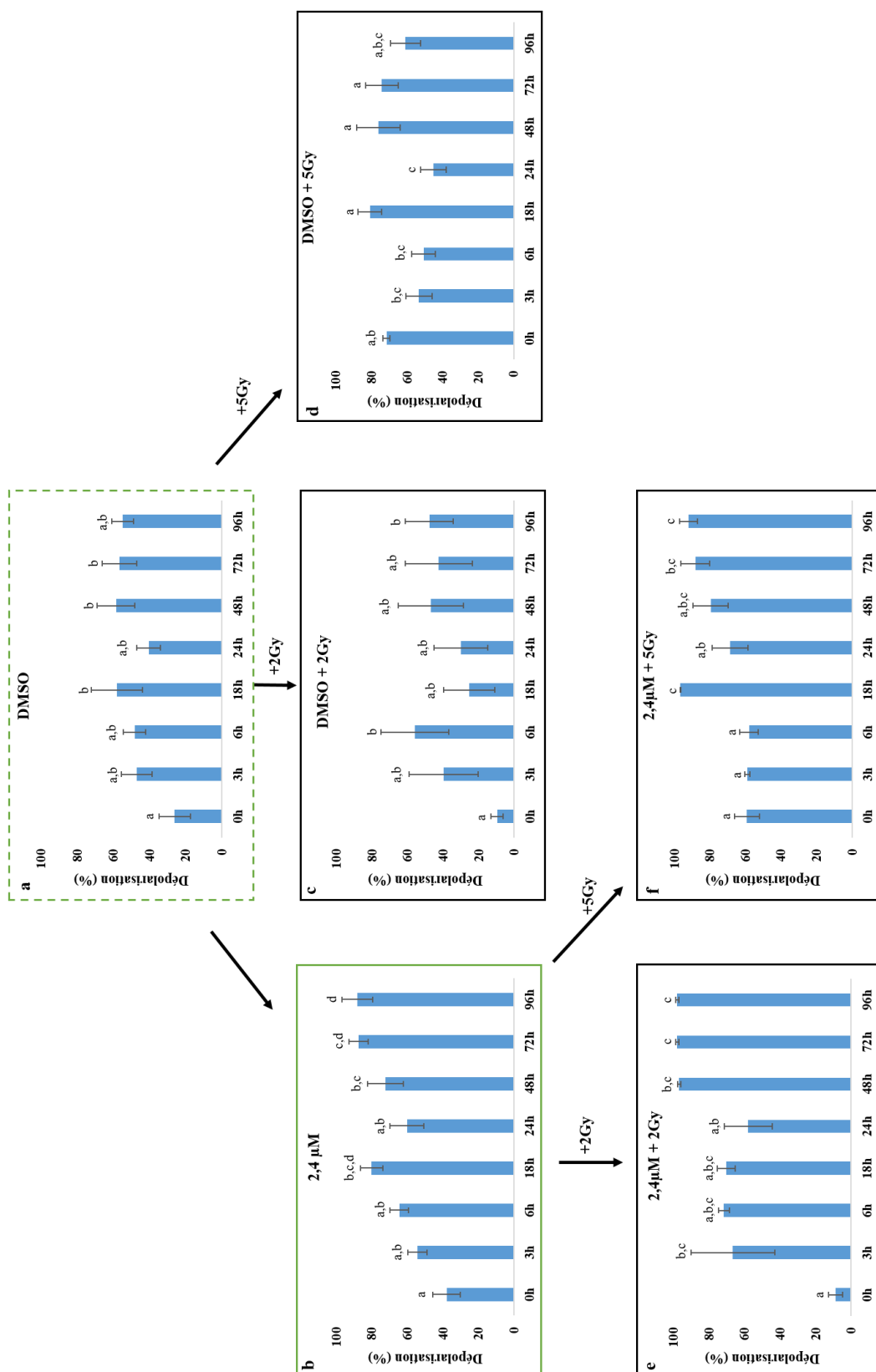


Figure 89: Analyse par cytométrie en flux du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules LNCaP au cours du temps, a) en absence de traitement carbène ou irradiation (témoin DMSO), b) en présence de carbène 2,4μM ; c) et d) suite à une irradiation de 2 et 5Gy respectivement ; e) et f) suite au double traitement.

Les cellules ont été ensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

La combinaison des deux traitements ne révèle pas de potentialisation. En effet, sur la lignée PC3 (**Figure 88, graphes e**), une irradiation de 2Gy en présence de carbène 4 μ M (IC₅₀) ne modifie pas le profil par rapport à celui observé en présence de carbène seul ; l'effet observé sur le potentiel de membrane n'est donc dû qu'au carbène. L'irradiation à 5Gy en présence de carbène 4 μ M quant à elle, présente un profil similaire à celui de l'irradiation seule avec cependant une intensité légèrement plus élevée (environ +15%) qui ne permet pas de conclure sur une réelle potentialisation de l'irradiation par le carbène sur ce processus. Concernant les LNCaP (**Figure 89**) le niveau basal de dépolarisation obtenu avec 2,4 μ M de carbène est élevé et l'addition des irradiations ne montre pas d'évolution significative du profil, suggérant là aussi l'absence de potentialisation pour les deux doses d'irradiation.

Nos résultats montrent une forte dépolarisation basale des cellules LNCaP non retrouvée dans la littérature. Même si la sonde JC-1 utilisée est fiable, des analyses similaires pourraient être réalisées avec une autre sonde comme le Mitotracker® par exemple afin de nous affranchir de ce biais.

L'atteinte du potentiel de membrane mitochondrial a été démontrée dans plusieurs études utilisant des carbènes. Même si elles convergent toutes vers une augmentation de la dépolarisation de la membrane mitochondriale, les conséquences qui découlent de ces événements semblent dépendre du type cellulaire mais également du type de carbène utilisé (Baker et al., 2006; Eloy et al., 2012; Li et al., 2015, 2020). Nous pourrions logiquement penser que la perte du potentiel de membrane mitochondriale et donc de l'intégrité de cette dernière ne mènerait qu'à un déclenchement de la voie mitochondriale de l'apoptose. Cependant, l'activation de la voie de l'AIF a été mise en évidence par les études d'Eloy et ses collaborateurs (Eloy et al., 2012). Ainsi, la chute du potentiel observée dans nos deux lignées cellulaires pourrait expliquer l'activation de l'apoptose précédemment décrite, impliquant les voies intrinsèques et/ou extrinsèques.

Contrairement à nos résultats, la littérature montre une augmentation transitoire suivie d'une baisse de la polarisation de la membrane mitochondriale lorsque les cellules sont irradiées. Cependant, les doses utilisées ne sont pas les mêmes : elles vont de 10 à 30 Gy environ dans ces études contre un max de 5Gy dans la nôtre (Shimura et al., 2017; Yamamori et al., 2012b). De plus, le type cellulaire pourrait également expliquer ces différences. Cette augmentation était toutefois couplée à un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2/M.

Globalement, que ce soit face au carbène ou aux irradiations, les cellules LNCaP montrent une certaine sensibilité par rapport aux cellules PC3. Notons également que paradoxalement, les cellules PC3 ont montré une perturbation importante du potentiel de membrane mitochondriale tout en montrant des perturbations assez faibles en termes d'apoptose : en effet, les résultats obtenus par cytométrie en flux semblent contradictoires ou du moins semblent faire ressortir un mécanisme de protection des cellules leur évitant la mort cellulaire par apoptose. Encore une fois, le statut p53 de cette lignée cellulaire y jouerait beaucoup. L'étude des systèmes de réparation de l'ADN pourrait compléter cet aspect.

Rappelons que l'objectif initial de ce travail est centré sur le ciblage mitochondrial des cellules prostatiques par le carbène-Or afin d'engager une radiosensibilisation de cellules prostatiques. Plusieurs observations faites précédemment : localisation *in cellulo* du carbène, survie cellulaire, apoptose, potentiel de membrane, montrent des perturbations importantes en présence de carbènes voire en présence de carbènes et d'irradiation ce qui est en faveur d'une capacité de radiosensibilisation de ces éléments organo-métalliques. Ces observations tendent à converger vers la mitochondrie et leur altération lors des traitements suggère des perturbations du métabolisme mitochondrial au sens large. Afin d'estimer, au niveau moléculaire, les modifications de l'environnement mitochondrial susceptibles d'être à l'origine de ces processus et, ainsi, mieux comprendre le rôle des mitochondries dans les réponses cellulaires aux traitements, nous avons effectué une analyse de certains acteurs de la biogénèse mitochondriale et des phosphorylations oxydatives.

B. Biogénèse mitochondriale

La biogénèse mitochondriale est un processus multifactoriel faisant intervenir, entre autre, des éléments métaboliques (énergétiques) et de la signalisation cellulaire dans laquelle la protéine PGC-1 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Coactivator 1 alpha) joue un rôle clé. En effet, cette protéine favorise l'augmentation des quantités d'ADNmt, des sous-unités de la chaîne respiratoire, etc... (Handschin & Spiegelman, 2006). Une variation de la protéine PGC-1 α , est souvent corrélée à des modifications mitochondriales (augmentation de la masse mitochondriale, des activités respiratoires, ...).

Nos analyses (**Figure 90**) ne mettent pas en évidence de variation notable de la protéine

au cours du temps suite à une irradiation de 2Gy et/ou en présence de carbène 0,5 μ M. Toutefois des concentrations plus élevées de carbène semblent entraîner une diminution de la quantité de PGC-1 α qui s'initie à 2 μ M pour disparaître totalement à 96h en présence de 4 μ M de carbène.

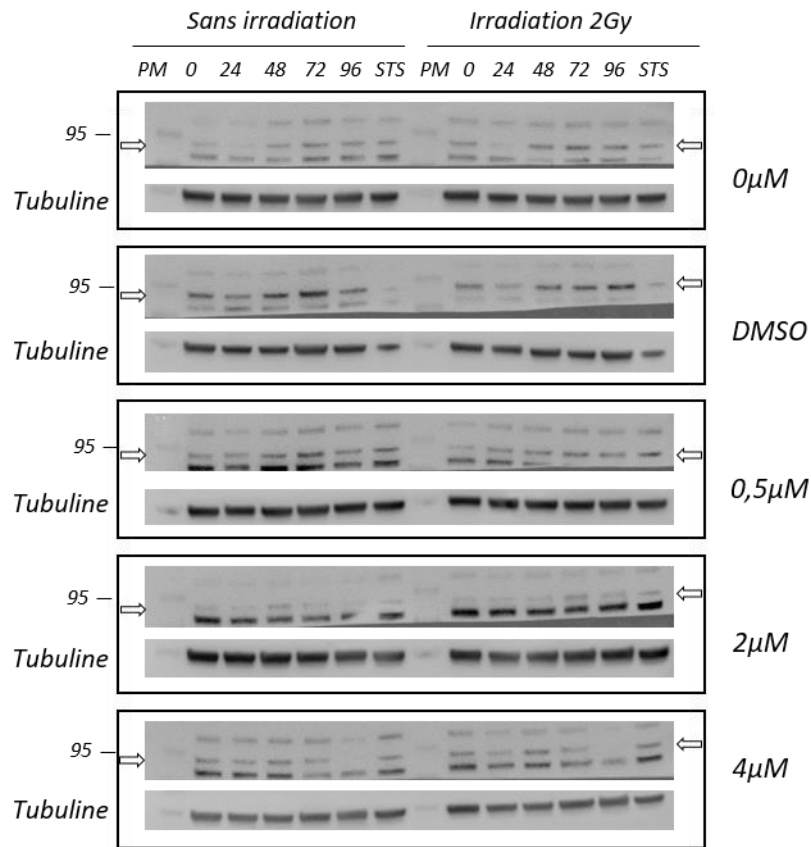


Figure 90: Analyse par Western-blot des effets du carbène en présence ou en absence d'une irradiation de 2Gy, de l'accumulation de PGC-1 α dans des cellules PC3.

PM : Poids moléculaires (95 : position du marqueur 95kDa), les chiffres indiquent les durées post-irradiation (0h à 96h), STS : traitement à la staurosporine. La flèche (gauche et droite) indique la position de la protéine (92kDa). La bande inférieure dans chaque cadre présente le témoin de dépôt : tubuline; n=1.

C. Effets sur l'expression de protéines de la chaîne respiratoire

L'impact du carbène et/ou des irradiations sur la dépolarisation de la membrane mitochondriale nous a poussés à aller voir du côté de la chaîne respiratoire qui pourrait être modifiée. Cette hypothèse a été vérifiée en quantifiant l'expression de cinq protéines impliquées dans la chaîne respiratoire par l'utilisation d'un cocktail les ciblant à la fois : NDUFB8 (complexe I), SDHB (complexe II), UQCRC2 (complexe III), COX2 (complexe IV) et ATP5a

(complexe V). De plus, l'expression de Rieske, une protéine impliquée dans le complexe III a également été analysée.

1. Analyse globale

Le métabolisme énergétique mitochondrial est fortement dépendant de l'organisation correcte des complexes de la chaîne respiratoire. De nombreux déficits énergétiques sont associés à des altérations de ces complexes (absence, mutations, défauts d'assemblage) (Russell & Turnbull, 2014). Ces perturbations conduisent à des modifications du potentiel de membrane pouvant aller jusqu'à l'apoptose. Les résultats obtenus au cours de notre étude, à la fois sur l'apoptose et le potentiel de membrane nous ont incités à analyser l'impact des traitements sur les complexes respiratoires.

L'expérience réalisée ici est faite sur des échantillons cellulaires qui ont été incubés en présence de carbène (ou DMSO) durant 3h puis le carbène a ensuite été éliminé et l'incubation s'est poursuivie dans un milieu dépourvu de carbène durant le temps indiqué. Le protocole est donc modifié par rapport aux expériences précédentes. Cette modification a été réalisée afin de se placer dans des conditions expérimentales permettant de dissocier la toxicité du carbène sur le long terme de l'effet radiosensibilisation seul.

Seuls les profils correspondant aux conditions contrôle (DMSO) et 2 μ M de carbène avec ou sans irradiation à 2 ou 5Gy sont présentés (**Figure 91**).

Bien que préliminaire, ce premier résultat suggère que les traitements, qu'ils soient individuels ou combinés, ont une incidence sur les complexes respiratoires. En effet, nous observons sur l'échantillon témoin DMSO/0Gy (**Figure 91A**) une légère prédominance des signaux correspondant à NDUFB8 (complexe I) et SDHB (complexe II) et une répartition entre les différentes sous-unités qui n'évolue pas au cours du temps. Sous l'effet d'une irradiation à 2 ou 5Gy (**Figure 91 B et C**), une augmentation de la proportion relative d'ATP5a (complexe V) par rapport à UQCR2 (complexe III) est observée, ce dernier devenant quasiment indétectable dès 2Gy. Aucune évolution au cours du temps n'est décelable. Suite à l'incubation des cellules 3 heures en présence de carbène à 2 μ M, une augmentation notable de NDUFB8 (complexe I) et SDHB (complexe II) semble induite alors que l'intensité correspondant aux trois autres complexes est relativement similaire à celle observée au niveau du contrôle (**Figure 91D**). Là encore, aucun effet temps ne peut être affirmé. Enfin, lors du double traitement

carbène + irradiation, outre l'impact sur ATP5a (complexe V) bien visible à 2Gy, on note une perturbation transitoire des complexes I et IV entre 3 et 6h post-irradiation avec une baisse de leur proportion relative. Dès 24h, une restauration de ces 2 complexes et, de façon concomitante, une diminution d'ATP5a (V) sont observées. Les profils suggèrent par ailleurs une évolution au cours du temps avec, progressivement, une prédominance d'ATP5a (V) au dépend des quatre autres, toutefois cette observation ainsi que, plus généralement, l'ensemble du résultat présenté ici doit être confirmé.

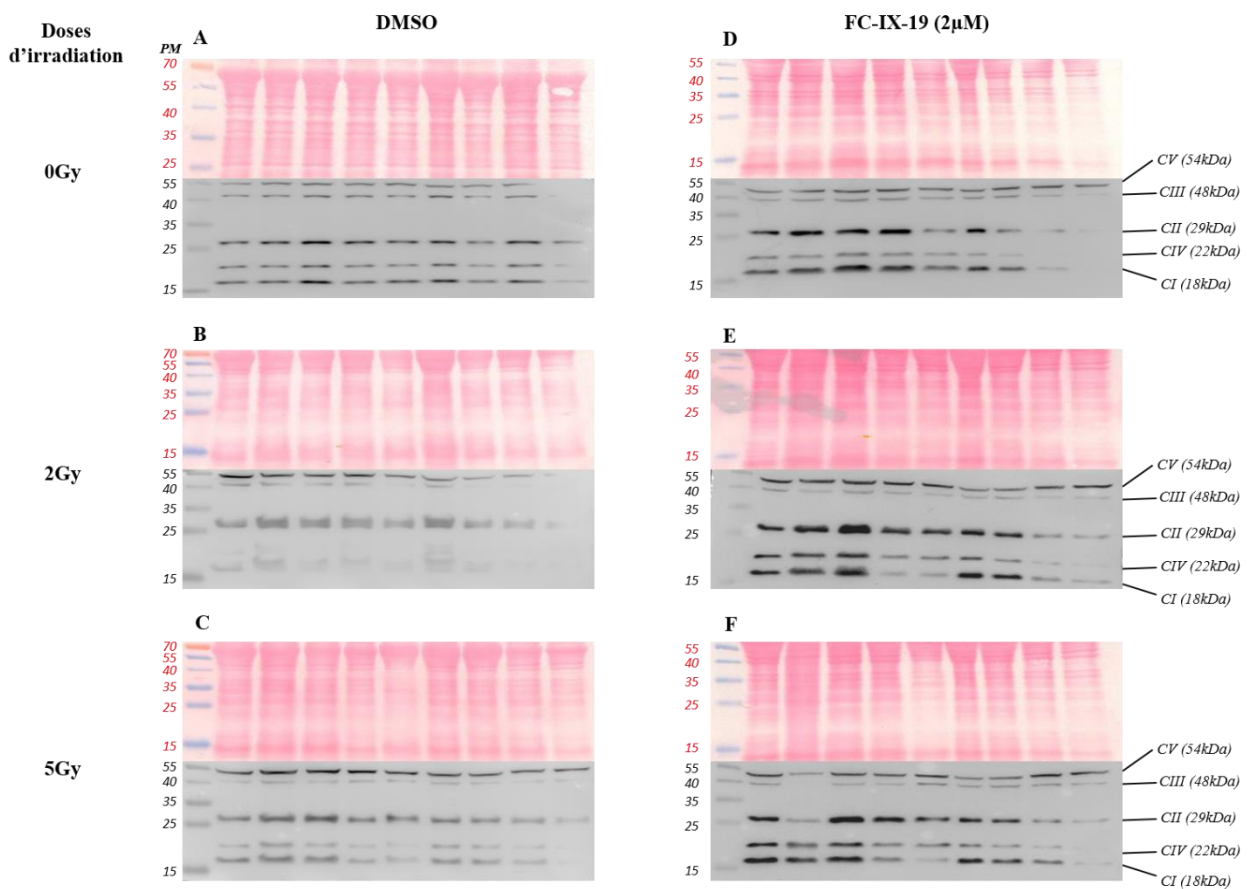


Figure 91 : Analyse par Western-blot des effets du carbène $2\mu\text{M}$, d'une irradiation de 2Gy ou 5Gy ou de la combinaison, sur l'accumulation de sous-unités représentatives de 5 complexes : CI (NDUFB8, CII (SDHB), CIII (UQCRC2), CIV (CoxII), CV (ATP5A) dans des cellules PC3 entre 0h et 96h.

Les nombres 70,55, 40, 35, 25 et 15 indiquent la position des marqueurs de PM correspondants. A : sans traitement, B et C : irradiation 2 et 5Gy respectivement, D : traitement au carbène à $2\mu\text{M}$, E et F : double traitement carbène $2\mu\text{M}$ + 2 ou 5Gy respectivement. Partie supérieure : coloration au rouge Ponceau, partie inférieure : western blot (n=1).

2. Analyse de l'accumulation de la protéine Rieske, sous-unité du complexe III

L'analyse globale des complexes de la chaîne respiratoire montre une altération des complexes et, concernant le complexe III, une variation de son intensité suite aux irradiations. Afin d'aller plus loin dans l'analyse de l'évolution de ce complexe, nous avons étudié l'accumulation de l'un de ses constituants : la protéine Rieske.

En conditions normales (**Figure 92, gauche** : 0 μ M et DMSO sans irradiations), la quantité de protéine Rieske est stable au cours du temps (0 à 96h) et les irradiations n'ont en elles-mêmes aucun effet significatif sur l'accumulation de la protéine (**Figure 92, droite** : 0 μ M et DMSO avec irradiations).

Par contre, nous pouvons noter une disparition progressive de la protéine Rieske au cours du temps en lien avec l'augmentation de la concentration de carbène allant jusqu'à une disparition de la protéine dès 48h d'incubation pour des concentrations de carbène égales à 4 μ M.

L'ensemble des expériences ont été réalisées en maintenant l'incubation avec le carbène tout au long de la cinétique. La partie basse de la figure (pointillé) illustre le résultat obtenu lorsque les cellules sont en présence de carbène 4 μ M durant 3h puis éventuellement soumises à l'irradiation. Le carbène est ensuite éliminé par changement du milieu. De façon intéressante l'accumulation de la protéine Rieske faible à 0h (soit après 3h d'incubation en présence du carbène) est encore plus faible à 24h mais augmente ensuite progressivement jusqu'à 96h. Ce résultat important indique que le carbène joue majoritairement un rôle lors de la synthèse de la molécule Rieske et que cet effet est réversible puisque la suppression du carbène permet un retour à la normale.

Il apparaît donc clairement que le carbène est capable de déstabiliser l'organisation globale de la chaîne respiratoire avec des actions plus spécifiques comme observé ici sur la protéine Rieske. Ces perturbations moléculaires pourraient être à l'origine des atteintes fonctionnelles constatées sur le potentiel de membrane mitochondrial.

La protéine Rieske possède un centre Fe-S sous un état FeIII, propice aux échanges avec l'or (Ali et al., 2014; Y. Ouyang et al., 2018). Ceci pourrait expliquer nos résultats obtenus en

présence de carbène sur la perte de l'accumulation de Rieske mais également la déstabilisation des sous-unités du complexe III (même dans des conditions où le carbène n'est maintenu que 3h).

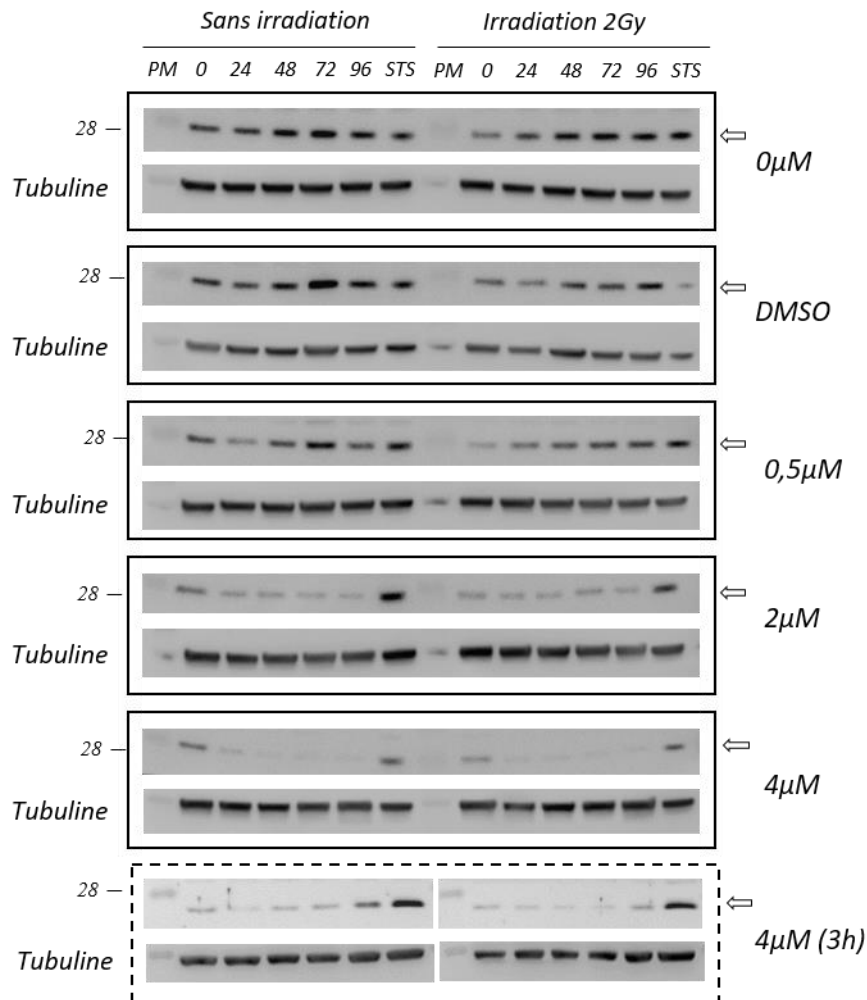


Figure 92: Analyse par Western-blot des effets du carbène en présence ou en absence d'une irradiation de 2Gy, sur l'accumulation de la protéine Rieske (cellules PC3).

PM : Poids moléculaires (28 : position du marqueur 28kDa), les chiffres indiquent les durées post-irradiation (0h à 96h), STS : traitement à la staurosporine. La flèche indique la position de la protéine (26kDa). La bande inférieure dans chaque cadre présente le témoin de dépôt : tubuline ; n=3.

Les résultats obtenus sur l'expression des protéines de la chaîne mitochondriale sont toutefois à prendre avec précaution puisque ces expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois. Nous pouvons cependant nous fier à l'analyse faite sur l'expression de Rieske puisque les expériences ont été réalisées trois fois et la présence de référence (ici, la tubuline, assez uniforme sur les différentes pistes), nous a permis de comparer les différentes conditions.

***DISCUSSION GENERALE ET
CONCLUSION***

Les composés organo-métalliques sont des éléments utilisés depuis plusieurs années dans le cadre des stratégies thérapeutiques anti-tumorales pour plusieurs types de cancers (pour revues, Contel & Nayeem, 2021; Rottenberg et al., 2021). Ils ont largement contribué à l'amélioration des approches chimiothérapeutiques.

De nouvelles stratégies sont en plein essor concernant ces composés en dérivant leur destination initiale vers des approches radiothérapeutiques (Zeng et al., 2021). Parmi ces molécules, les études sur les carbènes restent encore minoritaires par rapport à celles sur les nanoparticules par exemple. L'étude développée dans ce manuscrit nous permet d'avoir une vue globale et d'évaluer l'implication de la mitochondrie à la fois dans les processus de radiorésistance du cancer de la prostate, mais aussi dans les stratégies de radiosensibilisation *via* le ciblage de cet organite.

Nos travaux ont été réalisés sur deux lignées cellulaires : PC3 et LNCaP. Les différences de ces deux lignées quant à l'expression de AR permet dans un premier temps d'avoir deux profils différents ayant lieu dans la progression du cancer de la prostate : la dépendance aux androgènes, participant à l'initiation de la tumorigénèse, puis la perte de cette dépendance associée aux cancers résistant à la castration ou à la radiothérapie (Abate-Shen & Shen, 2000). Elles diffèrent également quant à l'expression de p53, surnommé « gardien du génome » et dont les mutations jouent un rôle essentiel dans la progression tumorale (Horoszewicz et al., 1980, 1983; Kaighn et al., 1979; Mantovani et al., 2019).

I. Choix des composés organométalliques

L'essor de la nanomédecine a permis le développement de divers types de composés organométalliques tels que les nanoparticules et les carbènes. Nombreuses sont les études sur les nanoparticules et même si plusieurs études ont montré leur internalisation cellulaire, les carbènes nous ont semblé plus intéressants pour plusieurs raisons. Un des objectifs de nos travaux était de cibler la mitochondrie. Les carbènes sont des cations de Skulachev. Ils possèdent une structure organique lipophile et cationique leur permettant de traverser les membranes hydrophobes et de s'accumuler du côté matriciel mitochondrial où le potentiel est plus électronégatif (Lieberman et al., 1969). De plus, la localisation mitochondriale de carbènes-or a été démontrée dans d'autres modèles cellulaires (Baker et al., 2006; Hickey et al., 2008).

D'autre part, les potentiels de membranes plasmiques et mitochondriales des cellules tumorales sont plus élevés que dans une cellule « normale » (Davis et al., 1985) font que ces cations lipophiles vont davantage cibler les cellules tumorales. Par ailleurs, l'or est un métal toléré physiologiquement. Tous ces points portent à croire que le carbène choisi pourrait être un agent thérapeutique intéressant. Enfin, la combinaison entre un carbène à ciblage mitochondrial et des irradiations X n'a jamais été réalisée encore, ce qui attribue une certaine originalité à ce projet. Ce dernier point nous permet d'aborder et de discuter notre choix de type d'irradiation.

II. Choix du type de radiations ionisantes et des doses d'irradiation

Les photons (rayons X, rayons gamma) et les hadrons (protons et ions carbone) sont très utilisés en radiothérapie. Des études ont montré par des simulations Monte Carlo, une meilleure radiosensibilisation des cellules en utilisant des photons d'énergie de l'ordre du keV, par rapport à des protons ou ions carbone. De plus, plus l'énergie était basse, plus l'efficacité était importante : en effet, des SER de 1,36 ; 1,04 et 1,01 furent obtenus avec des rayons X de 50 keV, 250 keV et 1MeV (Rudek et al., 2019).

Notre choix des rayons X a été également influencé par la disponibilité d'un irradiateur à rayons X sur le site du campus (Pavirma). Enfin, le choix de la dose d'irradiation de 2Gy s'est fait en se basant sur les doses pratiquées en radiothérapie conventionnelle (Haute Autorité de la Santé, Société Française de Radiothérapie Oncologique) et celle de 5Gy, dans le but d'induire plus de dégâts.

III. Impacts cellulaires et mitochondriaux de nos traitements

A. Impact du carbène seul

Plusieurs aspects cellulaires ont été analysés dans nos travaux. Tout d'abord, nos résultats confirment la localisation mitochondriale du carbène, et ce, dans les deux lignées cellulaires (**Figure 59**). La caractérisation du carbène a permis de mettre en évidence ses capacités cytotoxiques et cytostatiques : en effet, il inhibe la prolifération et la croissance cellulaire. Ceci s'est manifesté par une légère augmentation de populations apoptotiques et nécrotiques (uniquement aux fortes concentrations) dans les cellules PC3. Cette augmentation était plus marquée dans les cellules LNCaP qui dès le départ montraient une sensibilité plus

marquée par rapport au premier type cellulaire. Toutefois, dans les cellules PC3, l'analyse d'acteurs moléculaires impliqués dans le déclenchement de l'apoptose (clivage de la PARP) (**données non montrées**), n'a pas permis de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu, même si le potentiel de membrane mitochondriale a été altéré par la présence du carbène. De plus, nos analyses sur le déclenchement de l'autophagie sont restées infructueuses. Les analyses du cycle cellulaire par cytométrie en flux, des dommages de l'ADN par southern blot et de l'expression par western blot de γ H2AX et 53BP1 (**données non montrées**), deux acteurs impliqués dans les réparations de dommages, sont également restées infructueuses. Même si les mécanismes de cytotoxicité du carbène ne sont pas clairs dans les cellules PC3, il en ressort tout de même d'une part, une implication de la mitochondrie, matérialisée par la perte du potentiel de membrane mitochondriale mais également par les altérations des sous-unités de la chaîne respiratoire. Ce dernier point corrèle parfaitement avec l'expression de Rieske, une protéine du complexe III, dont l'accumulation décroît de manière dose et temps- dépendants. La légère perte de PGC-1 α peut également être liée à ces événements. En effet, une baisse transitoire de son accumulation a été observée entre 72 et 96 heures après un traitement avec 4 μ M de carbène. La perte de ce facteur est liée à une agressivité du cancer de la prostate, en induisant c-myc (Torrano et al., 2016).

Le comportement des cellules LNCaP est cependant différent sur certains aspects et pourrait par conséquent nous donner quelques pistes de réflexion sur les observations faites sur les cellules PC3. En effet, même si seule la cytotoxicité du carbène a pu être déterminée dans cette lignée cellulaire (détermination de l'IC₅₀), ces dernières ont montré une entrée en apoptose et nécrose plus importante par rapport à la lignée cellulaire PC3. Combinée à cette observation, un arrêt dans le cycle en phase G0/G1 a également été observé suite au traitement au carbène dans la lignée LNCaP. Ainsi, les mécanismes impliqués dans la cytotoxicité du carbène dans les cellules LNCaP dépendraient probablement de p53, puisque ces observations n'ont pas été faites sur les cellules de la lignée PC3. Des expériences dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire et le cycle cellulaire de ces cellules restent toutefois à faire. La faible adhérence de ces cellules, ainsi que leur faible capacité à cloner pourrait être palliée par l'utilisation de sphéroïdes.

B. Impact des irradiations

Les comportements des deux lignées cellulaires semblent similaires quant aux effets des irradiations, à quelques exceptions près. La prolifération des cellules PC3 est sensible à une irradiation de 5Gy contrairement à la dose de 2Gy. Dans ce cas, des voies apoptotiques sont également impliquées, certes dans une moindre mesure et ce, malgré la dépolarisation de la membrane mitochondriale. De même, le déclenchement de mécanismes tels que le clivage de la PARP et des caspases 3 et 9 n'ont pas été relevés (**données non montrées**). L'analyse d'autres voies de mort cellulaire, l'autophagie en l'occurrence s'est également révélée infructueuse. De la même manière, les analyses de dommages à l'ADN par southern blot et par western blot n'ont pas donné de résultats concluants malgré de nombreuses répétitions. Cela pourrait s'expliquer par un taux de protéines trop faible à détecter ou un manque de spécificité des anticorps dans le cas du western blot. Malgré la présence d'un contrôle positif (cellules irradiées à 15Gy), aucune bande n'ayant été détectée, nous pencherons plutôt du côté de la première hypothèse. En southern blot, malgré une spécificité des amorces, aucune augmentation des cassures n'a été observée malgré une longue exposition des membranes lors des révélations, probablement à cause d'un faible taux de cassures par rapport aux formes totales.

Le cycle cellulaire n'est pas non plus atteint, contrairement à ce à quoi nous aurions pu nous attendre, en nous basant sur les données de la littérature. Tout comme les cellules PC3, les cellules LNCaP ont montré une induction de l'apoptose mais également de la nécrose à la suite des irradiations. Mais contrairement aux cellules PC3, cette induction de la mort cellulaire serait une conséquence d'un arrêt en phase G2/M et de la perte du potentiel de membrane mitochondriale.

Les comportements des deux lignées cellulaires nous font ainsi penser à des mécanismes différents mis en place, indépendamment du statut p53, notamment pour la lignée PC3.

C. Le carbène radiosensibilise-t-il les deux lignées cellulaires prostatiques ?

Notre étude a montré une potentialisation des effets des irradiations par le carbène sur les capacités prolifératives et de croissance des lignées. Toutefois, les mécanismes mis en place

et les comportements des deux lignées diffèrent également. Dans les cellules PC3, la radiosensibilisation passerait par l'induction de l'apoptose, observée uniquement à de fortes doses ($IC_{50} + 5Gy$). Un arrêt du cycle cellulaire est également impliqué dans ces mécanismes : en effet, alors que ni le carbène, ni les irradiations n'induisent de modifications du cycle cellulaires de la lignée PC3, la combinaison des deux traitements mène à un arrêt du cycle en phase G2/M. Ainsi, les cellules n'arriveraient pas à réparer les dommages induits et rentreraient donc en apoptose. Les mécanismes de déclenchement de l'apoptose passeraient par une dépolarisation de la membrane mitochondriale, une altération des sous-unités de la chaîne respiratoire, même si aucune potentialisation due à la combinaison n'est observée à ces niveaux en raison de la forte cytotoxicité du carbène. Pour les mêmes raisons de forte cytotoxicité du carbène, aucune radiosensibilisation n'a été observée sur la lignée LNCaP.

À de faibles concentrations de carbène, une sélection de cellules résistantes pourrait se mettre en place, permettant ainsi aux cellules d'abroger les effets de la combinaison des traitements et par conséquent de proliférer dans le temps. L'analyse de systèmes de réparation serait une piste importante pour la compréhension du comportement cellulaire à ces doses. Une partie de ces cellules mettrait ainsi en place des mécanismes de survie qui pourraient impliquer Akt. Akt est activée par plusieurs cascades de signalisation, parmi lesquelles, majoritairement la liaison de ligands aux récepteurs à tyrosine kinase (RTK), aux récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), aux *Integrin-linked kinases* (ILK). L'activation de ces voies induit un recrutement d'Akt à la membrane cellulaire et son activation par phosphorylation de résidus sérine et thréonine. Par ailleurs, les GPCR peuvent également activer la voie PI3K-Akt en transactivant les RTK. L'activation d'Akt par sa phosphorylation a été démontrée comme un événement participant à la tumorigénèse mais également à la progression et à la radio-résistance du cancer de la prostate, en permettant la survie des cellules mais également la résistance à l'apoptose (Chang et al., 2017; Xin & Deng, 2006). Sa phosphorylation a été corrélée à la perte de PTEN. Un effet inhibiteur de nanoparticules d'or sur la progression du cancer de la prostate dans des modèles cellulaires et murins passant par une régulation des voies impliquant p27, CHK1, la cycline D1, CDK1, *p-AMP-activated protein kinase* (AMPK) et Akt. Les mécanismes mis en place impliqueraient une induction de voies apoptotiques dépendant de p53 (Lu et al., 2017). De plus, une activation de la voie PI3K-Akt en réponse aux irradiations dans plusieurs types de cancers dont le cancer de la prostate a été mise en évidence dans plusieurs études (Chen et al., 2020; Gupta et al., 2002; Kim et al., 2006; Skvortsova et al., 2008).

Lorsqu'elles sont irradiées, les cellules tumorales mettent en place divers mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN afin de se protéger comme par exemple un arrêt transitoire du cycle cellulaire. Suite à cela, des mécanismes de réparation de l'ADN comme le NER, le BER, et les voies de réparation des CDB sont mis en place : HR pendant la phase G2/M ou NHEJ pendant toute la durée du cycle cellulaire (Hoeijmakers, 2001). Le rôle d'Akt a été mis en évidence dans l'activation des voies de réparation des CDB (Toulany, 2019; Toulany & Rodemann, 2015). Ainsi, le ciblage de cette voie par des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs a été favorable dans la radiosensibilisation de lignées cancéreuses (Chang et al., 2015). Cependant, cette radiosensibilité se perd par la suite par une réactivation de la voie de signalisation PI3K-Akt, de manière assez précoce (48 heures) dans certains modèles. En effet, cette voie de signalisation occupe une place centrale dans l'ensemble des mécanismes impliqués dans la survie et la réponse aux thérapies de cellules tumorales. L'inhibition de la voie PI3K-Akt, serait compensée par l'activation d'autres voies de signalisation telles que celles des MAPK, elles aussi impliquées dans la tumorigénèse. Le ciblage de plusieurs acteurs de ces voies pourrait être encore plus favorable à la sensibilisation des cellules tumorales (pour revue, Iida et al., 2020). Ainsi, l'inhibition seule des MAPK dans la lignée cellulaire DU145 a induit un baisse significative de la survie clonogénique et une activation de la mort cellulaire par apoptose et par des voies non apoptotiques, notamment grâce entre autres au statut de PTEN dans cette lignée cellulaire (Hagan et al., 2000). De plus, la double inhibition des MAPK et d'Akt par l'antrocine sensibilisait les cellules tumorales prostatiques à la radiothérapie par une inhibition de la voie de l'IGF (*Insulin-Like Growth Factor*) (Chen et al., 2018). Par ailleurs, la combinaison d'inhibiteurs d'Akt et de la FGF (*Fibroblast Growth Factor*) a des effets additifs en inhibant de multiples voies de signalisation et en atténuant la régulation positive compensatoire de la signalisation FGFR induite par l'inhibition de l'AKT kinase, ceci dans des modèles de cancer de la prostate *in vitro* et *in vivo* (Feng et al., 2017). De plus, une étude clinique en phase II a montré les effets favorables de la combinaison d'un inhibiteur d'Akt, l'Ipatasertib à l'Abiraterone chez des patients résistant à la castration et qui présentent une perte de l'expression de PTEN par comparaison à ceux qui étaient positifs à PTEN (de Bono et al., 2019). Il serait alors intéressant d'analyser l'activation d'Akt dans nos conditions expérimentales, sur les lignées PC3 et LNCaP mais également sur une lignée cellulaire de tumeur prostatique qui exprime PTEN comme les cellules de la lignée VCaP (issues de métastases de vertèbres lombaire et exprimant AR sous sa forme sauvage).

Pris ensemble, nos résultats montrent la capacité radiosensibilisatrice du carbène FC-IX-19 en ciblant la mitochondrie et en induisant des mécanismes qui ne seraient pas dépendants de p53. Les effets du carbène ne passeraient pas par l'amplification des effets des irradiations mais, du moins, par des dommages à la cellule, qui la radiosensibiliseraient en la fragilisant.

PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats obtenus montre le potentiel radiosensibilisateur d'une molécule de type carbène même si les modalités ne semblent pas associées à un rehaussement de dose local mais plutôt entre autres à une déstructuration mitochondriale conduisant à une sensibilité accrue aux rayonnements X.

Les perspectives que nous ouvrons dans ce cadre se déclinent en quatre grands axes :

- Acquisition de données comparatives plus larges entre les modèles cellulaires
- Étude mécanistique des réponses cellulaires aux carbènes et aux irradiations combinés
- Approfondissement des réponses mitochondriales
- Ouverture à d'autres types de rayonnements

I. Acquisition de données comparatives plus larges entre les modèles cellulaires

Les résultats obtenus jusqu'à présent se heurtent à des difficultés de culture inhérentes au modèle LNCaP. Ils nécessitent d'être approfondis et vérifiés sur les deux modèles cellulaires. En effet, les cellules LNCaP présentent des caractéristiques complémentaires aux cellules PC3 mais comme évoqué précédemment, n'ont pas pu être analysées sur certaines expérimentations (comme la clonogénicité).

Ces aspects devront donc être repris en utilisant par exemple différents types de molécules d'adhérence (*coating*) permettant une meilleure croissance cellulaire.

L'expression de AR et la réponse des cellules LNCaP aux androgènes est aussi une variable qu'il conviendrait d'exploiter dans le but d'améliorer le comportement et l'analyse de ces cellules. L'addition de testostérone ou mieux, de DHT permettrait d'augmenter les capacités de prolifération de ces cellules.

II. Étude mécanistique des réponses cellulaires aux carbènes et aux irradiations combinées

Il ressort clairement de nos études que les mécanismes mis en place diffèrent entre les deux lignées cellulaires. Ces différences seraient liées à leur statut p53 mais peut-être également à leur statut AR. L'analyse de l'expression de ces facteurs, surtout en présence de faibles concentrations de carbènes et de dose d'irradiation pourrait apporter une piste supplémentaire dans la compréhension des comportements de ces cellules. En effet, une perte de l'expression de AR pourrait être associée à la mise en place de mécanismes de résistance. Dans ces mêmes conditions, l'analyse de systèmes de réparation de dommages à l'ADN semble intéressante. Ainsi, l'inhibition d'acteurs de HR et NHEJ pourrait être couplée au double traitement afin de voir l'évolution dans le temps de nos différents paramètres cellulaires et mitochondriaux. Nos analyses de southern blot et de western blot montrant une absence de cassures suite à aux traitements et double traitements peuvent être complétés par des analyses en immunocytochimie avec l'observation de foci γ H2AX et 53BP1.

L'analyse d'autres voies de mort cellulaire (apoptose dépendant des céramides, mitophagie) semble également intéressant compte tenu dans un premier temps du comportement des cellules PC3 face au clivage de la PARP, mais également face à l'altération du potentiel de membrane mitochondriale observée dans les deux lignées cellulaires. Associée à ces points, l'étude de l'activation d'Akt par sa phosphorylation nous permettrait d'avoir une analyse plus complète des mécanismes mis en jeu dans les cellules.

L'ensemble de ces études a de plus été réalisé dans un contexte de cultures classiques en 2 dimensions. La complexité de l'environnement tumoral et de la tumeur elle-même avec des zones hypoxiques voire anoxiques constitue un défi pour les approches radiothérapeutiques. Le passage aux cultures en 3 dimensions de type sphéroïdes permettraient ainsi (1) éventuellement de pallier les difficultés de culture des cellules LNCaP en 2D, (2) de se rapprocher de modèles plus proches de la réalité tumorale et (3) de mimer l'hétérogénéité tumorale avec des pressions partielles en oxygène variables, source de réponses différentes à la radiothérapie. Ces lignées cellulaires peuvent être cultivées en 3D comme le montrent les différentes études sur ces modèles (Grayson et al., 2021; Kucinska et al., 2021; Pinto et al., 2020; Rodríguez-Dorantes et al., 2021).

III. Approfondissement des réponses mitochondriales

Une partie des réponses cellulaires aux rayonnements est associée à la pression partielle en oxygène au sein de la tumeur (pour revue, Kabakov & Yakimova, 2021), cet aspect rejoint fortement le fonctionnement mitochondrial.

Une étude plus approfondie de la biogenèse mitochondriale serait intéressante. En effet, il a été démontré que la perte de l'expression de PGC-1 α était associée à un phénotype plus agressif des cancers, en promouvant leur prolifération, migration et invasion, avec une implication de c-Myc. Nos résultats sur les cellules PC3 ont montré une baisse transitoire de l'accumulation de cette protéine. L'étude de capacités migratoires des cellules serait un point supplémentaire.

Plusieurs autres facteurs mitochondriaux seraient également intéressants tels que l'analyse biochimique de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, au vu du profil, certes préliminaire, observé. Les différentes altérations pourraient également impacter la respiration cellulaire. De nombreuses études ont montré que l'activité antitumorale de certains composés organométalliques impliquait également la régulation de la production de ROS (Coulter et al., 2012; Khalili Fard et al., 2015; Mateo et al., 2014). De plus, la quantification de l'ADNmt ainsi que l'analyse de la masse mitochondriale pourraient compléter de manière intéressante nos résultats.

Nombreuses sont les études qui ont mis en évidence l'inhibition de la TrxR. Ainsi, l'analyse de ce paramètre nous permettra de comprendre l'induction de l'apoptose et la baisse du potentiel de membrane mitochondriale observées dans nos cellules (Hickey et al., 2008; Urig et al., 2006).

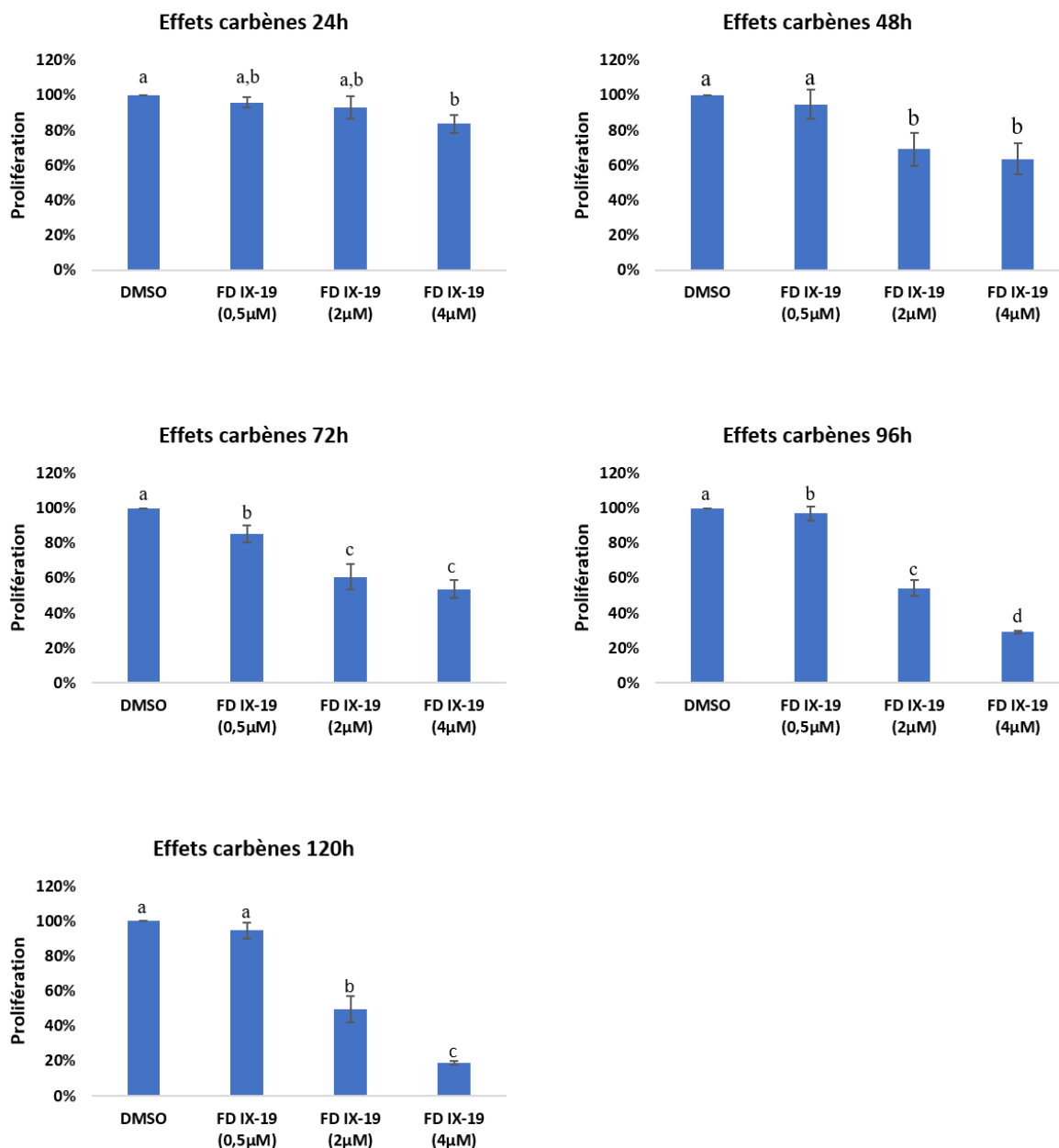
IV. Ouverture à d'autres types de rayonnements

Dans plusieurs types de cancers, les effets des rayonnements ionisants sont obtenus indépendamment de l'énergie de ces derniers (keV ou MeV), ce qui n'est pas le cas du cancer de la prostate et plus précisément, des cellules PC3. En effet, de meilleurs résultats ont été obtenus avec des photons de 6 MeV. Il serait également intéressant d'étudier les comportements cellulaires dans ces conditions, associées au carbone. L'ouverture à d'autres types de

rayonnements (protons par exemple), semble également intéressante. Cela pourrait être abordé avec des protons sur les différentes plateformes de l'IN2P3 du CNRS (dont fait partie le laboratoire) avec des énergies différentes : 3 MeV (CENBG, Bordeaux ou IP2I, Lyon), 25 MeV (IPHC, Strasbourg) voire au-delà de l'IN2P3 avec par exemple le Centre Antoine Lacassagne de Nice (65 MeV et 230 MeV).

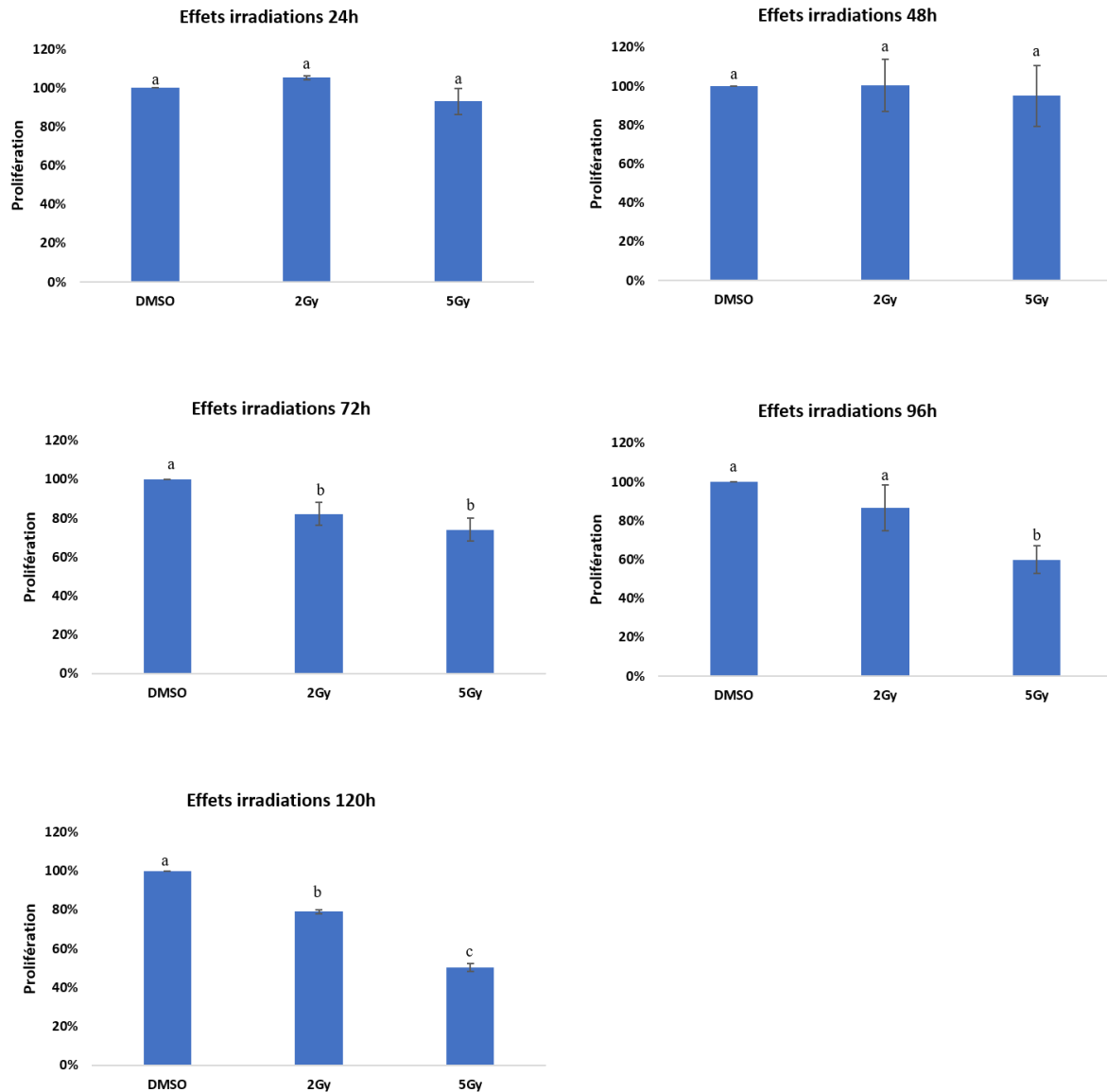
Nous terminerons en précisant que l'intérêt thérapeutique du composé organométallique n'aurait pas de sens sans une analyse de ses effets, seul, ou en combinaison avec des radiations ionisantes, sur des cellules prostatiques saines afin de valider la spécificité d'actions des carbènes sur ces cellules et le comportement différentiel par rapport aux cellules tumorales.

ANNEXES



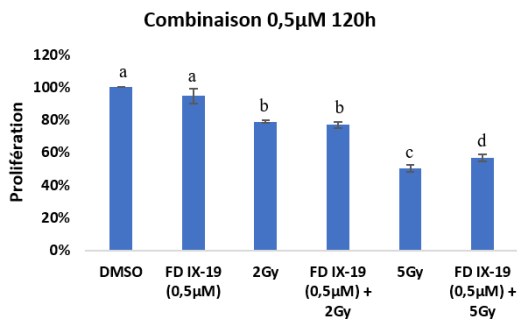
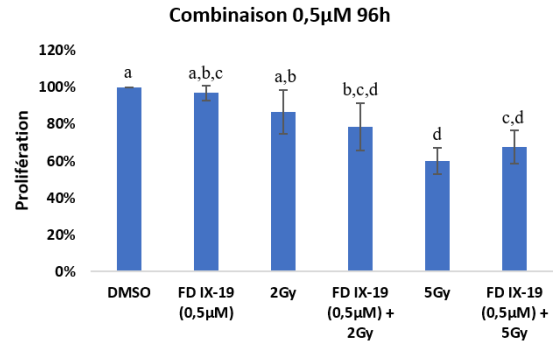
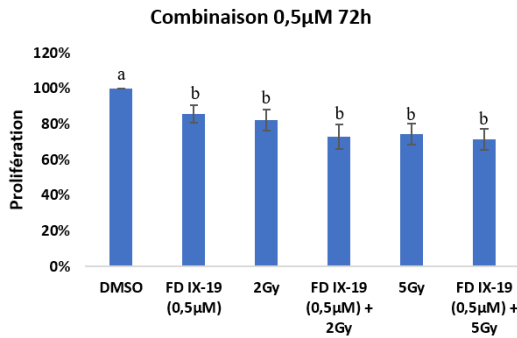
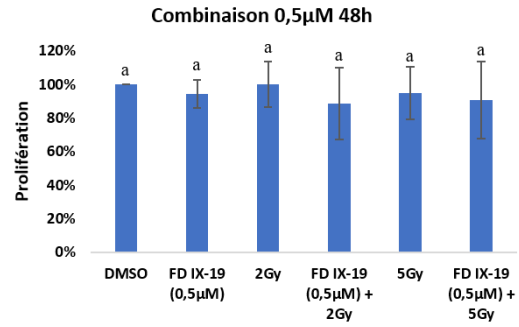
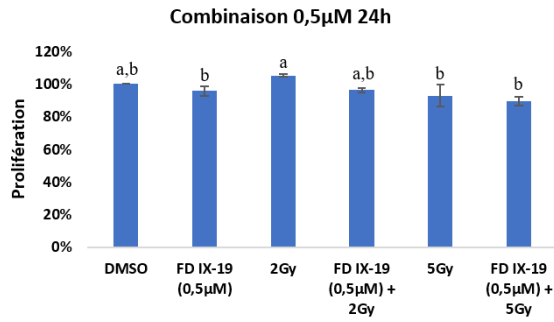
Annexe 1: Effets du carbène sur la prolifération cellulaire de 24 à 120 heures. Les cellules PC3 ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit.

Les données (moyenne \pm SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$.



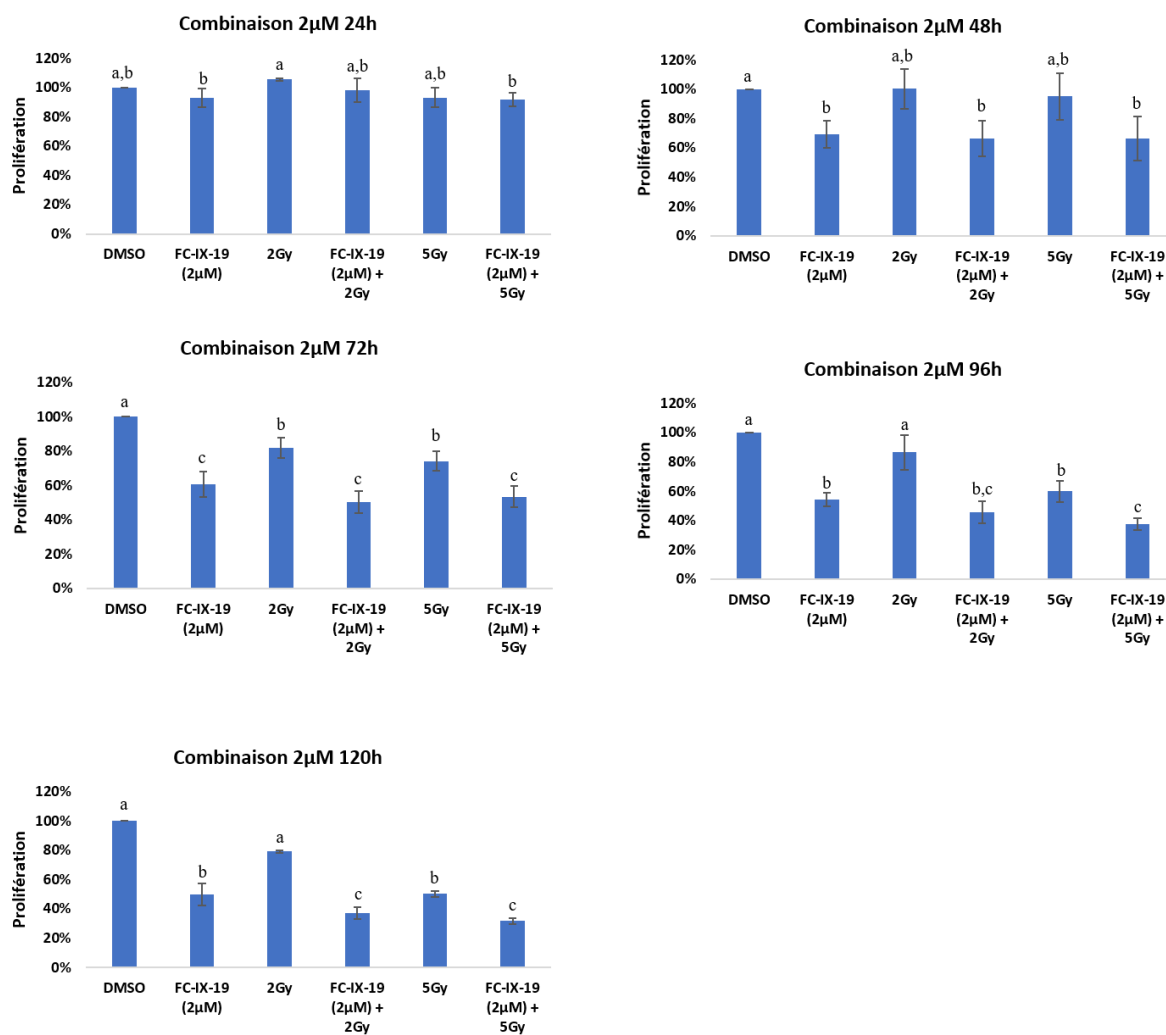
Annexe 2 : Effets des irradiations sur la prolifération cellulaire de 24 à 120 heures.

Les cellules PC3 ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$.



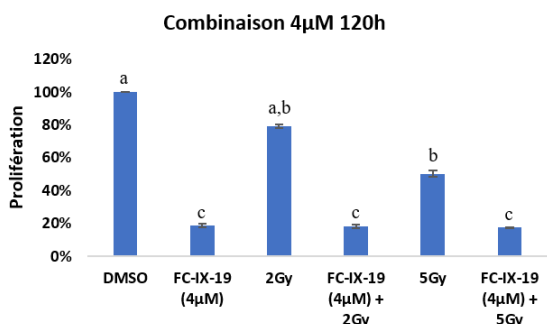
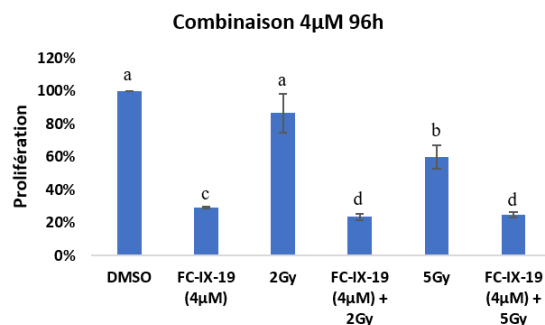
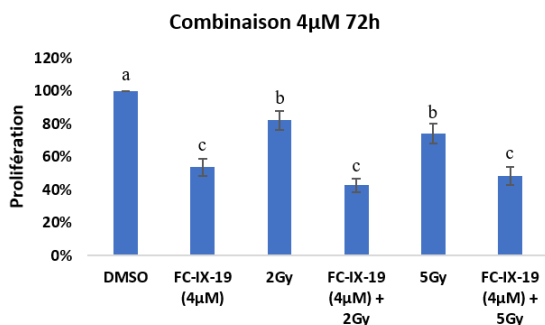
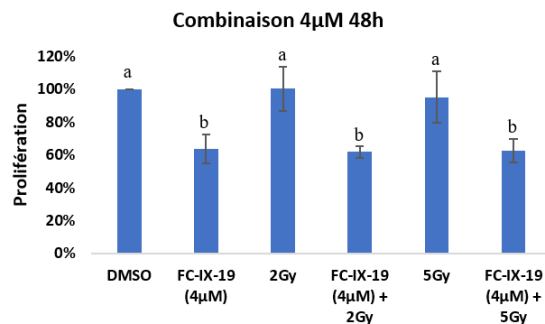
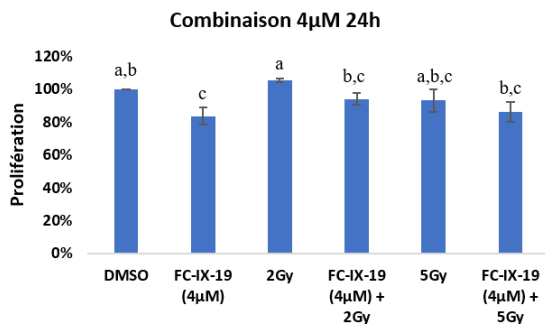
Annexe 3: Effets des combinaisons avec 0,5µM de carbène sur la prolifération cellulaire de 24 à 120 heures.

Les cellules PC3 ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$.



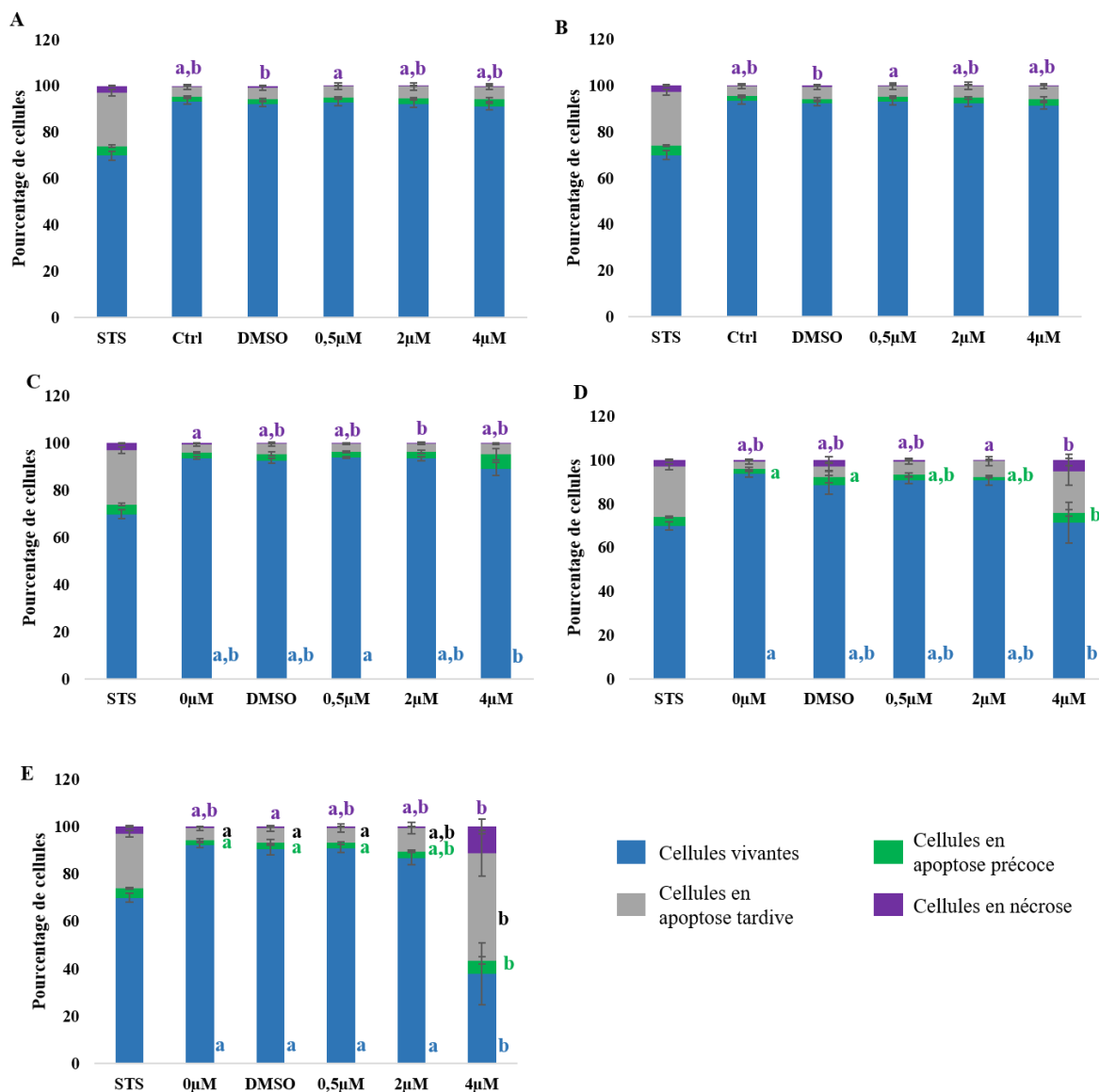
Annexe 4: Effets des combinaisons avec 2µM de carbène sur la prolifération cellulaire de 24 à 120 heures. Les cellules PC3 ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit.

Les cellules PC3 ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$.



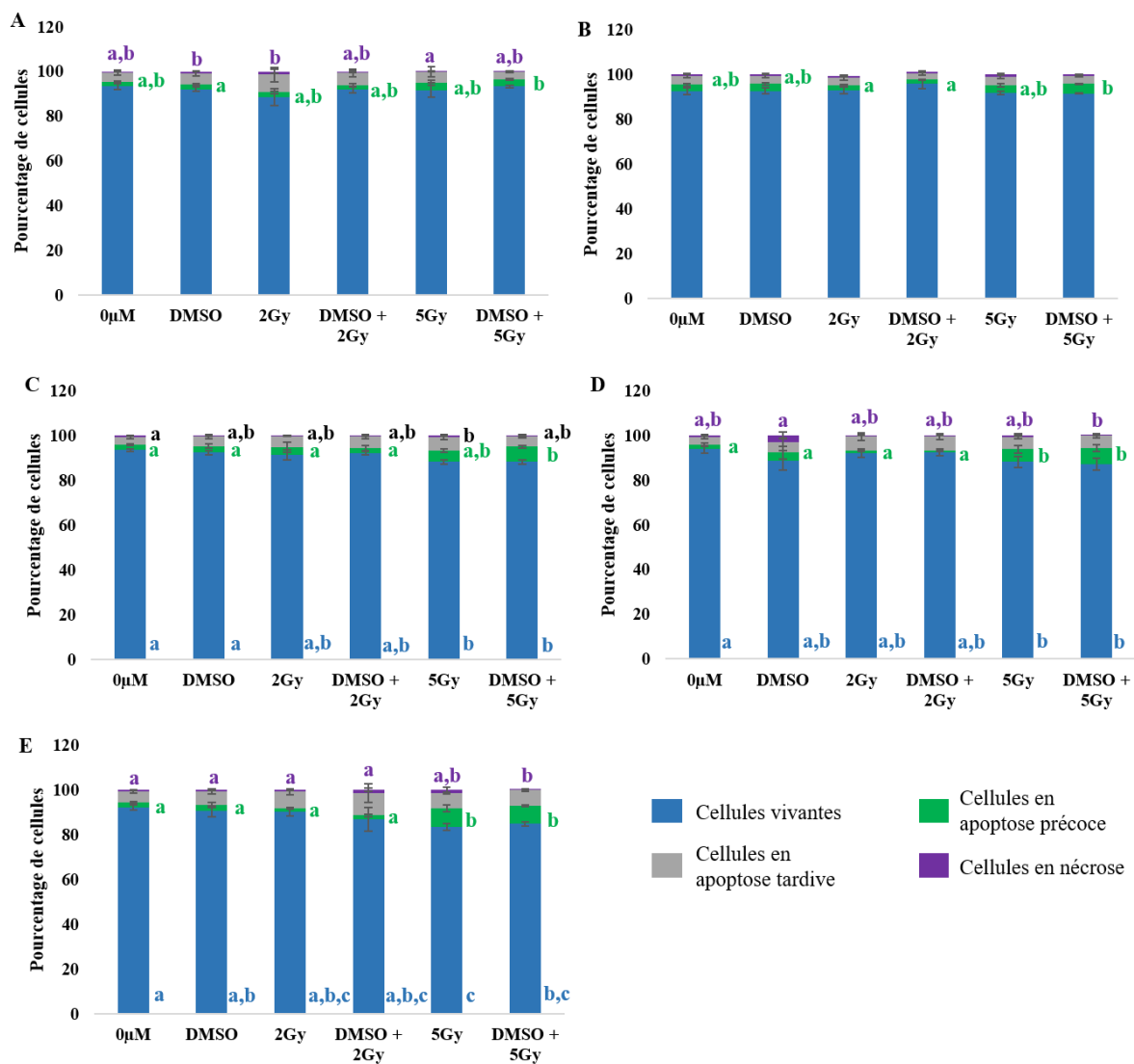
Annexe 5: Effets des combinaisons avec 4 μ M de carbène sur la prolifération cellulaire de 24 à 120 heures. Les cellules PC3 ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit.

Les cellules PC3 ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Conover-Iman. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes; $p < 0,05$.



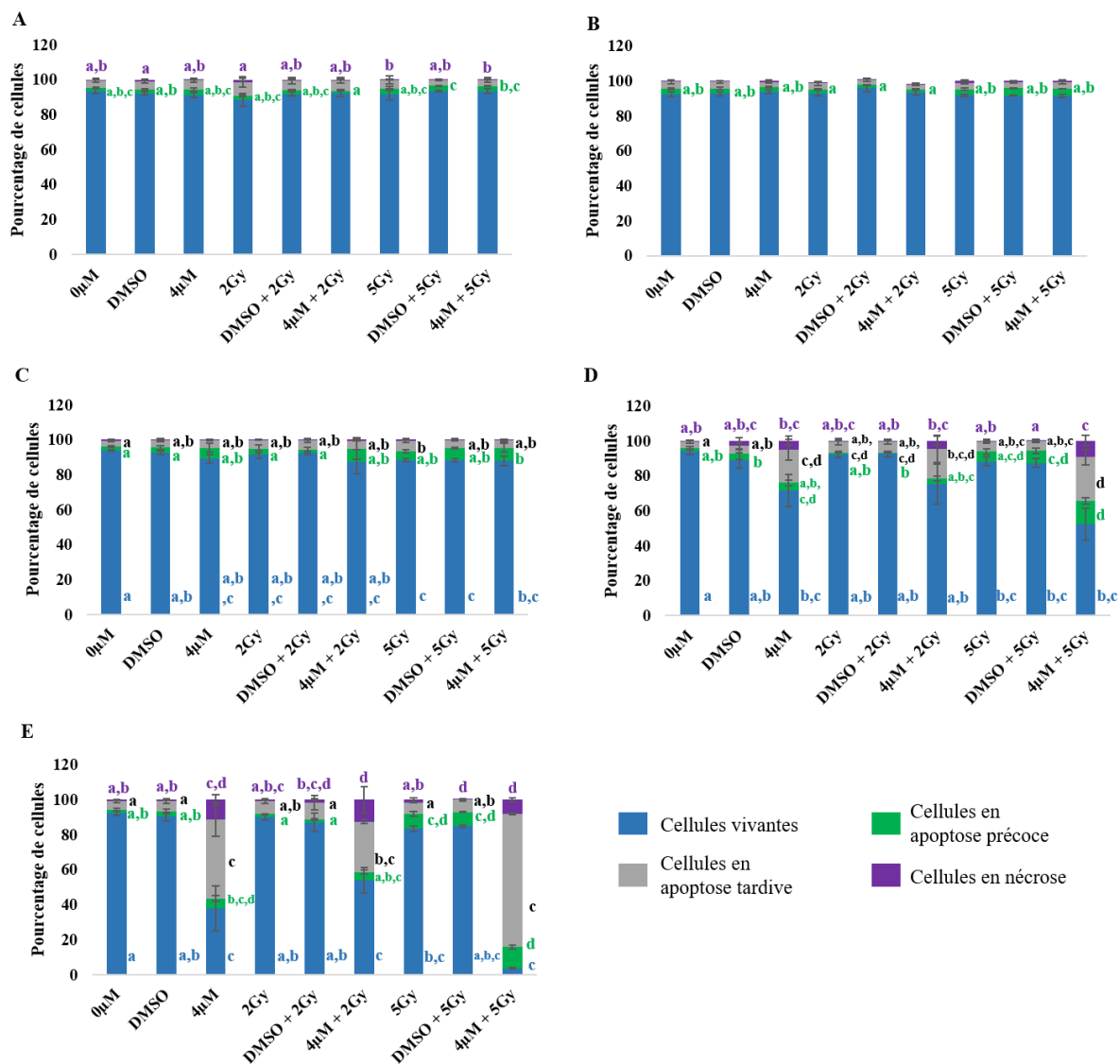
Annexe 6: Analyse par cytométrie en flux des effets du carbène sur la mort cellulaire dans les cellules PC3 à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.



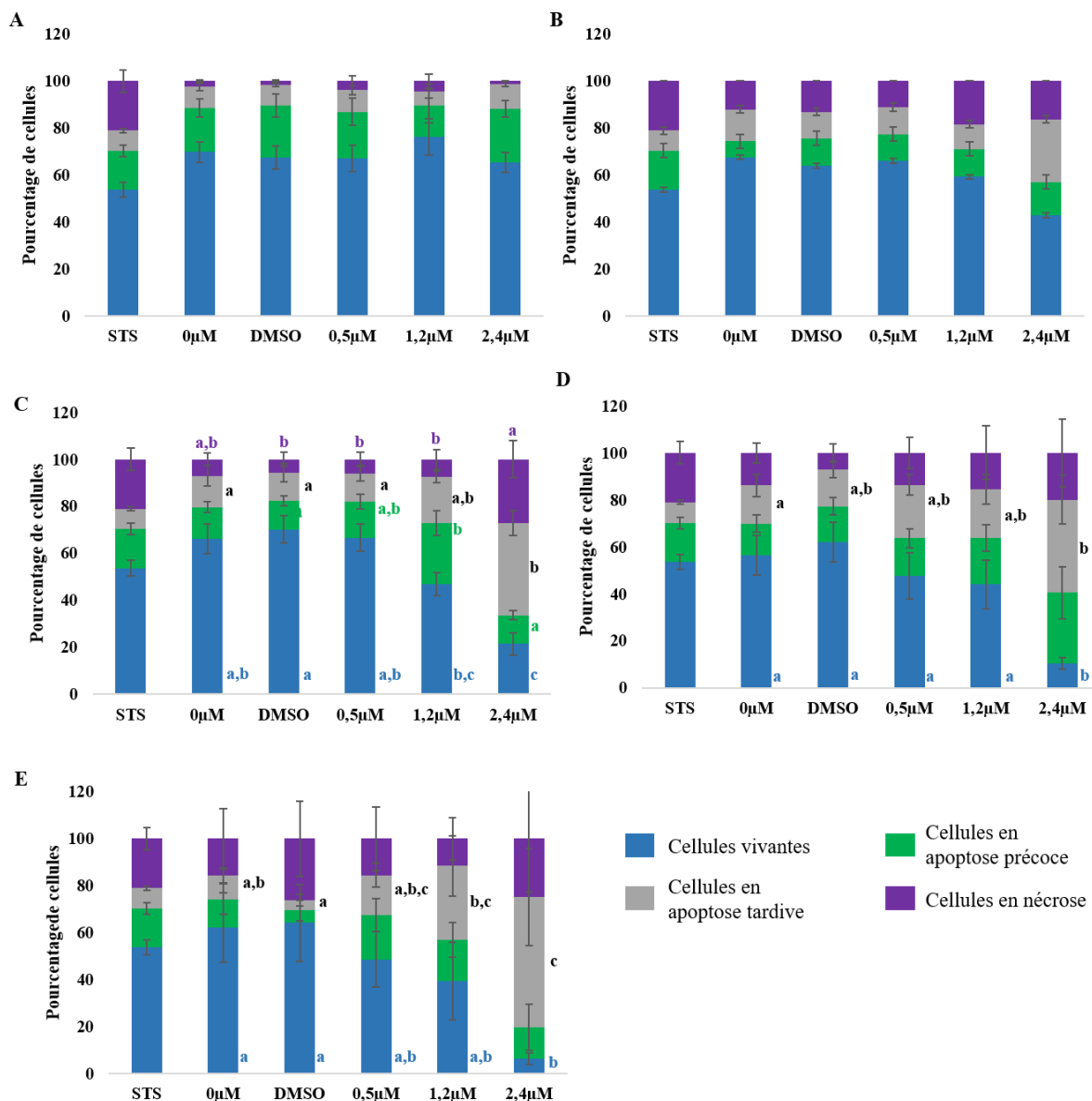
Annexe 7: Analyse par cytométrie en flux des effets des irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules PC3 à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.



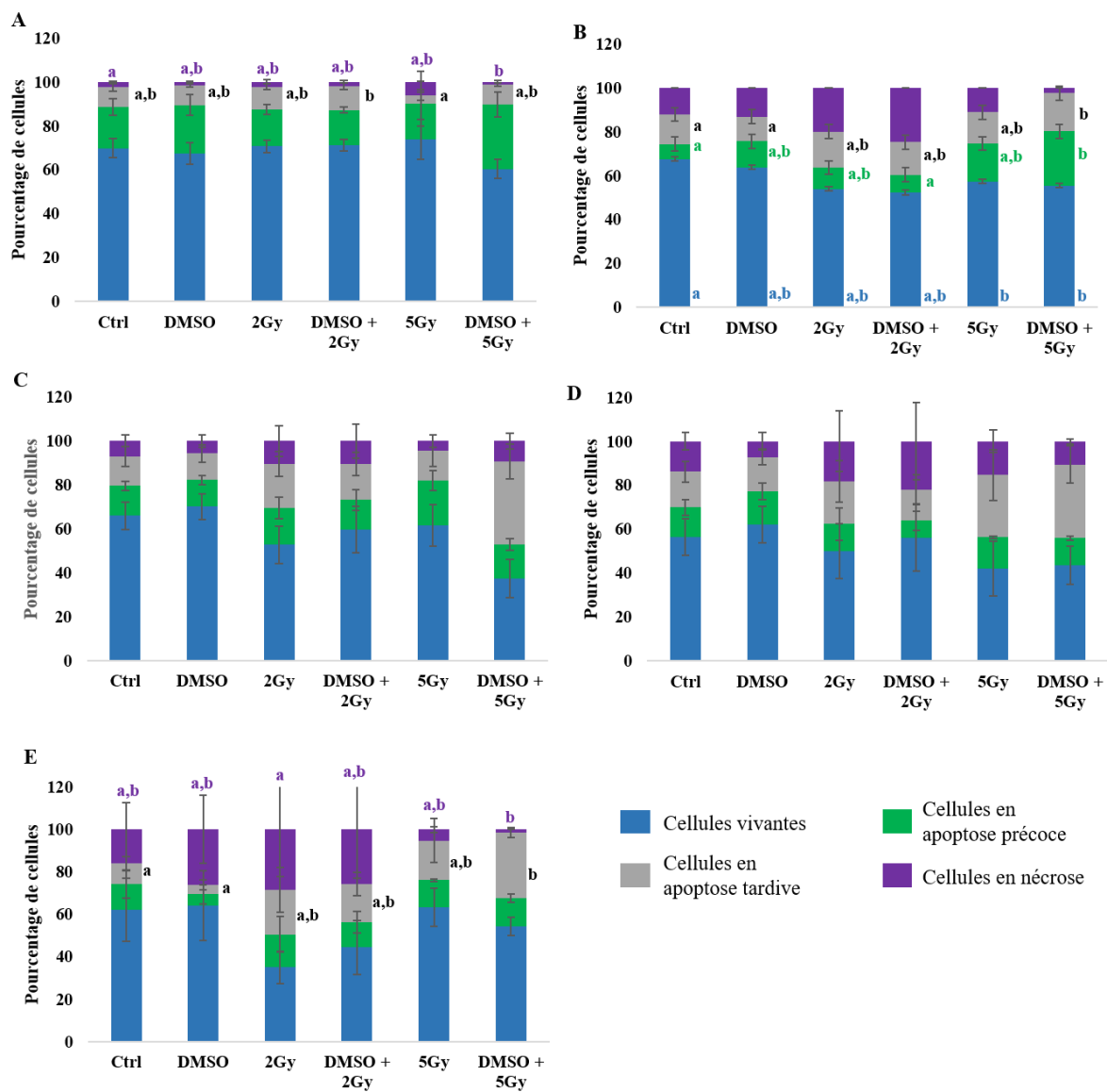
Annexe 10: Analyse par cytométrie en flux des effets de la combinaison du carbène à 4µM aux irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules PC3 à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont été ensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.



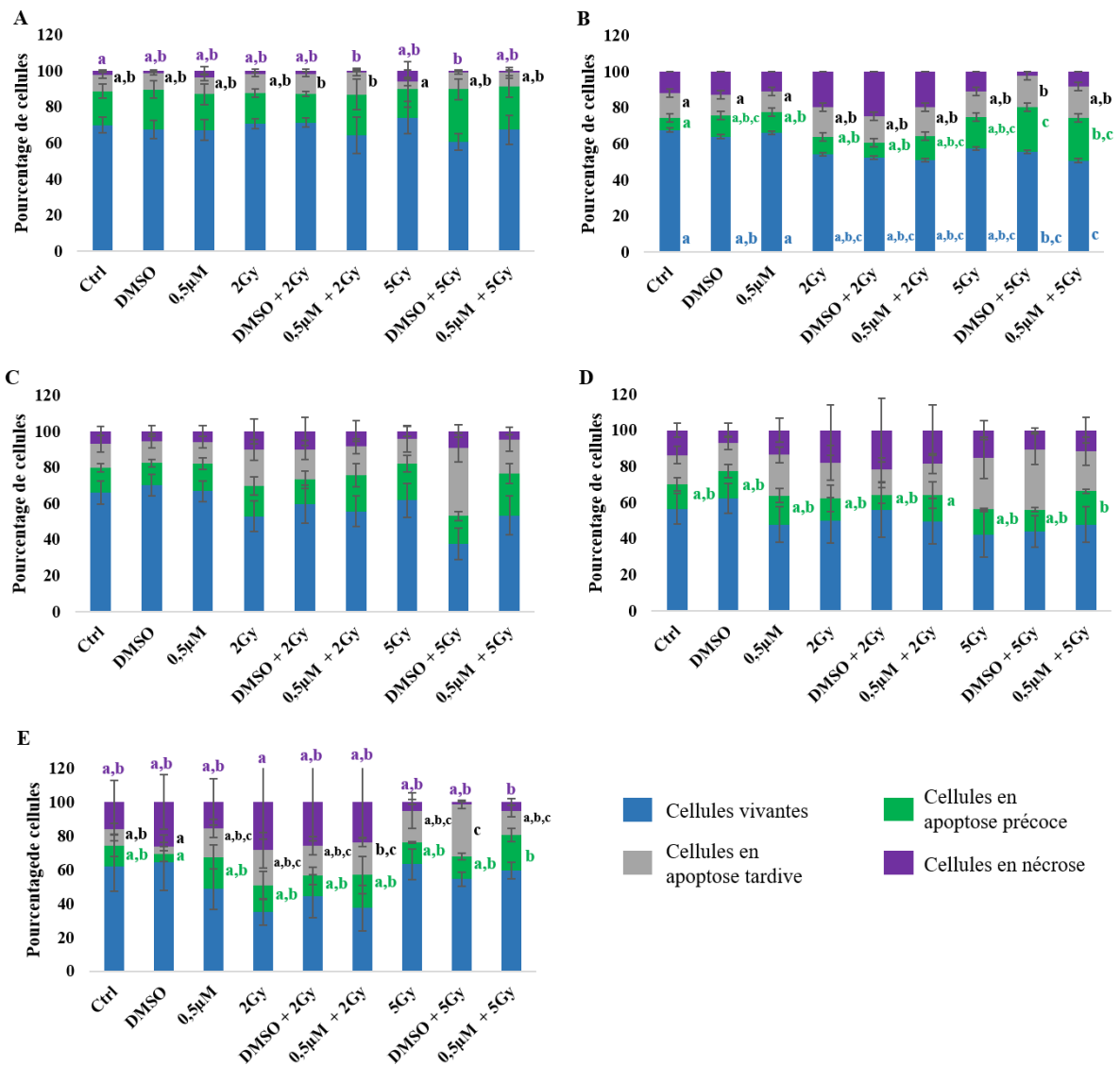
Annexe 11: Analyse par cytométrie en flux des effets du carbène sur la mort cellulaire dans les cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.



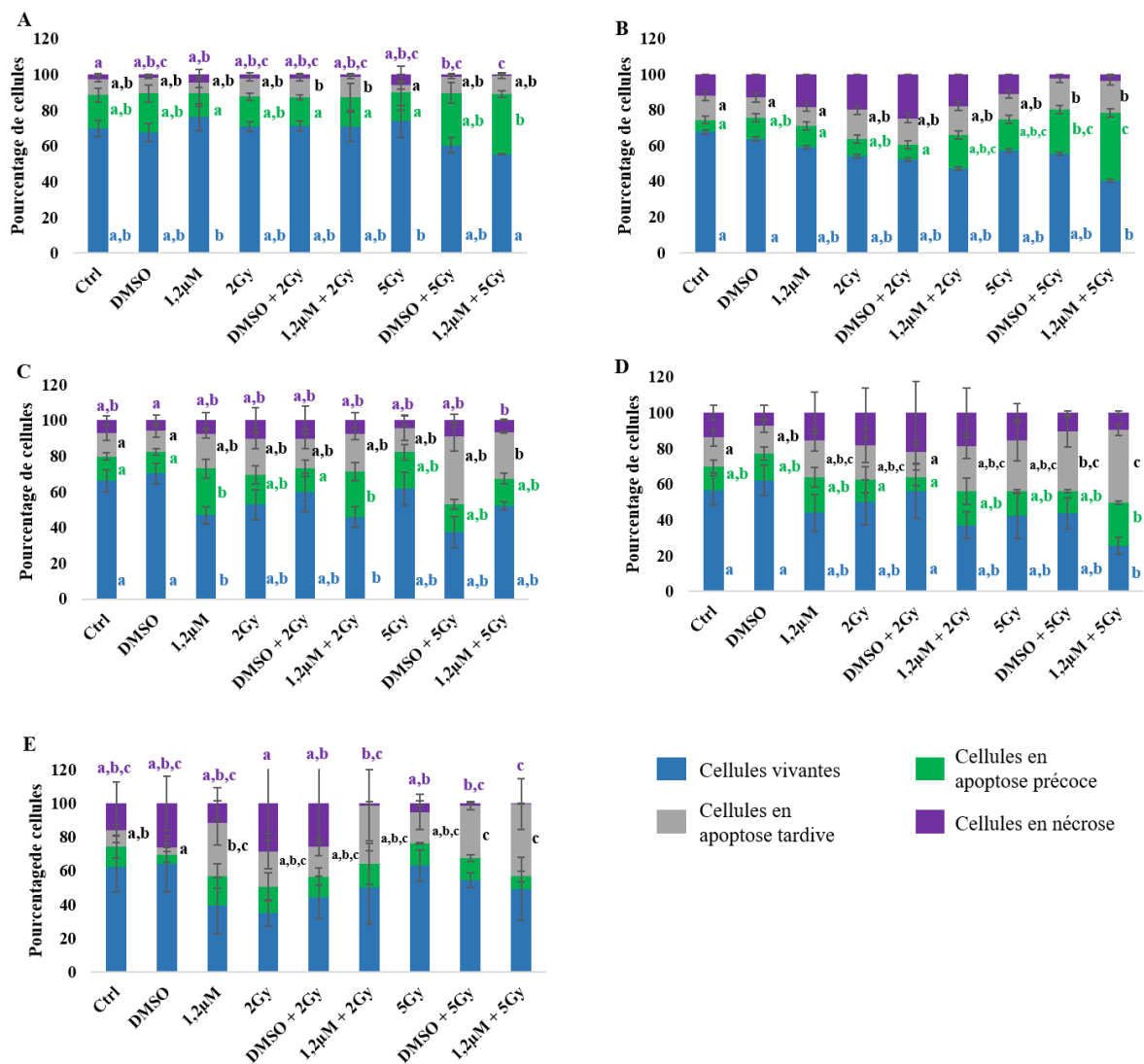
Annexe 12: Analyse par cytométrie en flux des effets des irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.



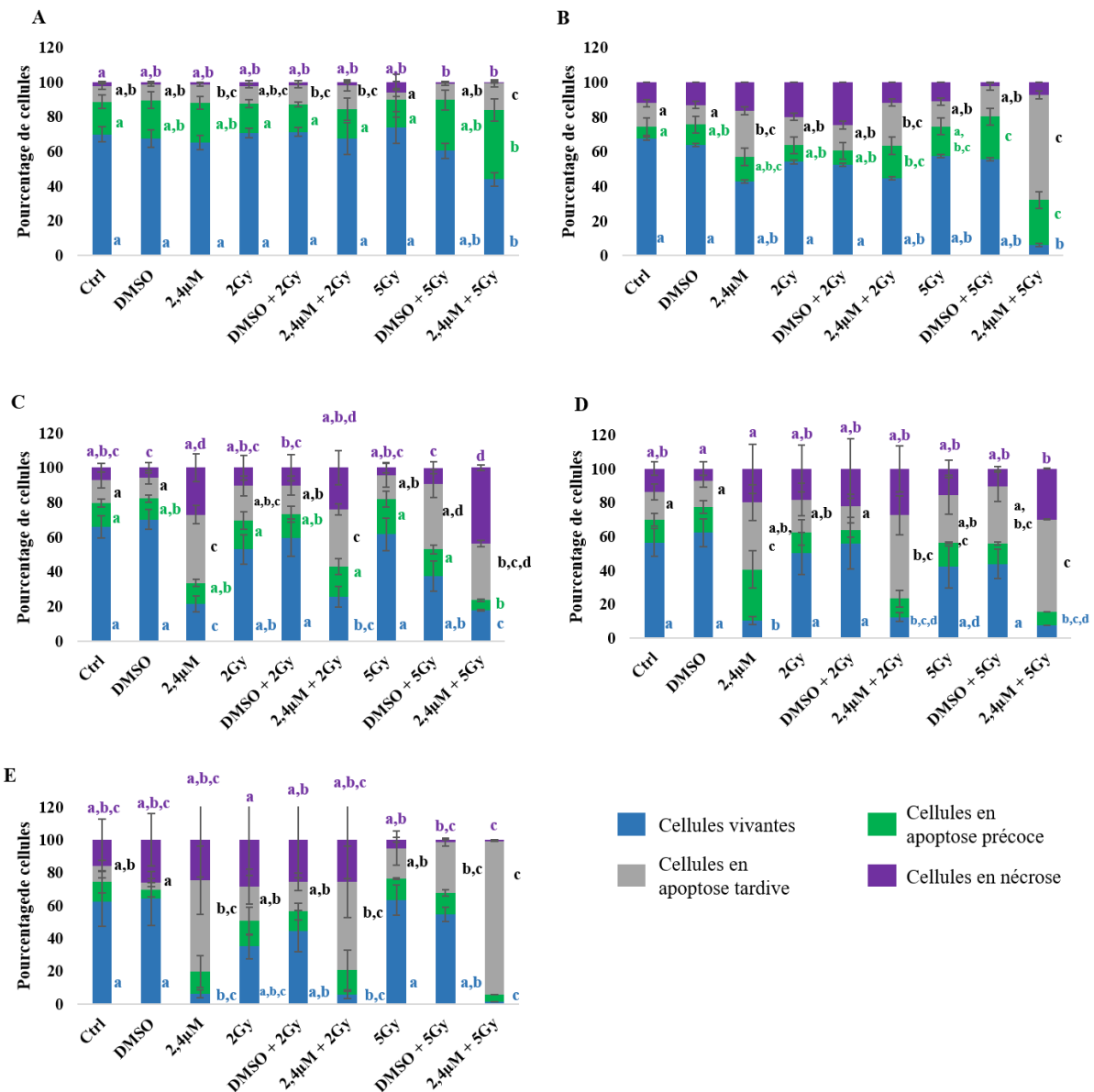
Annexe 13: Analyse par cytométrie en flux des effets de la combinaison du carbène à 0,5µM aux irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.



Annexe 14: Analyse par cytométrie en flux des effets de la combinaison du carbène à 1,2µM aux irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.



Annexe 15: Analyse par cytométrie en flux des effets de la combinaison du carbène à 2,4µM aux irradiations X sur la mort cellulaire dans les cellules LNCaP à 0h (A), 24h (B), 48h (C), 72h (D) et 96h (E).

Les cellules ont étéensemencées et traitées selon le protocole décrit. Les données (moyenne +/- SEM) sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant chacune 3 répétitions techniques. Elles ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple par paire de Dunn. Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes au sein d'une même population de cellules; $p < 0,05$.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abate-Shen, C., & Shen, M. M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & development, 14*(19), 2410-2434. <https://doi.org/10.1101/gad.819500>
- Abou-Ghali, M., & Stiban, J. (2015). Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi journal of biological sciences, 22*(6), 760-772. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.005>
- Acevedo, V. D., Gangula, R. D., Freeman, K. W., Li, R., Zhang, Y., Wang, F., Ayala, G. E., Peterson, L. E., Ittmann, M., & Spencer, D. M. (2007). Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell, 12*(6), 559-571. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.11.004>
- Adhami, V. M., Siddiqui, I. A., Ahmad, N., Gupta, S., & Mukhtar, H. (2004). Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer research, 64*(23), 8715-8722. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2840>
- Adlercreutz, C. H., Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Höckerstedt, K. A., Watanabe, S., Hämäläinen, E. K., Markkanen, M. H., Mäkelä, T. H., Wähälä, K. T., & Adlercreutz, T. (1995). Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *The Journal of nutrition, 125*(3 Suppl), 757S-770S. https://doi.org/10.1093/jn/125.3_Suppl.757S
- Akbari, M., Visnes, T., Krokan, H. E., & Otterlei, M. (2008). Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis. *DNA repair, 7*(4), 605-616. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.01.002>
- Akhtar, F., & Bokhari, S. R. A. (2021). Apoptosis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499821/>
- Al Olama, A. A., Kote-Jarai, Zs., Berndt, S. I., Conti, D. V., Schumacher, F., Han, Y., Benlloch, S., Hazelett, D. J., Wang, Z., Saunders, E., Leongamornlert, D., Lindstrom, S., Jugurnauth-Little, S., Dadaev, T., Tymrakiewicz, M., Stram, D. O., Rand, K., Wan, P., Stram, A., ... Haiman, C. A. (2014). A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nature genetics, 46*(10), 1103-1109. <https://doi.org/10.1038/ng.3094>

- Alavanja, M. C. R., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C. F., Knott, C., Thomas, K., Hoppin, J. A., Barker, J., Coble, J., Sandler, D. P., & Blair, A. (2003). Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *American journal of epidemiology*, *157*(9), 800-814. <https://doi.org/10.1093/aje/kwg040>
- Albala, D., Kemeter, M. J., Febbo, P. G., Lu, R., John, V., Stoy, D., Denes, B., McCall, M., Shindel, A. W., & Dubeck, F. (2016). Health Economic Impact and Prospective Clinical Utility of Oncotype DX[®] Genomic Prostate Score. *Reviews in urology*, *18*(3), 123-132. <https://doi.org/10.3909/riu0725>
- Alberts, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *The Mitochondrion. Molecular Biology of the Cell. 4th Edition.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26894/>
- Alberts, Thorburn, A. M., Shenolikar, S., Mumby, M. C., & Feramisco, J. R. (1993). Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(2), 388-392. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.388>
- Albertsen, P. C. (2015). Observational studies and the natural history of screen-detected prostate cancer. *Current opinion in urology*, *25*(3), 232-237. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000157>
- Algarté-Génin, M., Cussenot, O., & Costa, P. (2004). Prevention of prostate cancer by androgens : Experimental paradox or clinical reality. *European urology*, *46*(3), 285-294; discussion 294-5. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2004.04.012>
- Ali, M. E., Nair, N. N., Retegan, M., Neese, F., Staemmler, V., & Marx, D. (2014). The iron-sulfur core in Rieske proteins is not symmetric. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, *19*(8), 1287-1293. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1185-7>
- Alphonse, G., Aloy, M. T., Broquet, P., Gerard, J. P., Louisot, P., Rousson, R., & Rodriguez-Lafresse, C. (2002). Ceramide induces activation of the mitochondrial/caspases pathway in Jurkat and SCC61 cells sensitive to gamma-radiation but activation of this

- sequence is defective in radioresistant SQ20B cells. *International journal of radiation biology*, 78(9), 821-835. <https://doi.org/10.1080/09553000210153943>
- Alves de Inda, M., van Strijp, D., den Biezen-Timmermans, E., van Brussel, A., Wrobel, J., van Zon, H., Vos, P., Baillie, G. S., Tennstedt, P., Schlomm, T., Houslay, M. D., Bangma, C., & Hoffmann, R. (2018). Validation of Cyclic Adenosine Monophosphate Phosphodiesterase-4D7 for its Independent Contribution to Risk Stratification in a Prostate Cancer Patient Cohort with Longitudinal Biological Outcomes. *European urology focus*, 4(3), 376-384. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.05.010>
- Amaravadi, R., Kimmelman, A. C., & White, E. (2016). Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes & Development*, 30(17), 1913-1930. <https://doi.org/10.1101/gad.287524.116>
- Amundson, S. A., Do, K. T., Vinikoor, L. C., Lee, R. A., Koch-Paiz, C. A., Ahn, J., Reimers, M., Chen, Y., Scudiero, D. A., Weinstein, J. N., Trent, J. M., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., & Fornace, A. J. (2008). Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Cancer research*, 68(2), 415-424. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2120>
- Andersen, M. K., Rise, K., Giskeødegård, G. F., Richardsen, E., Bertilsson, H., Størkersen, Ø., Bathen, T. F., Rye, M., & Tessem, M.-B. (2018). Integrative metabolic and transcriptomic profiling of prostate cancer tissue containing reactive stroma. *Scientific reports*, 8(1), 14269. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32549-1>
- Anderson, J. (2003). The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer. *BJU International*, 91(5), 455-461. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2003.04026.x>
- Anderson, Marayati, R., Moffitt, R., & Yeh, J. J. (2017). Hexokinase 2 promotes tumor growth and metastasis by regulating lactate production in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 8(34), 56081-56094. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9760>
- Anestål, K., & Arnér, E. S. J. (2003). Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15966-15972.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M210733200>

- Ankel-Simons, F., & Cummins, J. M. (1996). Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization : Implications for theories on human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13859-13863.
- Antiandrogens. (2012). In *LiverTox : Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548491/>
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Wang, H., Luber, B., Nakazawa, M., Roeser, J. C., Chen, Y., Mohammad, T. A., Chen, Y., Fedor, H. L., Lotan, T. L., Zheng, Q., De Marzo, A. M., Isaacs, J. T., Isaacs, W. B., Nadal, R., Paller, C. J., Denmeade, S. R., Carducci, M. A., ... Luo, J. (2014). AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 371(11), 1028-1038. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315815>
- Armenia, J., Wankowicz, S. A. M., Liu, D., Gao, J., Kundra, R., Reznik, E., Chatila, W. K., Chakravarty, D., Han, G. C., Coleman, I., Montgomery, B., Pritchard, C., Morrissey, C., Barbieri, C. E., Beltran, H., Sboner, A., Zafeiriou, Z., Miranda, S., Bielski, C. M., ... van Allen, E. M. (2018). The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. *Nature genetics*, 50(5), 645-651. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0078-z>
- Arnér, E. S. J., & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6102-6109. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x>
- Attard, G., Reid, A. H. M., A'Hern, R., Parker, C., Oommen, N. B., Folkard, E., Messiou, C., Molife, L. R., Maier, G., Thompson, E., Olmos, D., Sinha, R., Lee, G., Dowsett, M., Kaye, S. B., Dearnaley, D., Kheoh, T., Molina, A., & de Bono, J. S. (2009). Selective inhibition of CYP17 with abiraterone acetate is highly active in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(23), 3742-3748. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.0642>

- Attard, G., Sydes, M. R., Mason, M. D., Clarke, N. W., Aebbersold, D., de Bono, J. S., Dearnaley, D. P., Parker, C. C., Ritchie, A. W. S., Russell, J. M., Thalmann, G., Cassoly, E., Millman, R., Matheson, D., Schiavone, F., Spears, M. R., Parmar, M. K. B., & James, N. D. (2014). Combining enzalutamide with abiraterone, prednisone, and androgen deprivation therapy in the STAMPEDE trial. *European urology*, *66*(5), 799-802. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.05.038>
- Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L., & Vogt, P. K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews Cancer*, *5*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrc1753>
- Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy : Dual roles in life and death? *Nature reviews. Molecular cell biology*, *6*(6), 505-510. <https://doi.org/10.1038/nrm1666>
- Baetke, S. C., Lammers, T., & Kiessling, F. (2015). Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *The British Journal of Radiology*, *88*(1054), 20150207. <https://doi.org/10.1259/bjr.20150207>
- Baker, Barnard, P. J., Berners-Price, S. J., Brayshaw, S. K., Hickey, J. L., Skelton, B. W., & White, A. H. (2006). Cationic, linear Au(I) N-heterocyclic carbene complexes : Synthesis, structure and anti-mitochondrial activity. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, *30*, 3708-3715. <https://doi.org/10.1039/b602560a>
- Baker, Lampe, P. A., Stojanovski, D., Korwitz, A., Anand, R., Tatsuta, T., & Langer, T. (2014). Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *The EMBO journal*, *33*(6), 578-593. <https://doi.org/10.1002/embj.201386474>
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, *421*(6922), 499-506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., & Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, *444*(7120), 756-760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>

- Barat, M., Colleter, L., Mongiat-Artus, P., Jolibois, Z., Quero, L., Hennequin, C., Desgrandchamps, F., & de Kerviler, E. (2019). Salvage cryoablation for local recurrence of prostatic cancer after curative therapy. *Diagnostic and Interventional Imaging, 100*(11), 679-687. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2019.07.001>
- Bardia, A., Platz, E. A., Yegnasubramanian, S., De Marzo, A. M., & Nelson, W. G. (2009). Anti-inflammatory drugs, antioxidants, and prostate cancer prevention. *Current Opinion in Pharmacology, 9*(4), 419-426. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.002>
- Bardin, C. W., Bullock, L. P., Sherins, R. J., Mowszowicz, I., & Blackburn, W. R. (1973). Androgen metabolism and mechanism of action in male pseudohermaphroditism: A study of testicular feminization. *Recent Progress in Hormone Research, 29*, 65-109. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571129-6.50006-3>
- Barfeld, S. J., Itkonen, H. M., Urbanucci, A., & Mills, I. G. (2014). Androgen-regulated metabolism and biosynthesis in prostate cancer. *Endocrine-related cancer, 21*(4), T57-66. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0515>
- Barron, D. A., & Rowley, D. R. (2012). The Reactive Stroma Microenvironment and Prostate Cancer Progression. *Endocrine-related cancer, 19*(6), R187-R204. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0085>
- Bartoletti-Stella, A., Mariani, E., Kurelac, I., Maresca, A., Caratozzolo, M. F., Iommarini, L., Carelli, V., Eusebi, L. H., Guido, A., Cenacchi, G., Fuccio, L., Rugolo, M., Tullo, A., Porcelli, A. M., & Gasparre, G. (2013). Gamma rays induce a p53-independent mitochondrial biogenesis that is counter-regulated by HIF1 α . *Cell Death & Disease, 4*, e663. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.187>
- Batra, J. S., Girdhani, S., & Hlatky, L. (2014). A Quest to Identify Prostate Cancer Circulating Biomarkers with a Bench-to-Bedside Potential. *Journal of biomarkers, 2014*, 321680. <https://doi.org/10.1155/2014/321680>
- Bayne, C. W., Ross, M., Donnelly, F., & Habib, F. K. (2000). The selectivity and specificity of the actions of the lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on the prostate. *The Journal of urology, 164*(3 Pt 1), 876-881. <https://doi.org/10.1097/00005392-200009010-00065>

- Beckham, T. H., Lu, P., Cheng, J. C., Zhao, D., Turner, L. S., Zhang, X., Hoffman, S., Armeson, K. E., Liu, A., Marrison, T., Hannun, Y. A., & Liu, X. (2012). Acid ceramidase-mediated production of sphingosine 1-phosphate promotes prostate cancer invasion through upregulation of cathepsin B. *International journal of cancer*, *131*(9), 2034-2043. <https://doi.org/10.1002/ijc.27480>
- Bedwal, R. S., & Bahuguna, A. (1994). Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia*, *50*(7), 626-640. <https://doi.org/10.1007/BF01952862>
- Bernard, D., Pourtier-Manzanedo, A., Gil, J., & Beach, D. H. (2003). Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *The Journal of clinical investigation*, *112*(11), 1724-1731. <https://doi.org/10.1172/JCI19035>
- Bernhard, E. J., Maity, A., Muschel, R. J., & McKenna, W. G. (1994). Increased expression of cyclin B1 mRNA coincides with diminished G2-phase arrest in irradiated HeLa cells treated with staurosporine or caffeine. *Radiation Research*, *140*(3), 393-400.
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M., & Garewal, H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: Fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *511*(2), 145-178. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00009-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00009-1)
- Bhindi, B., Kulkarni, G. S., Finelli, A., Alibhai, S. M. H., Hamilton, R. J., Toi, A., van der Kwast, T. H., Evans, A., Hersey, K., Jewett, M. A. S., Zlotta, A. R., Trachtenberg, J., & Fleshner, N. E. (2014). Obesity is associated with risk of progression for low-risk prostate cancers managed expectantly. *European urology*, *66*(5), 841-848. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.06.005>
- Bhola, P. D., & Letai, A. (2016). Mitochondria-Judges and Executioners of Cell Death Sentences. *Molecular cell*, *61*(5), 695-704. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.019>
- Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of biological chemistry*, *282*(2), 1183-1192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603761200>

- Blaylock, R. L. (2015). Cancer microenvironment, inflammation and cancer stem cells : A hypothesis for a paradigm change and new targets in cancer control. *Surgical neurology international*, 6, 92. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.157890>
- Blum, D. L., Koyama, T., M'Koma, A. E., Iturregui, J. M., Martinez-Ferrer, M., Uwamariya, C., Smith, J. A., Clark, P. E., & Bhowmick, N. A. (2008). Chemokine markers predict biochemical recurrence of prostate cancer following prostatectomy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(23), 7790-7797. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1716>
- Blume-Jensen, P., Berman, D. M., Rimm, D. L., Shipitsin, M., Putzi, M., Nifong, T. P., Small, C., Choudhury, S., Capela, T., Coupal, L., Ernst, C., Hurley, A., Kaprelyants, A., Chang, H., Giladi, E., Nardone, J., Dunyak, J., Loda, M., Klein, E. A., ... Saad, F. (2015). Development and clinical validation of an in situ biopsy-based multimarker assay for risk stratification in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(11), 2591-2600. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2603>
- Bochum, S., Berger, S., & Martens, U. M. (2018). Olaparib. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 211, 217-233. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_15
- Bookstein, R., Shew, J. Y., Chen, P. L., Scully, P., & Lee, W. H. (1990). Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4943), 712-715. <https://doi.org/10.1126/science.2300823>
- Borst, P. (2020). The malate–aspartate shuttle (Borst cycle) : How it started and developed into a major metabolic pathway. *IUBMB Life*, 72(11), 2241-2259. <https://doi.org/10.1002/iub.2367>
- Bose, S. K., Bullard, R. S., & Donald, C. D. (2008). Oncogenic role of engrailed-2 (en-2) in prostate cancer cell growth and survival. *Translational oncogenomics*, 3, 37-43.
- Bošković, A., & Rando, O. J. (2018). Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Annual Review of Genetics*, 52, 21-41. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031404>

- Bostwick, Alexander, E. E., Singh, R., Shan, A., Qian, J., Santella, R. M., Oberley, L. W., Yan, T., Zhong, W., Jiang, X., & Oberley, T. D. (2000). Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer*, *89*(1), 123-134.
- Bostwick, Burke, Djakiew, Euling, S., Ho, S., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D. J., & Timms, B. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer*, *101*(10 Suppl), 2371-2490. <https://doi.org/10.1002/cncr.20408>
- Bostwick, de La Roza, G., Dundore, P., Corica, F. A., & Iczkowski, K. A. (2003). Intraepithelial and stromal lymphocytes in the normal human prostate. *The Prostate*, *55*(3), 187-193. <https://doi.org/10.1002/pros.10224>
- Bostwick, Grignon, Hammond, M. E., Amin, M. B., Cohen, M., Crawford, D., Gospadarowicz, M., Kaplan, R. S., Miller, D. S., Montironi, R., Pajak, T. F., Pollack, A., Srigley, J. R., & Yarbrow, J. W. (2000). Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *124*(7), 995-1000. [https://doi.org/10.1043/0003-9985\(2000\)124<0995:PFIPC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-9985(2000)124<0995:PFIPC>2.0.CO;2)
- Bostwick, Liu, L., Brawer, M. K., & Qian, J. (2004). High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Reviews in urology*, *6*(4), 171-179.
- Bostwick, Qian, J., & Schlesinger, C. (2003). Contemporary pathology of prostate cancer. *The Urologic clinics of North America*, *30*(2), 181-207. [https://doi.org/10.1016/s0094-0143\(02\)00189-1](https://doi.org/10.1016/s0094-0143(02)00189-1)
- Bracarda, S., de Cobelli, O., Greco, C., Prayer-Galetti, T., Valdagni, R., Gatta, G., de Braud, F., & Bartsch, G. (2005). Cancer of the prostate. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *56*(3), 379-396. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2005.03.010>
- Brand, M. D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free radical biology & medicine*, *100*, 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>

- Bratic, A., & Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951-957. <https://doi.org/10.1172/JCI64125>
- Bratt, O. (2002). Hereditary prostate cancer : Clinical aspects. *The Journal of urology*, 168(3), 906-913. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000024402.67529.ca>
- Brehmer, B., Biesterfeld, S., & Jakse, G. (2003). Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 6(3), 217-222. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500657>
- Bristow, R. G., & Hill, R. P. (2008). Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature reviews. Cancer*, 8(3), 180-192. <https://doi.org/10.1038/nrc2344>
- Brown. (1990). Tumor hypoxia, drug resistance, and metastases. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(5), 338-339. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.5.338>
- Brown. (1995). Human androgen insensitivity syndrome. *Journal of Andrology*, 16(4), 299-303.
- Brown. (2007). Cholesterol, Statins and Cancer. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(3), 135-141. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04565.x>
- Bruner, D. W., Moore, D., Parlanti, A., Dorgan, J., & Engstrom, P. (2003). Relative risk of prostate cancer for men with affected relatives : Systematic review and meta-analysis. *International journal of cancer*, 107(5), 797-803. <https://doi.org/10.1002/ijc.11466>
- Bryant, C. M., & Hoppe, B. S. (2021). Promising long-term results with proton therapy for localized prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 18(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41585-021-00429-5>
- Bubendorf, L., Sauter, G., Moch, H., Jordan, P., Blöchliger, A., Gasser, T. C., & Mihatsch, M. J. (1996). Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *The American journal of pathology*, 148(5), 1557-1565.
- Bubendorf, L., Schöpfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T. C., & Mihatsch, M. J. (2000). Metastatic patterns of prostate cancer : An autopsy study of

1,589 patients. *Human pathology*, 31(5), 578-583.
<https://doi.org/10.1053/hp.2000.6698>

Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Currell, F. J., & Prise, K. M. (2012). Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale*, 4(16), 4830-4838. <https://doi.org/10.1039/c2nr31227a>

Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Taggart, L. E., & Prise, K. M. (2013). Radiosensitization by gold nanoparticles : Effective at megavoltage energies and potential role of oxidative stress. *Translational Cancer Research*, 2(4). <https://doi.org/10.21037/1514>

Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J. P., Ravanat, J. L., & Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research*, 424(1-2), 9-21. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00004-4](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00004-4)

Cairns, P., Okami, K., Halachmi, S., Halachmi, N., Esteller, M., Herman, J. G., Jen, J., Isaacs, W. B., Bova, G. S., & Sidransky, D. (1997). Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Research*, 57(22), 4997-5000.

Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular Senescence : Aging, Cancer, and Injury. *Physiological Reviews*, 99(2), 1047-1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018>

Camphausen, K., & Tofilon, P. J. (2007). Inhibition of Hsp90 : A multitarget approach to radiosensitization. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(15 Pt 1), 4326-4330. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0632>

Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence : When bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 729-740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>

Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF) : A novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 84(2-3), 215-222. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01374-3](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01374-3)

- Cao, Y., & Ma, J. (2011). Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: A systematic review and meta-analysis. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, *4*(4), 486-501. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0229>
- Carracedo, A., Cantley, L. C., & Pandolfi, P. P. (2013). Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight. *Nature reviews. Cancer*, *13*(4), 227-232. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>
- Carroll, A. G., Voeller, H. J., Sugars, L., & Gelmann, E. P. (1993). P53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *The Prostate*, *23*(2), 123-134. <https://doi.org/10.1002/pros.2990230206>
- Caruso, D. J., Carmack, A. J. K., Lokeshwar, V. B., Duncan, R. C., Soloway, M. S., & Lokeshwar, B. L. (2008). Osteopontin and interleukin-8 expression is independently associated with prostate cancer recurrence. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(13), 4111-4118. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0738>
- Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., & Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: A molecular definition. *Oncogene*, *23*(16), 2825-2837. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207528>
- Catalona, W. J., Partin, A. W., Sanda, M. G., Wei, J. T., Klee, G. G., Bangma, C. H., Slawin, K. M., Marks, L. S., Loeb, S., Broyles, D. L., Shin, S. S., Cruz, A. B., Chan, D. W., Sokoll, L. J., Roberts, W. L., van Schaik, R. H. N., & Mizrahi, I. A. (2011). A multicenter study of -2pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *The Journal of urology*, *185*(5), 1650-1655. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.12.032>
- Chaiswing, L., Bourdeau-Heller, J. M., Zhong, W., & Oberley, T. D. (2007). Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness. *Free radical biology & medicine*, *43*(2), 202-215. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.031>
- Chaiswing, L., Weiss, H. L., Jayswal, R. D., Clair, D. K. St., & Kyprianou, N. (2018). Profiles

- of Radioresistance Mechanisms in Prostate Cancer. *Critical ReviewsTM in Oncogenesis*, 23(1-2), 39-67. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2018025946>
- Chaiswing, L., Zhong, W., & Oberley, T. D. (2011). Distinct redox profiles of selected human prostate carcinoma cell lines: Implications for rational design of redox therapy. *Cancers*, 3(3), 3557-3584. <https://doi.org/10.3390/cancers3033557>
- Chaiswing, L., Zhong, W., & Oberley, T. D. (2014). Increasing discordant antioxidant protein levels and enzymatic activities contribute to increasing redox imbalance observed during human prostate cancer progression. *Free radical biology & medicine*, 67, 342-352. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.006>
- Chan, D. C. (2020). Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15(1), 235-259. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711>
- Chang, Graham, P. H., Ni, J., Hao, J., Bucci, J., Cozzi, P. J., & Li, Y. (2015). Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 96(3), 507-517. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.07.005>
- Chang, Hsu, J.-L., Sheng, Y.-H., Leu, W.-J., Yu, C.-C., Chan, S.-H., Chan, M.-L., Hsu, L.-C., Liu, S.-P., & Guh, J.-H. (2019). Phosphodiesterase Type 5 (PDE5) Inhibitors Sensitize Topoisomerase II Inhibitors in Killing Prostate Cancer Through PDE5-Independent Impairment of HR and NHEJ DNA Repair Systems. *Frontiers in Oncology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00681>
- Chang, Ni, J., Beretov, J., Wasinger, V. C., Hao, J., Bucci, J., Malouf, D., Gillatt, D., Graham, P. H., & Li, Y. (2017). Identification of protein biomarkers and signaling pathways associated with prostate cancer radioresistance using label-free LC-MS/MS proteomic approach. *Scientific reports*, 7, 41834. <https://doi.org/10.1038/srep41834>
- Chatterjee, A., Mambo, E., & Sidransky, D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 25(34), Article 34. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209604>
- Chen, He, J., Huang, Y., & Zhao, W. (2011). The generation of mitochondrial DNA large-scale

- deletions in human cells. *Journal of human genetics*, 56(10), 689-694. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.97>
- Chen, & Karantza. (2011). Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 11(2), 157-168. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.2.14622>
- Chen, Li, X., GUO, L., WU, X., HE, C., ZHANG, S., XIAO, Y., YANG, Y., & HAO, D. (2015). Combining radiation with autophagy inhibition enhances suppression of tumor growth and angiogenesis in esophageal cancer. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 1645-1652. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3623>
- Chen, N., Yang, W., Bao, Y., Xu, H., Qin, S., & Tu, Y. (2015). BSA capped Au nanoparticle as an efficient sensitizer for glioblastoma tumor radiation therapy. *RSC Advances*, 5(51), 40514-40520. <https://doi.org/10.1039/C5RA04013B>
- Chen, Page, J. H., Chen, R., & Giovannucci, E. (2008). Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era. *The Prostate*, 68(14), 1582-1591. <https://doi.org/10.1002/pros.20825>
- Chen, Q., Chai, Y.-C., Mazumder, S., Jiang, C., Macklis, R. M., Chisolm, G. M., & Almasan, A. (2003). The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell death and differentiation*, 10(3), 323-334. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401148>
- Chen, Tzeng, D. T. W., Huang, Y.-P., Lin, C.-J., Lo, U.-G., Wu, C.-L., Lin, H., Hsieh, J.-T., Tang, C.-H., & Lai, C.-H. (2018). Antrocin Sensitizes Prostate Cancer Cells to Radiotherapy through Inhibiting PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways. *Cancers*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cancers11010034>
- Chen, Yu, Q., Pan, H., Li, P., Wang, X., & Fu, S. (2020). Overexpression of IGFBP5 Enhances Radiosensitivity Through PI3K-AKT Pathway in Prostate Cancer. *Cancer Management and Research*, 12, 5409-5418. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S257701>
- Chesner, L. N., Essawy, M., Warner, C., & Campbell, C. (2021). DNA-protein crosslinks are repaired via homologous recombination in mammalian mitochondria. *DNA Repair*, 97,

103026. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.103026>

- Chinni, S. R., Sivalogan, S., Dong, Z., Filho, J. C. T., Deng, X., Bonfil, R. D., & Cher, M. L. (2006). CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells : The role of bone microenvironment-associated CXCL12. *The Prostate*, *66*(1), 32-48. <https://doi.org/10.1002/pros.20318>
- Cho, S. H. (2005). TH-C-T-6C-04 : Estimation of Tumor Dose Enhancement Due to Gold Nanoparticles During Typical Radiation Treatments: A Preliminary Monte Carlo Study. *Medical Physics*, *32*(6Part21), 2162-2162. <https://doi.org/10.1118/1.1998660>
- Cioni, B., Zaalberg, A., van Beijnum, J. R., Melis, M. H. M., van Burgsteden, J., Muraro, M. J., Hooijberg, E., Peters, D., Hofland, I., Lubeck, Y., de Jong, J., Sanders, J., Vivié, J., van der Poel, H. G., de Boer, J. P., Griffioen, A. W., Zwart, W., & Bergman, A. M. (2020). Androgen receptor signalling in macrophages promotes TREM-1-mediated prostate cancer cell line migration and invasion. *Nature Communications*, *11*(1), 4498. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18313-y>
- Clark, J., Attard, G., Jhavar, S., Flohr, P., Reid, A., De-Bono, J., Eeles, R., Scardino, P., Cuzick, J., Fisher, G., Parker, M. D., Foster, C. S., Berney, D., Kovacs, G., & Cooper, C. S. (2008). Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene*, *27*(14), 1993-2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210843>
- Clark, J., Merson, S., Jhavar, S., Flohr, P., Edwards, S., Foster, C. S., Eeles, R., Martin, F. L., Phillips, D. H., Crundwell, M., Christmas, T., Thompson, A., Fisher, C., Kovacs, G., & Cooper, C. S. (2007). Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene*, *26*(18), 2667-2673. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210070>
- Cloos, C. R., Daniels, D. H., Kalen, A., Matthews, K., Du, J., Goswami, P. C., & Cullen, J. J. (2009). Mitochondrial DNA depletion induces radioresistance by suppressing G2 checkpoint activation in human pancreatic cancer cells. *Radiation research*, *171*(5), 581-587. <https://doi.org/10.1667/RR1395.1>
- Cojoc, M., Peitzsch, C., Kurth, I., Trautmann, F., Kunz-Schughart, L. A., Telegeev, G. D., Stakhovsky, E. A., Walker, J. R., Simin, K., Lyle, S., Fuessel, S., Erdmann, K., Wirth, M. P., Krause, M., Baumann, M., & Dubrovskaya, A. (2015). Aldehyde Dehydrogenase

Is Regulated by β -Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Research*, 75(7), 1482-1494. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1924>

Coker, T. J. (2016). *Acute Bacterial Prostatitis : Diagnosis and Management*. 93(2), 7.

Coleman, R. E. (2006). Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(20 Pt 2), 6243s-6249s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0931>

Comstock, G. W., Bush, T. L., & Helzlsouer, K. (1992). Serum retinol, beta-carotene, vitamin E, and selenium as related to subsequent cancer of specific sites. *American journal of epidemiology*, 135(2), 115-121. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116264>

Contel, M., & Nayeem, N. (2021). Exploring the Potential of Metallo drugs as Chemotherapeutics for Triple Negative Breast Cancer. *Chemistry – A European Journal*, chem.202100438. <https://doi.org/10.1002/chem.202100438>

Cook, C. C., & Higuchi, M. (2012). The Awakening of an Advanced Malignant Cancer : An Insult to the Mitochondrial Genome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(5), 652-662. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.017>

Cooke, P. S., YOUNG, P., & CUNHA, G. R. (1991). Androgen Receptor Expression in Developing Male Reproductive Organs*. *Endocrinology*, 128(6), 2867-2873. <https://doi.org/10.1210/endo-128-6-2867>

Corn, P. G. (2012). The tumor microenvironment in prostate cancer : Elucidating molecular pathways for therapy development. *Cancer Management and Research*, 4, 183-193. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S32839>

Costa, R. M. A., Chiganças, V., Galhardo, R. da S., Carvalho, H., & Menck, C. F. M. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*, 85(11), 1083-1099. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2003.10.017>

Costello, Feng, P., Milon, B., Tan, M., & Franklin, R. B. (2004). Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer : Critical issues to resolve. *Prostate*

- cancer and prostatic diseases*, 7(2), 111-117. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500712>
- Costello, & Franklin, R. B. (1998). Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer. *The Prostate*, 35(4), 285-296. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0045\(19980601\)35:4<textless285::aid-pros8\textgreater3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0045(19980601)35:4<textless285::aid-pros8\textgreater3.0.co;2-f)
- Costello, & Franklin, R. B. (2006). The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: Connecting the dots. *Molecular cancer*, 5, 17. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-17>
- Costello, Franklin, R. B., & Feng, P. (2005). Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer. *Mitochondrion*, 5(3), 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2005.02.001>
- Costello, Franklin, R. B., Zou, J., Feng, P., Bok, R., Swanson, M. G., & Kurhanewicz, J. (2011). Human prostate cancer ZIP1/zinc/citrate genetic/metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model. *Cancer biology & therapy*, 12(12), 1078-1084. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.12.18367>
- Costello, Liu, Y., Franklin, R. B., & Kennedy, M. C. (1997). Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 272(46), 28875-28881. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.28875>
- Coulter, J. A., Jain, S., Butterworth, K. T., Taggart, L. E., Dickson, G. R., McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Trainor, C., Hounsell, A. R., O'Sullivan, J. M., Schettino, G., Currell, F. J., Hirst, D. G., & Prise, K. M. (2012). Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 7, 2673-2685. <https://doi.org/10.2147/IJN.S31751>
- Courtois-Cox, S., Jones, S. L., & Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*, 27(20), 2801-2809. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210950>
- Covey, T. M., Edes, K., & Fitzpatrick, F. A. (2007). Akt activation by arachidonic acid metabolism occurs via oxidation and inactivation of PTEN tumor suppressor.

Oncogene, 26(39), 5784-5792. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210391>

- Crawford, E. D., Scholz, M. C., Kar, A. J., Fegan, J. E., Haregewoin, A., Kaldate, R. R., & Brawer, M. K. (2014). Cell cycle progression score and treatment decisions in prostate cancer : Results from an ongoing registry. *Current medical research and opinion*, 30(6), 1025-1031. <https://doi.org/10.1185/03007995.2014.899208>
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), pdb.prot087288. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- Cruz, C., Castroviejo-Bermejo, M., Gutiérrez-Enríquez, S., Llop-Guevara, A., Ibrahim, Y. H., Gris-Oliver, A., Bonache, S., Morancho, B., Bruna, A., Rueda, O. M., Lai, Z., Polanska, U. M., Jones, G. N., Kristel, P., de Bustos, L., Guzman, M., Rodríguez, O., Grueso, J., Montalban, G., ... Serra, V. (2018). RAD51 foci as a functional biomarker of homologous recombination repair and PARP inhibitor resistance in germline BRCA-mutated breast cancer. *Annals of Oncology*, 29(5), 1203-1210. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy099>
- Cruz, Mo, H., McConathy, W. J., Sabnis, N., & Lacko, A. G. (2013). The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis : A review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Frontiers in pharmacology*, 4, 119. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00119>
- Cui, L., Her, S., Borst, G. R., Bristow, R. G., Jaffray, D. A., & Allen, C. (2017). Radiosensitization by gold nanoparticles : Will they ever make it to the clinic? *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 124(3), 344-356. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.07.007>
- Cunha. (1973). The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *The Anatomical record*, 175(1), 87-96. <https://doi.org/10.1002/ar.1091750108>
- Cunha, & Chung, L. W. (1981). Stromal-epithelial interactions—I. Induction of prostatic

- phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *Journal of Steroid Biochemistry*, 14(12), 1317-1324. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(81\)90338-1](https://doi.org/10.1016/0022-4731(81)90338-1)
- Cunha, Donjacour, A. A., Cooke, P. S., Mee, H., Bigsby, R. M., Higgins, S. J., & Sugimura, Y. (1987). The Endocrinology and Developmental Biology of the Prostate*. *Endocrine Reviews*, 8(3), 338-362. <https://doi.org/10.1210/edrv-8-3-338>
- Cunha, & Lung, B. (1978). The possible influence of temporal factors in androgenic responsiveness of urogenital tissue recombinants from wild-type and androgen-insensitive (Tfm) mice. *The Journal of experimental zoology*, 205(2), 181-193. <https://doi.org/10.1002/jez.1402050203>
- Cunha, Ricke, W., Thomson, A., Marker, P. C., Risbridger, G., Hayward, S. W., Wang, Y. Z., Donjacour, A. A., & Kurita, T. (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *Journal of Steroid Biochemistry*, 16.
- Curado, N., Giménez, N., Miachin, K., Aliaga-Lavrijsen, M., Cornejo, M. A., Jarzecki, A. A., & Contel, M. (2019). Preparation of Titanocene-Gold Compounds Based on Highly Active Gold(I)-N-Heterocyclic Carbene Anticancer Agents. Preliminary in vitro Studies in Renal and Prostate Cancer Cell lines. *ChemMedChem*, 14(11), 1086-1095. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800796>
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2013). Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell metabolism*, 18(2), 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>
- Cutruzzolà, F., Giardina, G., Marani, M., Macone, A., Paiardini, A., Rinaldo, S., & Paone, A. (2017). Glucose Metabolism in the Progression of Prostate Cancer. *Frontiers in physiology*, 8, 97. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00097>
- Cybulski, Górski, B., Debniak, T., Gliniewicz, B., Mierzejewski, M., Masojć, B., Jakubowska, A., Matyjasik, J., Złowocka, E., Sikorski, A., Narod, S. A., & Lubiński, J. (2004). NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer research*, 64(4), 1215-1219. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2502>
- Cybulski, Huzarski, T., Górski, B., Masojć, B., Mierzejewski, M., Debniak, T., Gliniewicz, B.,

- Matyjasik, J., Złowocka, E., Kurzawski, G., Sikorski, A., Posmyk, M., Szwiec, M., Czajka, R., Narod, S. A., & Lubiński, J. (2004). A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer research*, *64*(8), 2677-2679. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-0341>
- da Cunha Colombo Bonadio, Fogace, R. N., Miranda, V. C., & Diz, M. del P. E. (2018). Homologous recombination deficiency in ovarian cancer : A review of its epidemiology and management. *Clinics*, *73*(Suppl 1). <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e450s>
- Dabiri, Y., Abu el Maaty, M. A., Chan, H. Y., Wölker, J., Ott, I., Wölfl, S., & Cheng, X. (2019). P53-Dependent Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects of a Gold(I) N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complex in Colorectal Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00438>
- d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break : Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews. Cancer*, *8*(7), 512-522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>
- Dahal, S., Dubey, S., & Raghavan, S. C. (2018). Homologous recombination-mediated repair of DNA double-strand breaks operates in mammalian mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(9), 1641-1655. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2702-y>
- Dakhova, O., Ozen, M., Creighton, C. J., Li, R., Ayala, G., Rowley, D., & Ittmann, M. (2009). Global gene expression analysis of reactive stroma in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(12), 3979-3989. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1899>
- Dal Pra, A., Lalonde, E., Sykes, J., Warde, F., Ishkanian, A., Meng, A., Maloff, C., Srigley, J., Joshua, A. M., Petrovics, G., van der Kwast, T., Evans, A., Milosevic, M., Saad, F., Collins, C., Squire, J., Lam, W., Bismar, T. A., Boutros, P. C., & Bristow, R. G. (2013). TMPRSS2-ERG status is not prognostic following prostate cancer radiotherapy : Implications for fusion status and DSB repair. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *19*(18), 5202-5209. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1049>
- Dang, C. V., Le, A., & Gao, P. (2009). MYC-induced cancer cell energy metabolism and

- therapeutic opportunities. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(21), 6479-6483. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0889>
- Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., & Wang, X. F. (1995). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5545-5549. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5545>
- Davis, S., Weiss, M. J., Wong, J. R., Lampidis, T. J., & Chen, L. B. (1985). Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(25), 13844-13850.
- Dawson, A. G., & Cooney, G. J. (1978). Reconstruction of the alpha-glycerolphosphate shuttle using rat kidney mitochondria. *FEBS Letters*, 91(2), 169-172. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)81164-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)81164-8)
- Dayal, R., Singh, A., Pandey, A., & Mishra, K. P. (2014). Reactive oxygen species as mediator of tumor radiosensitivity. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(4), 811-818. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.146073>
- Dbaibo, G. S., Pushkareva, M. Y., Jayadev, S., Schwarz, J. K., Horowitz, J. M., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (1995). Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(5), 1347-1351. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1347>
- de Bono, De Giorgi, U., Rodrigues, D. N., Massard, C., Bracarda, S., Font, A., Arranz Arija, J. A., Shih, K. C., Radavoi, G. D., Xu, N., Chan, W. Y., Ma, H., Gendreau, S., Riisnaes, R., Patel, P. H., Maslyar, D. J., & Jinga, V. (2019). Randomized Phase II Study Evaluating Akt Blockade with Ipatasertib, in Combination with Abiraterone, in Patients with Metastatic Prostate Cancer with and without PTEN Loss. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(3), 928-936. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0981>
- de Bono, Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K. N., Sartor, O., Agarwal,

- N., Olmos, D., Thiery-Vuillemin, A., Twardowski, P., Mehra, N., Goessl, C., Kang, J., Burgents, J., Wu, W., Kohlmann, A., Adelman, C. A., & Hussain, M. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 382(22), 2091-2102. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911440>
- de Bono, Scher, H. I., Montgomery, R. B., Parker, C., Miller, M. C., Tissing, H., Doyle, G. V., Terstappen, L. W. W. M., Pienta, K. J., & Raghavan, D. (2008). Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(19), 6302-6309. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0872>
- de la Taille, A., Houlgatte, A., Houdelette, P., Berlizot, P., Ramirez, J., & Ricordel, I. (1997). [Value of free/total prostate specific antigen in the early diagnosis of prostate cancer (study of 105 patients)]. *Progres En Urologie: Journal De l'Association Francaise D'urologie Et De La Societe Francaise D'urologie*, 7(2), 240-245.
- De Marzo, A. M., Meeker, A. K., Zha, S., Luo, J., Nakayama, M., Platz, E. A., Isaacs, W. B., & Nelson, W. G. (2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*, 62(5 Suppl 1), 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2003.09.053>
- De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., & Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 256-269. <https://doi.org/10.1038/nrc2090>
- De Marzo, Marchi, V. L., Epstein, J. I., & Nelson, W. G. (1999). Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: Implications for prostatic carcinogenesis. *The American Journal of Pathology*, 155(6), 1985-1992. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65517-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65517-4)
- De Ruyscher, D., Niedermann, G., Burnet, N. G., Siva, S., Lee, A. W. M., & Hegi-Johnson, F. (2019). Radiotherapy toxicity. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0064-5>
- Deans, C., & Maggert, K. A. (2015). What Do You Mean, “Epigenetic”? *Genetics*, 199(4), 887-896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>

- de Bacco, F., Luraghi, P., Medico, E., Reato, G., Girolami, F., Perera, T., Gabriele, P., Comoglio, P. M., & Boccaccio, C. (2011). Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *103*(8), 645-661. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr093>
- Deep, G., & Panigrahi, G. K. (2015). Hypoxia-Induced Signaling Promotes Prostate Cancer Progression: Exosomes Role as Messenger of Hypoxic Response in Tumor Microenvironment. *Critical Reviews in Oncogenesis*, *20*(5-6), 419-434. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v20.i5-6.130>
- Delatre, BEAUDEUX, & BONNEFONT-ROUSSELOT. (2007). *Radicaux libres et stress oxydant* Jean-Louis, Dominique. Librairie Lavoisier. <https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/radicaux-libres-et-stress-oxydant/delatre/descriptif-9782743009731>
- Deng, X., Liu, H., Huang, J., Cheng, L., Keller, E. T., Parsons, S. J., & Hu, C.-D. (2008). Ionizing radiation induces prostate cancer neuroendocrine differentiation through interplay of CREB and ATF2 : Implications for disease progression. *Cancer research*, *68*(23), 9663-9670. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2229>
- de Oliveira, R., Zhao, P., Li, N., de Santa Maria, L. C., Vergnaud, J., Ruiz, J., Astruc, D., & Barratt, G. (2013). Synthesis and in vitro studies of gold nanoparticles loaded with docetaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, *454*(2), 703-711. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.031>
- de Santa, F., Totaro, M. G., Prosperini, E., Notarbartolo, S., Testa, G., & Natoli, G. (2007). The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*, *130*(6), 1083-1094. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.019>
- de Souza-Pinto, N. C., Mason, P. A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., Lebel, M., Stevensner, T. V., Rasmussen, L. J., & Bohr, V. A. (2009). Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA repair*, *8*(6), 704-719. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.01.021>
- DeWeese, T. L., Hruszkewycz, A. M., & Marnett, L. J. (2001). Oxidative stress in

- chemoprevention trials. *Urology*, 57(4 Suppl 1), 137-140.
[https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00959-6](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00959-6)
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R., & Kaina, B. (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International journal of radiation biology*, 73(3), 269-278.
<https://doi.org/10.1080/095530098142365>
- DiMauro, S. (2004). Mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1658(1), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.03.014>
- Dimauro, S., & Davidzon, G. (2005). Mitochondrial DNA and disease. *Annals of Medicine*, 37(3), 222-232. <https://doi.org/10.1080/07853890510007368>
- Discacciati, A., Orsini, N., & Wolk, A. (2012). Body mass index and incidence of localized and advanced prostate cancer—a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 23(7), 1665-1671. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr603>
- Ditch, S., & Paull, T. T. (2012). The ATM protein kinase and cellular redox signaling : Beyond the DNA damage response. *Trends in biochemical sciences*, 37(1), 15-22.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.10.002>
- Doghman-Bouguerra, M., & Lalli, E. (2017). The ER-mitochondria couple : In life and death from steroidogenesis to tumorigenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 441, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.050>
- Driscoll, S. G., & Taylor, S. H. (1980). Effects of prenatal maternal estrogen on the male urogenital system. *Obstetrics and gynecology*, 56(5), 537-542.
- Dueregger, A., Schöpf, B., Eder, T., Höfer, J., Gnaiger, E., Aufinger, A., Kenner, L., Perktold, B., Ramoner, R., Klocker, H., & Eder, I. E. (2015). Differential Utilization of Dietary Fatty Acids in Benign and Malignant Cells of the Prostate. *PloS one*, 10(8), e0135704.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135704>
- Dzutsev, A., Badger, J. H., Perez-Chanona, E., Roy, S., Salcedo, R., Smith, C. K., & Trinchieri, G. (2017). Microbes and Cancer. *Annual Review of Immunology*, 35, 199-228.

<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052133>

- Eichholzer, M., Stähelin, H. B., Gey, K. F., Lüdin, E., & Bernasconi, F. (1996). Prediction of male cancer mortality by plasma levels of interacting vitamins : 17-year follow-up of the prospective Basel study. *International journal of cancer*, 66(2), 145-150. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960410\)66:2<textless145::AID-IJC1>textgreater3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960410)66:2<textless145::AID-IJC1>textgreater3.0.CO;2-2)
- Eidelman, E., Twum-Ampofo, J., Ansari, J., & Siddiqui, M. M. (2017). The Metabolic Phenotype of Prostate Cancer. *Frontiers in oncology*, 7, 131. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00131>
- el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., & Wang, Y. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research*, 54(5), 1169-1174.
- Elghany, N. A., Schumacher, M. C., Slattery, M. L., West, D. W., & Lee, J. S. (1990). Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 1(2), 107-115. <https://doi.org/10.1097/00001648-199003000-00005>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis : A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Eloy, L., Jarrousse, A.-S., Teyssot, M.-L., Gautier, A., Morel, L., Jolival, C., Cresteil, T., & Roland, S. (2012). Anticancer Activity of Silver-N-Heterocyclic Carbene Complexes : Caspase-Independent Induction of Apoptosis via Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor (AIF). *ChemMedChem*, 7(5), 805-814. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200055>
- Epstein, Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., & Humphrey, P. A. (2016). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma : Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American journal of surgical pathology*, 40(2), 244-252. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>
- Epstein, J. I., Walsh, P. C., Carmichael, M., & Brendler, C. B. (1994). Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA*,

271(5), 368-374.

- Erho, N., Crisan, A., Vergara, I. A., Mitra, A. P., Ghadessi, M., Buerki, C., Bergstrahl, E. J., Kollmeyer, T., Fink, S., Haddad, Z., Zimmermann, B., Sierocinski, T., Ballman, K. V., Triche, T. J., Black, P. C., Karnes, R. J., Klee, G., Davicioni, E., & Jenkins, R. B. (2013). Discovery and validation of a prostate cancer genomic classifier that predicts early metastasis following radical prostatectomy. *PloS one*, 8(6), e66855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066855>
- Ernster, L., & Schatz, G. (1981). Mitochondria : A historical review. *The Journal of Cell Biology*, 91(3), 227-255.
- Eto, M., Bennouna, J., Hunter, O. C., Hershberger, P. A., Kanto, T., Johnson, C. S., Lotze, M. T., & Amoscato, A. A. (2003). C16 ceramide accumulates following androgen ablation in LNCaP prostate cancer cells. *The Prostate*, 57(1), 66-79. <https://doi.org/10.1002/pros.10275>
- Evan, G. I., & d'Adda di Fagagna, F. (2009). Cellular senescence : Hot or what? *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(1), 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.11.009>
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease : Induction, repair and significance. *Mutation research*, 567(1), 1-61. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>
- Fahrmann, J. F., Vykoukal, J. V., & Ostrin, E. J. (2020). Amino Acid Oncometabolism and Immunomodulation of the Tumor Microenvironment in Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00276>
- Falkenberg, M., Larsson, N.-G., & Gustafsson, C. M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual review of biochemistry*, 76, 679-699. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028>
- Farge, G., Laurens, N., Broekmans, O. D., Wildenberg, S. M. J. L., Dekker, L. C. M., Gaspari, M., Gustafsson, C. M., Peterman, E. J. G., Falkenberg, M., & Wuite, G. J. L. (2012). Protein sliding and DNA denaturation are essential for DNA organization by human

- mitochondrial transcription factor A. *Nature communications*, 3, 1013. <https://doi.org/10.1038/ncomms2001>
- Feldman, B. J., & Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1(1), 34-45. <https://doi.org/10.1038/35094009>
- Fendt, S.-M., Bell, E. L., Keibler, M. A., Olenchok, B. A., Mayers, J. R., Wasylenko, T. M., Vokes, N. I., Guarente, L., Vander Heiden, M. G., & Stephanopoulos, G. (2013). Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nature communications*, 4, 2236. <https://doi.org/10.1038/ncomms3236>
- Feng, P., Li, T.-L., Guan, Z.-X., Franklin, R. B., & Costello, L. C. (2002). Direct effect of zinc on mitochondrial apoptosis in prostate cells. *The Prostate*, 52(4), 311-318. <https://doi.org/10.1002/pros.10128>
- Feng, Shao, L., Castro, P., Coleman, I., Nelson, P. S., Smith, P. D., Davies, B. R., & Ittmann, M. (2017). Combination treatment of prostate cancer with FGF receptor and AKT kinase inhibitors. *Oncotarget*, 8(4), 6179-6192. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14049>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Filson, C. P. (2018). Quality of care and economic considerations of active surveillance of men with prostate cancer. *Translational andrology and urology*, 7(2), 203-213. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.08.08>
- Finley, D. S., Calvert, V. S., Inokuchi, J., Lau, A., Narula, N., Petricoin, E. F., Zaldivar, F., Santos, R., Tyson, D. R., & Ornstein, D. K. (2009). Periprostatic adipose tissue as a modulator of prostate cancer aggressiveness. *The Journal of urology*, 182(4), 1621-1627. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.06.015>
- Fizazi, K., Tran, N., Fein, L., Matsubara, N., Rodriguez-Antolin, A., Alekseev, B. Y., Özgüroğlu, M., Ye, D., Feyerabend, S., Protheroe, A., De Porre, P., Kheoh, T., Park, Y.

- C., Todd, M. B., Chi, K. N., & LATITUDE Investigators. (2017). Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 377(4), 352-360. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704174>
- Fonteriz, R., Matesanz-Isabel, J., Arias-Del-Val, J., Alvarez-Illera, P., Montero, M., & Alvarez, J. (2016). Modulation of Calcium Entry by Mitochondria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 898, 405-421. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26974-0_17
- Foster, B. A., & Cunha, G. R. (1999). Efficacy of various natural and synthetic androgens to induce ductal branching morphogenesis in the developing anterior rat prostate. *Endocrinology*, 140(1), 318-328. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6435>
- Fox, T. D. (2012). Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics*, 192(4), 1203-1234. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.141267>
- Franz, M.-C., Anderle, P., Bürzle, M., Suzuki, Y., Freeman, M. R., Hediger, M. A., & Kovacs, G. (2013). Zinc transporters in prostate cancer. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 735-741. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.007>
- Fratter, C., Gorman, G. S., Stewart, J. D., Buddles, M., Smith, C., Evans, J., Seller, A., Poulton, J., Roberts, M., Hanna, M. G., Rahman, S., Omer, S. E., Klopstock, T., Schoser, B., Kornblum, C., Czermin, B., Lecky, B., Blakely, E. L., Craig, K., ... Taylor, R. W. (2010). The clinical, histochemical, and molecular spectrum of PEO1 (Twinkle)-linked adPEO. *Neurology*, 74(20), 1619-1626. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181df099f>
- Freeman, M. R., & Solomon, K. R. (2004). Cholesterol and prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 91(1), 54-69. <https://doi.org/10.1002/jcb.10724>
- Freeman, M. R., Solomon, K. R., & Moyad, M. (2006). Statins and the risk of cancer. *JAMA*, 295(23), 2720-2721; author reply 2721-2722. <https://doi.org/10.1001/jama.295.23.2720-b>
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta : \textquotedblN1\textquotedbl versus \textquotedblN2\textquotedbl TAN. *Cancer cell*,

16(3), 183-194. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>

- Fritz, V., Benfodda, Z., Henriquet, C., Hure, S., Cristol, J.-P., Michel, F., Carbonneau, M.-A., Casas, F., & Fajas, L. (2013). Metabolic intervention on lipid synthesis converging pathways abrogates prostate cancer growth. *Oncogene*, *32*(42), 5101-5110. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.523>
- Fritz, V., & Fajas, L. (2010). Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. *Oncogene*, *29*(31), 4369-4377. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.182>
- Frye, S. V., Bramson, H. N., Hermann, D. J., Lee, F. W., Sinhababu, A. K., & Tian, G. (1998). Discovery and development of GG745, a potent inhibitor of both isozymes of 5 alpha-reductase. *Pharmaceutical biotechnology*, *11*, 393-422. https://doi.org/10.1007/0-306-47384-4_17
- Fujita, Hayashi, T., Matsushita, M., Uemura, M., & Nonomura, N. (2019). Obesity, Inflammation, and Prostate Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/jcm8020201>
- Galbraith, S. M., & Duchesne, G. M. (1997). Androgens and prostate cancer: Biology, pathology and hormonal therapy. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, *33*(4), 545-554. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(96\)00444-3](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(96)00444-3)
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Levine, B., Green, D. R., & Kroemer, G. (2017). Pharmacological modulation of autophagy: Therapeutic potential and persisting obstacles. *Nature reviews. Drug discovery*, *16*(7), 487-511. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.22>
- Galluzzi, L., Kepp, O., Vander Heiden, M. G., & Kroemer, G. (2013). Metabolic targets for cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, *12*(11), 829-846. <https://doi.org/10.1038/nrd4145>
- Gao, X., Porter, A. T., Grignon, D. J., Pontes, J. E., & Honn, K. V. (1997). Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *The Prostate*, *31*(4), 264-281. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0045\(19970601\)31:4<textless264::aid-pros8<textgreater3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0045(19970601)31:4<textless264::aid-pros8<textgreater3.0.co;2-k)

- García-Medel, P. L., Baruch-Torres, N., Peralta-Castro, A., Trasviña-Arenas, C. H., Torres-Larios, A., & Brieba, L. G. (2019). Plant organellar DNA polymerases repair double-stranded breaks by microhomology-mediated end-joining. *Nucleic Acids Research*, *47*(6), 3028-3044. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz039>
- Garrido, N., Pérez-Martos, A., Faro, M., Lou-Bonafonte, J. M., Fernández-Silva, P., López-Pérez, M. J., Montoya, J., & Enríquez, J. A. (2008). Cisplatin-mediated impairment of mitochondrial DNA metabolism inversely correlates with glutathione levels. *Biochemical Journal*, *414*(1), 93-102. <https://doi.org/10.1042/BJ20071615>
- Gautier, A., & Cisnetti, F. (2012). Advances in metal–carbene complexes as potent anti-cancer agents. *Metallomics*, *4*(1), 23-32. <https://doi.org/10.1039/C1MT00123J>
- Gazi, E., Gardner, P., Lockyer, N. P., Hart, C. A., Brown, M. D., & Clarke, N. W. (2007). Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *Journal of lipid research*, *48*(8), 1846-1856. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700131-JLR200>
- Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *20*(13), 3001-3015. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.10.018>
- Gibson, C. J., & Davids, M. S. (2015). BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(22), 5021-5029. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0364>
- Giménez-Xavier, P., Francisco, R., Platini, F., Pérez, R., & Ambrosio, S. (2008). LC3-I conversion to LC3-II does not necessarily result in complete autophagy. *International Journal of Molecular Medicine*, *22*(6), 781-785.
- Gioeli, D., Black, B. E., Gordon, V., Spencer, A., Kesler, C. T., Eblen, S. T., Paschal, B. M., & Weber, M. J. (2006). Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, *20*(3), 503-515. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0351>

- Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J. M., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2012). Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis. *Cell Calcium*, 52(1), 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.02.008>
- Giovannucci. (1998). Dietary influences of 1,25(OH)₂ vitamin D in relation to prostate cancer : A hypothesis. *Cancer causes & control : CCC*, 9(6), 567-582. <https://doi.org/10.1023/a:1008835903714>
- Giovannucci. (2007). Strengths and limitations of current epidemiologic studies : Vitamin D as a modifier of colon and prostate cancer risk. *Nutrition reviews*, 65(8 Pt 2), S77-9. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00345.x>
- Giunchi, F., Fiorentino, M., & Loda, M. (2019). The Metabolic Landscape of Prostate Cancer. *European urology oncology*, 2(1), 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2018.06.010>
- Gleason, D. F., & Mellinger, G. T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of urology*, 111(1), 58-64. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)59889-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)59889-4)
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 16(6), 2129-2144. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2129>
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., & Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, 16, 653-699. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.653>
- Grant, C. M., & Kyprianou, N. (2013). Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Translational andrology and urology*, 2(3), 202-211. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.04>
- Grasso, Medeiros, H. C. D., Zampieri, L. X., Bol, V., Danhier, P., van Gisbergen, M. W., Bouzin, C., Brusa, D., Grégoire, V., Smeets, H., Stassen, A. P. M., Dubois, L. J., Lambin, P., Dutreix, M., & Sonveaux, P. (2020). Fitter Mitochondria Are Associated

With Radioresistance in Human Head and Neck SQD9 Cancer Cells. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 263. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00263>

Grasso, Wu, Y.-M., Robinson, D. R., Cao, X., Dhanasekaran, S. M., Khan, A. P., Quist, M. J., Jing, X., Lonigro, R. J., Brenner, J. C., Asangani, I. A., Ateeq, B., Chun, S. Y., Siddiqui, J., Sam, L., Anstett, M., Mehra, R., Prensner, J. R., Palanisamy, N., ... Tomlins, S. A. (2012). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*, 487(7406), 239-243. <https://doi.org/10.1038/nature11125>

Graves, P. R., Yu, L., Schwarz, J. K., Gales, J., Sausville, E. A., O'Connor, P. M., & Piwnicka-Worms, H. (2000). The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5600-5605. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5600>

Gray, I. C., Phillips, S. M., Lee, S. J., Neoptolemos, J. P., Weissenbach, J., & Spurr, N. K. (1995). Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer research*, 55(21), 4800-4803.

Grayson, K. A., Jyotsana, N., Ortiz-Otero, N., & King, M. R. (2021). Overcoming TRAIL-resistance by sensitizing prostate cancer 3D spheroids with taxanes. *PLOS ONE*, 16(3), e0246733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246733>

Guerra, F., Perrone, A. M., Kurelac, I., Santini, D., Ceccarelli, C., Cricca, M., Zamagni, C., De Iaco, P., & Gasparre, G. (2012). Mitochondrial DNA mutation in serous ovarian cancer : Implications for mitochondria-coded genes in chemoresistance. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(36), e373-378. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.5933>

Guliaeva, N. A., Kuznetsova, E. A., & Gaziev, A. I. (2006). Proteins associated with mitochondrial DNA protect it against the action of X-rays and hydrogen peroxide. *Biofizika*, 51(4), 692-697.

Gupta, A., Nigam, S., Avasthi, I., Sharma, B., Ateeq, B., & Verma, S. (2019). Caspase-3 mediated programmed cell death by a gold-stabilised peptide carbene. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(21), 126672. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126672>

- Gupta, McKenna, W. G., Weber, C. N., Feldman, M. D., Goldsmith, J. D., Mick, R., Machtay, M., Rosenthal, D. I., Bakanauskas, V. J., Cerniglia, G. J., Bernhard, E. J., Weber, R. S., & Muschel, R. J. (2002). Local recurrence in head and neck cancer : Relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(3), 885-892.
- Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A., & Wilson, A. C. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352(6332), 255-257. <https://doi.org/10.1038/352255a0>
- Haas, G. P., & Sakr, W. A. (1997). Epidemiology of prostate cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 47(5), 273-287. <https://doi.org/10.3322/canjclin.47.5.273>
- Haenszel, W., & Kurihara, M. (1968). Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*, 40(1), 43-68.
- Haese, A., de La Taille, A., van Poppel, H., Marberger, M., Stenzl, A., Mulders, P. F. A., Huland, H., Abbou, C.-C., Remzi, M., Tinzi, M., Feyerabend, S., Stillebroer, A. B., van Gils, M. P. M. Q., & Schalken, J. A. (2008). Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *European urology*, 54(5), 1081-1088. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.06.071>
- Hagaman, D. E., Damasco, J. A., Perez, J. V. D., Rojo, R. D., & Melancon, M. P. (2021). Recent Advances in Nanomedicine for the Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer Bone Metastasis. *Molecules*, 26(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules26020384>
- Hagan, M., Wang, L., Hanley, J. R., Park, J. S., & Dent, P. (2000). Ionizing radiation-induced mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in DU145 prostate carcinoma cells : MAP kinase inhibition enhances radiation-induced cell killing and G2/M-phase arrest. *Radiation Research*, 153(4), 371-383. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0371:irimap\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0371:irimap]2.0.co;2)
- Hainfeld, J. F., Dilmanian, F. A., Slatkin, D. N., & Smilowitz, H. M. (2008). Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 60(8), 977-985. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.8.0005>

- Hainfeld, J. F., Dilmanian, F. A., Zhong, Z., Slatkin, D. N., Kalef-Ezra, J. A., & Smilowitz, H. M. (2010). Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Physics in medicine and biology*, *55*(11), 3045-3059. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/55/11/004>
- Hainfeld, J. F., Smilowitz, H. M., O'Connor, M. J., Dilmanian, F. A., & Slatkin, D. N. (2012). Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine*, *8*(10), 1601-1609. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.165>
- Hainfeld, J. F., Smilowitz, H. M., O'Connor, M. J., Dilmanian, F. A., & Slatkin, D. N. (2013). Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine (London, England)*, *8*(10), 1601-1609. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.165>
- Hämäläinen, R. H., Landoni, J. C., Ahlqvist, K. J., Goffart, S., Ryytty, S., Rahman, M. O., Brillhante, V., Icaý, K., Hautaniemi, S., Wang, L., Laiho, M., & Suomalainen, A. (2019). Defects in mtDNA replication challenge nuclear genome stability through nucleotide depletion and provide a unifying mechanism for mouse progerias. *Nature Metabolism*, *1*(10), 958-965. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0120-1>
- Hamid, A. A., Gray, K. P., Huang, Y., Bowden, M., Pomerantz, M., Loda, M., & Sweeney, C. J. (2019). Loss of PTEN Expression Detected by Fluorescence Immunohistochemistry Predicts Lethal Prostate Cancer in Men Treated with Prostatectomy. *European urology oncology*, *2*(5), 475-482. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2018.09.003>
- Hanahan, & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocrine reviews*, *27*(7), 728-735. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0037>
- Harlepp, S., Chardon, E., Bouché, M., Dahm, G., Maaloum, M., & Bellemin-Lapponnaz, S. (2019). N-Heterocyclic Carbene-Platinum Complexes Featuring an Anthracenyl

- Moiety : Anti-Cancer Activity and DNA Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174198>
- Haverkamp, J., Charbonneau, B., & Ratliff, T. L. (2008). Prostate inflammation and its potential impact on prostate cancer : A current review. *Journal of cellular biochemistry*, 103(5), 1344-1353. <https://doi.org/10.1002/jcb.21536>
- Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anatomica*, 154(1), 8-20. <https://doi.org/10.1159/000147748>
- Hayashi, N., Sugimura, Y., Kawamura, J., Donjacour, A. A., & Cunha, G. R. (1991). Morphological and Functional Heterogeneity in the Rat Prostatic Gland1. *Biology of Reproduction*, 45(2), 308-321. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.2.308>
- Heinrich, M., Wickel, M., Winoto-Morbach, S., Schneider-Brachert, W., Weber, T., Brunner, J., Saftig, P., Peters, C., Krönke, M., & Schütze, S. (2000). Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 477, 305-315. https://doi.org/10.1007/0-306-46826-3_33
- Hemminki, K., & Chen, B. (2005). Familial association of prostate cancer with other cancers in the Swedish Family-Cancer Database. *The Prostate*, 65(2), 188-194. <https://doi.org/10.1002/pros.20284>
- Henderson, D. J. P., Houslay, M. D., Bangma, C. H., & Hoffmann, R. (2019). Creating a potential diagnostic for prostate cancer risk stratification (InformMDx™) by translating novel scientific discoveries concerning cAMP degrading phosphodiesterase-4D7 (PDE4D7). *Clinical Science (London, England: 1979)*, 133(2), 269-286. <https://doi.org/10.1042/CS20180519>
- Hennessey, D., Martin, L. M., Atzberger, A., Lynch, T. H., Hollywood, D., & Marignol, L. (2013). Exposure to hypoxia following irradiation increases radioresistance in prostate cancer cells. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 31(7), 1106-1116. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.10.008>
- Her, S., Jaffray, D. A., & Allen, C. (2017). Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy : Mechanisms and recent advancements. *Advanced drug delivery reviews*,

109, 84-101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.012>

- Hernandez, D. J., Nielsen, M. E., Han, M., & Partin, A. W. (2007). Contemporary evaluation of the D'amico risk classification of prostate cancer. *Urology*, *70*(5), 931-935. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2007.08.055>
- Herold, D. M., Das, I. J., Stobbe, C. C., Iyer, R. V., & Chapman, J. D. (2000). Gold microspheres: A selective technique for producing biologically effective dose enhancement. *International Journal of Radiation Biology*, *76*(10), 1357-1364. <https://doi.org/10.1080/09553000050151637>
- Herrmann, J. M., & Neupert, W. (2000). Protein transport into mitochondria. *Current opinion in microbiology*, *3*(2), 210-214. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00077-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00077-1)
- Hessels, D., Klein Gunnewiek, J. M. T., van Oort, I., Karthaus, H. F. M., van Leenders, G. J. L., van Balken, B., Kiemeny, L. A., Witjes, J. A., & Schalken, J. A. (2003). DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *European urology*, *44*(1), 8-15; discussion 15-6. [https://doi.org/10.1016/s0302-2838\(03\)00201-x](https://doi.org/10.1016/s0302-2838(03)00201-x)
- Hessels, D., Smit, F. P., Verhaegh, G. W., Witjes, J. A., Cornel, E. B., & Schalken, J. A. (2007). Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(17), 5103-5108. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0700>
- Hickey, J. L., Ruhayel, R. A., Barnard, P. J., Baker, M. V., Berners-Price, S. J., & Filipovska, A. (2008). Mitochondria-Targeted Chemotherapeutics: The Rational Design of Gold(I) *N*-Heterocyclic Carbene Complexes That Are Selectively Toxic to Cancer Cells and Target Protein Selenols in Preference to Thiols. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(38), 12570-12571. <https://doi.org/10.1021/ja804027j>
- Higuchi, M., Kudo, T., Suzuki, S., Evans, T. T., Sasaki, R., Wada, Y., Shirakawa, T., Sawyer, J. R., & Gotoh, A. (2006). Mitochondrial DNA determines androgen dependence in prostate cancer cell lines. *Oncogene*, *25*(10), 1437-1445. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209190>

- Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., & Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal*, *23*(10), 2134-2145. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600210>
- Hockenbery, D. M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M., & Korsmeyer, S. J. (1991). BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(16), 6961-6965. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.6961>
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*(6835), 366-374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Holenya, P., Can, S., Rubbiani, R., Alborzinia, H., Jünger, A., Cheng, X., Ott, I., & Wölfl, S. (2014). Detailed analysis of pro-apoptotic signaling and metabolic adaptation triggered by a N-heterocyclic carbene–gold(I) complex. *Metallomics*, *6*(9), 1591-1601. <https://doi.org/10.1039/C4MT00075G>
- Holt, I. J., Harding, A. E., & Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, *331*(6158), 717-719. <https://doi.org/10.1038/331717a0>
- Honda, O., Kuroda, M., Joja, I., Asaumi, J., Takeda, Y., Akaki, S., Togami, I., Kanazawa, S., Kawasaki, S., & Hiraki, Y. (2000). Assessment of secondary necrosis of Jurkat cells using a new microscopic system and double staining method with annexin V and propidium iodide. *International Journal of Oncology*, *16*(2), 283-288. <https://doi.org/10.3892/ijjo.16.2.283>
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, *336*(6086), 1268-1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Chu, T. M., Wajsman, Z. L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L. S., Kakati, S., Arya, S. K., & Sandberg, A. A. (1980). The LNCaP cell line—A new model for studies on human prostatic carcinoma. *Progress in Clinical and Biological Research*, *37*, 115-132.

- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A., & Murphy, G. P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research*, *43*(4), 1809-1818.
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, *20*(2), 74-88. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>
- Hsing, A. W., Comstock, G. W., Abbey, H., & Polk, B. F. (1990). Serologic precursors of cancer. Retinol, carotenoids, and tocopherol and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *82*(11), 941-946. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.11.941>
- Hsu, S. L., Hsu, J. W., Liu, M. C., Chen, L. Y., & Chang, C. D. (2000). Retinoic acid-mediated G1 arrest is associated with induction of p27(Kip1) and inhibition of cyclin-dependent kinase 3 in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Experimental Cell Research*, *258*(2), 322-331. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4933>
- Huang, L., Pu, Y., Alam, S., Birch, L., & Prins, G. S. (2004). Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *Journal of Andrology*, *25*(3), 330-337. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02796.x>
- Huggins, C., & Hodges, C. V. (1972). Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA: a cancer journal for clinicians*, *22*(4), 232-240. <https://doi.org/10.3322/canjclin.22.4.232>
- Husain, Z., Huang, Y., Seth, P., & Sukhatme, V. P. (2013). Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response : Effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(3), 1486-1495. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202702>
- Hussain, M., Tangen, C. M., Berry, D. L., Higano, C. S., Crawford, E. D., Liu, G., Wilding, G., Prescott, S., Kanaga Sundaram, S., Small, E. J., Dawson, N. A., Donnelly, B. J., Venner, P. M., Vaishampayan, U. N., Schellhammer, P. F., Quinn, D. I., Raghavan, D., Ely, B., Moinpour, C. M., ... Thompson, I. M. (2013). Intermittent versus continuous androgen deprivation in prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, *368*(14),

1314-1325. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1212299>

- Iida, M., Harari, P., Wheeler, D., & Toulany, M. (2020). Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors. *Mutation research*, 819-820, 111690. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111690>
- Il'yasova, D., Mixon, G., Wang, F., Marcom, P. K., Marks, J., Spasojevich, I., Craft, N., Arredondo, F., & DiGiulio, R. (2009). Markers of oxidative status in a clinical model of oxidative assault: A pilot study in human blood following doxorubicin administration. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 14(5), 321-325. <https://doi.org/10.1080/13547500902946757>
- Isaacs, J. T., & Isaacs, W. B. (2004). Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. *Nature Medicine*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nm0104-26>
- Ishani, A., MacDonald, R., Nelson, D., Rutks, I., & Wilt, T. J. (2000). Pygeum africanum for the treatment of patients with benign prostatic hyperplasia: A systematic review and quantitative meta-analysis. *The American journal of medicine*, 109(8), 654-664. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00604-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00604-5)
- Ishihara, T., Ban-Ishihara, R., Maeda, M., Matsunaga, Y., Ichimura, A., Kyogoku, S., Aoki, H., Katada, S., Nakada, K., Nomura, M., Mizushima, N., Mihara, K., & Ishihara, N. (2015). Dynamics of mitochondrial DNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. *Molecular and cellular biology*, 35(1), 211-223. <https://doi.org/10.1128/MCB.01054-14>
- Ishikawa, H., Tsuji, H., Kamada, T., Akakura, K., Suzuki, H., Shimazaki, J., & Tsujii, H. (2012). Carbon-ion radiation therapy for prostate cancer. *International Journal of Urology*, 19(4), 296-305. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2012.02961.x>
- Jack, R. H., Davies, E. A., & Møller, H. (2007). Testis and prostate cancer incidence in ethnic groups in South East England. *International journal of andrology*, 30(4), 215-220; discussion 220-1. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00777.x>

- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H., & Shay, J. W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine*, *8*(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0324-x>
- Jain, S., Coulter, J. A., Hounsell, A. R., Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Dickson, G. R., Prise, K. M., Currell, F. J., O'Sullivan, J. M., & Hirst, D. G. (2011). Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, *79*(2), 531-539. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.08.044>
- Jamaspishvili, T., Berman, D. M., Ross, A. E., Scher, H. I., De Marzo, A. M., Squire, J. A., & Lotan, T. L. (2018). Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, *15*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.9>
- James, N. D., Spears, M. R., Clarke, N. W., Dearnaley, D. P., De Bono, J. S., Gale, J., Hetherington, J., Hoskin, P. J., Jones, R. J., Laing, R., Lester, J. F., McLaren, D., Parker, C. C., Parmar, M. K. B., Ritchie, A. W. S., Russell, J. M., Strelbel, R. T., Thalmann, G. N., Mason, M. D., & Sydes, M. R. (2015). Survival with Newly Diagnosed Metastatic Prostate Cancer in the « Docetaxel Era » : Data from 917 Patients in the Control Arm of the STAMPEDE Trial (MRC PR08, CRUK/06/019). *European Urology*, *67*(6), 1028-1038. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.09.032>
- James, Sydes, M. R., Clarke, N. W., Mason, M. D., Dearnaley, D. P., Spears, M. R., Ritchie, A. W. S., Parker, C. C., Russell, J. M., Attard, G., de Bono, J., Cross, W., Jones, R. J., Thalmann, G., Amos, C., Matheson, D., Millman, R., Alzouebi, M., Beesley, S., ... STAMPEDE investigators. (2016). Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE) : Survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, *387*(10024), 1163-1177. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01037-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01037-5)
- Jayakumar, S., Kunwar, A., Sandur, S. K., Pandey, B. N., & Chaubey, R. C. (2014). Differential

- response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation : Role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(1), 485-494. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.006>
- Jeggo, P. A., Pearl, L. H., & Carr, A. M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer : A historical perspective. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.4>
- Jiang, W.-W., Rosenbaum, E., Mambo, E., Zahurak, M., Masayesva, B., Carvalho, A. L., Zhou, S., Westra, W. H., Alberg, A. J., Sidransky, D., Koch, W., & Califano, J. A. (2006). Decreased mitochondrial DNA content in posttreatment salivary rinses from head and neck cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(5), 1564-1569. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1471>
- Johns, L. E., & Houlston, R. S. (2003). A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU international*, 91(9), 789-794. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2003.04232.x>
- Johnson, D. P., Chandrasekharan, M. B., Dutreix, M., & Bhaskara, S. (2021). Targeting DNA Repair and Chromatin Crosstalk in Cancer Therapy. *Cancers*, 13(3), 381. <https://doi.org/10.3390/cancers13030381>
- Joniau, S., Goeman, L., Pennings, J., & Van Poppel, H. (2005). Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) : Importance and clinical management. *European Urology*, 48(3), 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.03.015>
- Joseph, I. B., Nelson, J. B., Denmeade, S. R., & Isaacs, J. T. (1997). Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3(12 Pt 1), 2507-2511.
- Joshua, A. M., Evans, A., van der Kwast, T., Zielenska, M., Meeker, A. K., Chinnaiyan, A., & Squire, J. A. (2008). Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochimica et biophysica acta*, 1785(2), 156-181. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.12.001>

- Jun, S.-H., Kim, T. G., & Ban, C. (2006). DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *The FEBS Journal*, 273(8), 1609-1619. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05190.x>
- Kabakov, A. E., Kudryavtsev, V. A., & Gabai, V. L. (2010). Hsp90 inhibitors as promising agents for radiotherapy. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 88(3), 241-247. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0562-0>
- Kabakov, A. E., & Yakimova, A. O. (2021). Hypoxia-Induced Cancer Cell Responses Driving Radioresistance of Hypoxic Tumors : Approaches to Targeting and Radiosensitizing. *Cancers*, 13(5), 1102. <https://doi.org/10.3390/cancers13051102>
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., & Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*, 17(1), 16-23.
- Kakaroukas, A., & Jeggo, P. A. (2014). DNA DSB repair pathway choice : An orchestrated handover mechanism. *The British Journal of Radiology*, 87(1035), 20130685. <https://doi.org/10.1259/bjr.20130685>
- Kalinska, M., Meyer-Hoffert, U., Kantyka, T., & Potempa, J. (2016). Kallikreins—The melting pot of activity and function. *Biochimie*, 122, 270-282. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.023>
- Kandela, I. K., Lee, W., & Indig, G. L. (2003). Effect of the lipophilic/hydrophilic character of cationic triarylmethane dyes on their selective phototoxicity toward tumor cells. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, 78(3-4), 157-169. <https://doi.org/10.1080/10520290310001597050>
- Karaca, Ö., Scalcon, V., Meier-Menches, S. M., Bonsignore, R., Brouwer, J. M. J. L., Tonolo, F., Folda, A., Rigobello, M. P., Kühn, F. E., & Casini, A. (2017). Characterization of Hydrophilic Gold(I) N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complexes as Potent TrxR Inhibitors Using Biochemical and Mass Spectrometric Approaches. *Inorganic Chemistry*, 56(22), 14237-14250. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02345>
- Karar, J., & Maity, A. (2011). PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in*

- Karhadkar, S. S., Bova, G. S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J. T., Berman, D. M., & Beachy, P. A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*, 431(7009), 707-712. <https://doi.org/10.1038/nature02962>
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research*, 51(23 Pt 1).
- Kazak, L., Reyes, A., & Holt, I. J. (2012). Minimizing the damage : Repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(10), 659-671. <https://doi.org/10.1038/nrm3439>
- Kelley, M. R., Georgiadis, M. M., & Fishel, M. L. (2012). APE1/Ref-1 role in redox signaling : Translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 36-53. <https://doi.org/10.2174/1874467211205010036>
- Kelly, Holland, P., Skibinski, G., Harrison, C., Mcmillan, L., Hargreave, T., & James, K. (1991). Extracellular organelles (prostasomes) are immunosuppressive components of human semen. *Clinical & Experimental Immunology*, 86(3), 550-556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1991.tb02968.x>
- Kelly, Sinnott, J. A., Rider, J. R., Ebot, E. M., Gerke, T., Bowden, M., Pettersson, A., Loda, M., Sesso, H. D., Kantoff, P. W., Martin, N. E., Giovannucci, E. L., Tyekuceva, S., Heiden, M. V., & Mucci, L. A. (2016). The role of tumor metabolism as a driver of prostate cancer progression and lethal disease : Results from a nested case-control study. *Cancer & metabolism*, 4, 22. <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0161-9>
- Kempson, I. (2021). Mechanisms of nanoparticle radiosensitization. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 13(1). <https://doi.org/10.1002/wnan.1656>
- Kerr. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182, 471-474. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00457-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00457-2)

- Kerr, Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases : Regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
- Keto, C. J., Aronson, W. J., Terris, M. K., Presti, J. C., Kane, C. J., Amling, C. L., & Freedland, S. J. (2012). Obesity is associated with castration-resistant disease and metastasis in men treated with androgen deprivation therapy after radical prostatectomy : Results from the SEARCH database. *BJU international*, 110(4), 492-498. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10754.x>
- Khadem Abolfazli, M., Mahdavi, S. R., & Ataei, Gh. (2015). Studying Effects of Gold Nanoparticle on Dose Enhancement in Megavoltage Radiation. *Journal of Biomedical Physics & Engineering*, 5(4), 185-190.
- Khalili Fard, J., Jafari, S., & Eghbal, M. A. (2015). A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), 447-454. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.061>
- Khan, Hamid, A., Adhami, V. M., Lall, R. K., & Mukhtar, H. (2015). Role of epithelial mesenchymal transition in prostate tumorigenesis. *Current pharmaceutical design*, 21(10), 1240-1248. <https://doi.org/10.2174/1381612821666141211120326>
- Khan, Ihsan, Khan, H. U., Jana, R., Wazir, J., Khongorzul, P., Waqar, M., & Zhou, X. (2017). Comprehensive overview of prostatitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 1064-1076. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.016>
- Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., & Koul, H. K. (2009). Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer letters*, 282(2), 125-136. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.12.011>
- Kheirandish, P., & Chinegwundoh, F. (2011). Ethnic differences in prostate cancer. *British journal of cancer*, 105(4), 481-485. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.273>

- Khemlina, G., Ikeda, S., & Kurzrock, R. (2015). Molecular landscape of prostate cancer : Implications for current clinical trials. *Cancer treatment reviews*, *41*(9), 761-766. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.07.001>
- Kiciński, M., Vangronsveld, J., & Nawrot, T. S. (2011). An epidemiological reappraisal of the familial aggregation of prostate cancer : A meta-analysis. *PloS one*, *6*(10), e27130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027130>
- Kim, Kang, K. H., Kim, M. Y., & Choi, K. H. (2000). Induction of p53-independent p21 during ceramide-induced G1 arrest in human hepatocarcinoma cells. *Biochemistry and Cell Biology*, *78*(2). <https://doi.org/10.1139/o00-016>
- Kim, Lee, J.-W., Song, S. Y., Choi, J.-J., Choi, C. H., Kim, B.-G., Lee, J.-H., & Bae, D.-S. (2006). Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *British Journal of Cancer*, *94*(11), 1678-1682. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603180>
- Kimura, T. (2012). East meets West : Ethnic differences in prostate cancer epidemiology between East Asians and Caucasians. *Chinese journal of cancer*, *31*(9), 421-429. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10324>
- Klein, E. A., Cooperberg, M. R., Magi-Galluzzi, C., Simko, J. P., Falzarano, S. M., Maddala, T., Chan, J. M., Li, J., Cowan, J. E., Tsiatis, A. C., Cherbavaz, D. B., Pelham, R. J., Tenggara-Hunter, I., Baehner, F. L., Knezevic, D., Febbo, P. G., Shak, S., Kattan, M. W., Lee, M., & Carroll, P. R. (2014). A 17-gene assay to predict prostate cancer aggressiveness in the context of Gleason grade heterogeneity, tumor multifocality, and biopsy undersampling. *European Urology*, *66*(3), 550-560. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.05.004>
- Klein, E. A., Haddad, Z., Yousefi, K., Lam, L. L. C., Wang, Q., Choeurng, V., Palmer-Aronsten, B., Buerki, C., Davicioni, E., Li, J., Kattan, M. W., Stephenson, A. J., & Magi-Galluzzi, C. (2016). Decipher Genomic Classifier Measured on Prostate Biopsy Predicts Metastasis Risk. *Urology*, *90*, 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.01.012>
- Klein, E. A., & Silverman, R. (2008). Inflammation, infection, and prostate cancer. *Current*

Opinion in Urology, 18(3), 315-319. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e3282f9b3b7>

- Klinakis, A., Karagiannis, D., & Rampias, T. (2020). Targeting DNA repair in cancer : Current state and novel approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 77(4), 677-703. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03299-8>
- Klotz, L., Boccon-Gibod, L., Shore, N. D., Andreou, C., Persson, B.-E., Cantor, P., Jensen, J.-K., Olesen, T. K., & Schröder, F. H. (2008). The efficacy and safety of degarelix : A 12-month, comparative, randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer. *BJU international*, 102(11), 1531-1538. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2008.08183.x>
- Kobayashi, A., Okuda, H., Xing, F., Pandey, P. R., Watabe, M., Hirota, S., Pai, S. K., Liu, W., Fukuda, K., Chambers, C., Wilber, A., & Watabe, K. (2011). Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *The Journal of experimental medicine*, 208(13), 2641-2655. <https://doi.org/10.1084/jem.20110840>
- Kocab, A. J., & Duckett, C. S. (2016). Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates. *FEBS Journal*, 283(2), 221-231. <https://doi.org/10.1111/febs.13554>
- Koeneman, K. S., Pan, C. X., Jin, J. K., Pyle, J. M., Flanigan, R. C., Shankey, T. V., & Diaz, M. O. (1998). Telomerase activity, telomere length, and DNA ploidy in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *The Journal of Urology*, 160(4), 1533-1539.
- Kolonel, L. N., Altshuler, D., & Henderson, B. E. (2004). The multiethnic cohort study : Exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nature reviews. Cancer*, 4(7), 519-527. <https://doi.org/10.1038/nrc1389>
- Komiya, A., Suzuki, H., Ueda, T., Yatani, R., Emi, M., Ito, H., & Shimazaki, J. (1996). Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 17(4), 245-253. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199612\)17:4<textless245::AID-GCC6>textgreater3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199612)17:4<textless245::AID-GCC6>textgreater3.0.CO;2-3)
- Kondo, M., Yamaoka, T., Honda, S., Miwa, Y., Katashima, R., Moritani, M., Yoshimoto, K.,

- Hayashi, Y., & Itakura, M. (2000). The Rate of Cell Growth Is Regulated by Purine Biosynthesis via ATP Production and G1 to S Phase Transition1. *The Journal of Biochemistry*, 128(1), 57-64. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022730>
- Kong, Trabucco, S. E., & Zhang, H. (2014). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging. *Interdisciplinary topics in gerontology*, 39, 86-107. <https://doi.org/10.1159/000358901>
- Kong, Zeng, J., Wang, X., Yang, X., Yang, J., McQuarrie, S., McEwan, A., Roa, W., Chen, J., & Xing, J. Z. (2008). Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 4(9), 1537-1543. <https://doi.org/10.1002/sml.200700794>
- Konski, A., Speier, W., Hanlon, A., Beck, J. R., & Pollack, A. (2007). Is proton beam therapy cost effective in the treatment of adenocarcinoma of the prostate? *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(24), 3603-3608. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.0811>
- Krishnan, K. J., Greaves, L. C., Reeve, A. K., & Turnbull, D. (2007). The ageing mitochondrial genome. *Nucleic acids research*, 35(22), 7399-7405. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm635>
- Kristal, A. R., Arnold, K. B., Schenk, J. M., Neuhouser, M. L., Goodman, P., Penson, D. F., & Thompson, I. M. (2008). Dietary patterns, supplement use, and the risk of symptomatic benign prostatic hyperplasia: Results from the prostate cancer prevention trial. *American Journal of Epidemiology*, 167(8), 925-934. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm389>
- Kroemer, G. (2001). [Mitochondrial control of apoptosis]. *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine*, 185(6), 1135-1142; discussion 1143.
- Krokan, H. E., & Bjørås, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>
- Krönke, M. (1999). Involvement of sphingomyelinases in TNF signaling pathways. *Chemistry and Physics of Lipids*, 102(1-2), 157-166. <https://doi.org/10.1016/s0009->

- Krycer, J. R., & Brown, A. J. (2013). Cholesterol accumulation in prostate cancer : A classic observation from a modern perspective. *Biochimica et biophysica acta*, 1835(2), 219-229. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.01.002>
- Kubeš, J., Haas, A., Vondráček, V., Andrlík, M., Navrátil, M., Sláviková, S., Vítek, P., Dědečková, K., Prausová, J., Ondrová, B., Vinakurau, Š., Grebenyuk, A., Doležal, T., Velacková, B., & Rosina, J. (2021). Ultrahypofractionated Proton Radiation Therapy in the Treatment of Low and Intermediate-Risk Prostate Cancer-5-Year Outcomes. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 0(0). <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2021.02.014>
- Kucinska, M., Plewinski, A., Szczolko, W., Kaczmarek, M., Goslinski, T., & Murias, M. (2021). Modeling the photodynamic effect in 2D versus 3D cell culture under normoxic and hypoxic conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, 162, 309-326. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.304>
- Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A., & Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879-44905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>
- Kuemmerle, N. B., Rysman, E., Lombardo, P. S., Flanagan, A. J., Lipe, B. C., Wells, W. A., Pettus, J. R., Froehlich, H. M., Memoli, V. A., Morganelli, P. M., Swinnen, J. V., Timmerman, L. A., Chaychi, L., Fricano, C. J., Eisenberg, B. L., Coleman, W. B., & Kinlaw, W. B. (2011). Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. *Molecular cancer therapeutics*, 10(3), 427-436. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0802>
- Kuhajda, F. P., Jenner, K., Wood, F. D., Hennigar, R. A., Jacobs, L. B., Dick, J. D., & Pasternack, G. R. (1994). Fatty acid synthesis : A potential selective target for antineoplastic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), 6379-6383. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6379>

- Kukat, C., Davies, K. M., Wurm, C. A., Spåhr, H., Bonekamp, N. A., Kühl, I., Joos, F., Polosa, P. L., Park, C. B., Posse, V., Falkenberg, M., Jakobs, S., Kühlbrandt, W., & Larsson, N.-G. (2015). Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(36), 11288-11293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512131112>
- Kukat, C., Wurm, C. A., Spåhr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., & Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(33), 13534-13539. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109263108>
- Kumar, Nagarajan, A., & Uchil. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Kumar, S., Singh, R. K., & Meena, R. (2016). Emerging targets for radioprotection and radiosensitization in radiotherapy. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *37*(9), 11589-11609. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5117-8>
- Kuo, L. J., & Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo (Athens, Greece)*, *22*(3), 305-309.
- Lakshmipathy, U., & Campbell, C. (1999). Double strand break rejoining by mammalian mitochondrial extracts. *Nucleic Acids Research*, *27*(4), 1198-1204.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(3), 178-196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lasnitzki, I., & Mizuno, T. (1977). Induction of the rat prostate gland by androgens in organ culture. *The Journal of Endocrinology*, *74*(1), 47-55. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0740047>
- Lasnitzki, & Mizuno, T. (1980). PROSTATIC INDUCTION: INTERACTION OF

EPITHELIUM AND MESENCHYME FROM NORMAL WILD-TYPE MICE AND ANDROGEN-INSENSITIVE MICE WITH TESTICULAR FEMINIZATION. *Journal of Endocrinology*, 85(3), 423-NP. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0850423>

- Lee, Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2000). Functional Dichotomy of Protein Kinase C (PKC) in Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Signal Transduction in L929 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29290-29298. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000170200>
- Lee, Jeong, E. K., Ju, M. K., Jeon, H. M., Kim, M. Y., Kim, C. H., Park, H. G., Han, S. I., & Kang, H. S. (2017). Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Molecular cancer*, 16(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0577-4>
- Lee, Sensibar, J. A., Dudek, S. M., Hiipakka, R. A., & Liao, S. (1990). Prostatic Ductal System in Rats : Regional Variation in Morphological and Functional Activities1. *Biology of Reproduction*, 43(6), 1079-1086. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.6.1079>
- Lee, Y.-C., Patil, S., Golz, C., Strohmman, C., Ziegler, S., Kumar, K., & Waldmann, H. (2017). A ligand-directed divergent catalytic approach to establish structural and functional scaffold diversity. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14043>
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Bergamini, C., Bianchi, C., & Biondi, A. (2006). Mitochondrial Complex I : Structural and functional aspects. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1757(9-10), 1406-1420. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.007>
- Lenicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., & Seliger, B. (2015). Hydrogen peroxide—Production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell communication and signaling : CCS*, 13, 39. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0118-6>
- Leongamornlert, D., Saunders, E., Dadaev, T., Tymrakiewicz, M., Goh, C., Jugurnauth-Little, S., Kozarewa, I., Fenwick, K., Assiotis, I., Barrowdale, D., Govindasami, K., Guy, M., Sawyer, E., Wilkinson, R., Antoniou, A. C., Eeles, R., & Kote-Jarai, Z. (2014). Frequent germline deleterious mutations in DNA repair genes in familial prostate cancer cases are associated with advanced disease. *British journal of cancer*, 110(6), 1663-1672. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.30>

- Li, Ahonen, T. J., Alanen, K., Xie, J., LeBaron, M. J., Pretlow, T. G., Ealley, E. L., Zhang, Y., Nurmi, M., Singh, B., Martikainen, P. M., & Nevalainen, M. T. (2004). Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer research*, *64*(14), 4774-4782. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3499>
- Li, Han, G., Li, X., Kan, Q., Fan, Z., Li, Y., Ji, Y., Zhao, J., Zhang, M., Grigalavicius, M., Berge, V., Goscinski, M. A., M. Nesland, J., & Suo, Z. (2017). Mitochondrial pyruvate carrier function determines cell stemness and metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncotarget*, *8*(28), 46363-46380. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18199>
- Li, J. J., Hartono, D., Ong, C.-N., Bay, B.-H., & Yung, L.-Y. L. (2010). Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials*, *31*(23), 5996-6003. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.014>
- Li, Pearlman, A. H., & Hsieh, P. (2016). DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair*, *38*, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.019>
- Li, Tan, C.-P., Zhang, W., He, L., Ji, L.-N., & Mao, Z.-W. (2015). Phosphorescent iridium(III)-bis-N-heterocyclic carbene complexes as mitochondria-targeted theranostic and photodynamic anticancer agents. *Biomaterials*, *39*, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.070>
- Li, Wang, K.-N., He, L., Ji, L.-N., & Mao, Z.-W. (2020). Synthesis, photophysical and anticancer properties of mitochondria-targeted phosphorescent cyclometalated iridium(III) N-heterocyclic carbene complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *205*, 110976. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110976>
- Li, Wei, L., Wen, X.-M., Song, H., Li, Q., Lv, J.-W., Kuang, C.-C., Wei, Z.-Z., & Zhang, J.-W. (2014). The Effects of X-Ray Irradiation on the Proliferation and Apoptosis of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Ultrastructural Pathology*, *38*(3), 211-216. <https://doi.org/10.3109/01913123.2013.861569>
- Li, Yang, G., Ebara, S., Satoh, T., Nasu, Y., Timme, T. L., Ren, C., Wang, J., Tahir, S. A., & Thompson, T. C. (2001). Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Research*,

61(11), 4386-4392.

- Li, & Zhang, H. (2016). Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(2), 377-392. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2070-4>
- Liang, Kong, D., Liu, Y., Liang, N., He, M., Ma, S., & Liu, X. (2012). Autophagy inhibition plays the synergetic killing roles with radiation in the multi-drug resistant SKVCR ovarian cancer cells. *Radiation Oncology (London, England)*, 7, 213. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-213>
- Liao, S., & Fang, S. (1970). Receptor-Proteins for Androgens and the Mode of Action of Androgens on Gene Transcription in Ventral Prostate. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 27, p. 17-90). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)61124-3](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)61124-3)
- Liberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., & Skulachev, V. P. (1969). Mechanism of Coupling of Oxidative Phosphorylation and the Membrane Potential of Mitochondria. *Nature*, 222(5198), 1076-1078. <https://doi.org/10.1038/2221076a0>
- Lilja, H., Ulmert, D., Björk, T., Becker, C., Serio, A. M., Nilsson, J.-A., Abrahamsson, P.-A., Vickers, A. J., & Berglund, G. (2007). Long-term prediction of prostate cancer up to 25 years before diagnosis of prostate cancer using prostate kallikreins measured at age 44 to 50 years. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(4), 431-436. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.9351>
- Lilja, H., Ulmert, D., & Vickers, A. J. (2008). Prostate-specific antigen and prostate cancer : Prediction, detection and monitoring. *Nature Reviews. Cancer*, 8(4), 268-278. <https://doi.org/10.1038/nrc2351>
- Lin, W.-W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1175-1183. <https://doi.org/10.1172/JCI31537>
- Lincoln, D. T., Ali Emadi, E. M., Tonissen, K. F., & Clarke, F. M. (2003). The thioredoxin-thioredoxin reductase system : Over-expression in human cancer. *Anticancer Research*, 23(3B), 2425-2433.

- Lindberg, J., Mills, I. G., Klevebring, D., Liu, W., Neiman, M., Xu, J., Wikström, P., Wiklund, P., Wiklund, F., Egevad, L., & Grönberg, H. (2013). The mitochondrial and autosomal mutation landscapes of prostate cancer. *European Urology*, *63*(4), 702-708. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.11.053>
- Lippman, S. M., Klein, E. A., Goodman, P. J., Lucia, M. S., Thompson, I. M., Ford, L. G., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Gaziano, J. M., Hartline, J. A., Parsons, J. K., Bearden, J. D., Crawford, E. D., Goodman, G. E., Claudio, J., Winquist, E., Cook, E. D., Karp, D. D., Walther, P., ... Coltman, C. A. (2009). Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers : The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*, *301*(1), 39-51. <https://doi.org/10.1001/jama.2008.864>
- Liss, M. A., White, J. R., Goros, M., Gelfond, J., Leach, R., Johnson-Pais, T., Lai, Z., Rourke, E., Basler, J., Ankerst, D., & Shah, D. P. (2018). Metabolic Biosynthesis Pathways Identified from Fecal Microbiome Associated with Prostate Cancer. *European Urology*, *74*(5), 575-582. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.06.033>
- Litvinov, I. V., De Marzo, A. M., & Isaacs, J. T. (2003). Is the Achilles' Heel for Prostate Cancer Therapy a Gain of Function in Androgen Receptor Signaling? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *88*(7), 2972-2982. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-022038>
- Liu, Ji, J., Qiu, H., Shao, Z., Wen, X., Chen, A., Yao, S., Zhang, X., Yao, H., & Zhang, L. (2020). Improving radio-chemotherapy efficacy of prostate cancer by co-delivering docetaxel and dbait with biodegradable nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *48*(1), 305-314. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1703726>
- Liu, Uygur, B., Zhang, Z., Shao, L., Romero, D., Vary, C., Ding, Q., & Wu, W.-S. (2010). Slug inhibits proliferation of human prostate cancer cells via downregulation of cyclin D1 expression. *The Prostate*, *70*(16), 1768-1777. <https://doi.org/10.1002/pros.21213>
- Liu, Y., Wu, K., Shi, L., Xiang, F., Tao, K., & Wang, G. (2016). Prognostic Significance of the Metabolic Marker Hexokinase-2 in Various Solid Tumors : A Meta-Analysis. *PloS One*, *11*(11), e0166230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166230>
- Liu, Zuckier, L. S., & Ghesani, N. V. (2010). Dominant uptake of fatty acid over glucose by

- prostate cells : A potential new diagnostic and therapeutic approach. *Anticancer research*, 30(2), 369-374.
- Lloyd, T., Hounsome, L., Mehay, A., Mee, S., Verne, J., & Cooper, A. (2015). Lifetime risk of being diagnosed with, or dying from, prostate cancer by major ethnic group in England 2008–2010. *BMC Medicine*, 13(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0405-5>
- Locke, J. A., Zafarana, G., Malloff, C. A., Lam, W. L., Sykes, J., Pintilie, M., Ramnarine, V. R., Meng, A., Ahmed, O., Jurisica, I., Guns, E. T., van der Kwast, T., Milosevic, M., & Bristow, R. G. (2012). Allelic loss of the loci containing the androgen synthesis gene, StAR, is prognostic for relapse in intermediate-risk prostate cancer. *The Prostate*, 72(12), 1295-1305. <https://doi.org/10.1002/pros.22478>
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies : Integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00237-9)
- Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage : Relevance to radiotherapy. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 25(10), 578-585. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.007>
- London, C. A., Sekhon, H. S., Arora, V., Stein, D. A., Iversen, P. L., & Devi, G. R. (2003). A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer gene therapy*, 10(11), 823-832. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700642>
- Longley, M. J., Humble, M. M., Sharief, F. S., & Copeland, W. C. (2010). Disease variants of the human mitochondrial DNA helicase encoded by C10orf2 differentially alter protein stability, nucleotide hydrolysis, and helicase activity. *The Journal of biological chemistry*, 285(39), 29690-29702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.151795>
- Lönn, P., van der Heide, L. P., Dahl, M., Hellman, U., Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2010). PARP-1 attenuates Smad-mediated transcription. *Molecular cell*, 40(4), 521-532. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.029>

- Lu, L., Li, K., Mao, Y.-H., Qu, H., Yao, B., Zhong, W.-W., Ma, B., & Wang, Z.-Y. (2017). Gold-chrysothanol nanoparticles suppress human prostate cancer progression through inactivating AKT expression and inducing apoptosis and ROS generation in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*, *51*(4), 1089-1103. <https://doi.org/10.3892/ijco.2017.4095>
- Lu, Qin, L., Liu, H.-C., Candas, D., Fan, M., & Li, J. J. (2015). Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition—a Warburg-reversing effect. *PloS one*, *10*(3), e0121046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121046>
- Lynn, J. G., & Putnam, T. J. (1944). Histology of Cerebral Lesions Produced by Focused Ultrasound. *The American Journal of Pathology*, *20*(3), 637-649.
- Mahdy, A. E. M., Cheng, J. C., Li, J., Elojeimy, S., Meacham, W. D., Turner, L. S., Bai, A., Gault, C. R., McPherson, A. S., Garcia, N., Beckham, T. H., Saad, A., Bielawska, A., Bielawski, J., Hannun, Y. A., Keane, T. E., Taha, M. I., Hammouda, H. M., Norris, J. S., & Liu, X. (2009). Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation : AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *17*(3), 430-438. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.281>
- Majewski, N., Nogueira, V., Robey, R. B., & Hay, N. (2004). Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(2), 730-740. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.2.730-740.2004>
- Mani, R. S., Amin, M. A., Li, X., Kalyana-Sundaram, S., Veeneman, B. A., Wang, L., Ghosh, A., Aslam, A., Ramanand, S. G., Rabquer, B. J., Kimura, W., Tran, M., Cao, X., Roychowdhury, S., Dhanasekaran, S. M., Palanisamy, N., Sadek, H. A., Kapur, P., Koch, A. E., & Chinnaiyan, A. M. (2016). Inflammation-Induced Oxidative Stress Mediates Gene Fusion Formation in Prostate Cancer. *Cell reports*, *17*(10), 2620-2631. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.019>
- Mannella, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae.

Biochimica et biophysica acta, 1763(5-6), 542-548.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.006>

- Mantovani, F., Collavin, L., & Del Sal, G. (2019). Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death & Differentiation*, 26(2), 199-212. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>
- Maranto, C., Udhane, V., Hoang, D. T., Gu, L., Alexeev, V., Malas, K., Cardenas, K., Brody, J. R., Rodeck, U., Bergom, C., Iczkowski, K. A., Jacobsohn, K., See, W., Schmitt, S. M., & Nevalainen, M. T. (2018). STAT5A/B BLOCKADE SENSITIZES PROSTATE CANCER TO RADIATION THROUGH INHIBITION OF RAD51 AND DNA REPAIR. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(8), 1917-1931. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2768>
- Marcelli, Marani, M., Li, X., Sturgis, L., Haidacher, S. J., Trial, J., Mannucci, R., Nicoletti, I., & Denner, L. (2000). *Heterogeneous apoptotic responses of prostate cancer cell lines identify an association between sensitivity to staurosporine-induced apoptosis, expression of Bcl-2 family members, and caspase activation*. 14.
- Markert, E. K., Mizuno, H., Vazquez, A., & Levine, A. J. (2011). Molecular classification of prostate cancer using curated expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), 21276-21281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117029108>
- Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism : A therapeutic perspective. *Nature reviews. Clinical oncology*, 14(2), 113. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.1>
- Marzano, C., Gandin, V., Folda, A., Scutari, G., Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2007). Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(6), 872-881. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.021>
- Mason, P. A., Matheson, E. C., Hall, A. G., & Lightowers, R. N. (2003). Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 31(3), 1052-1058. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg167>

- Massard, C., Dubois, C., Raspal, V., Daumar, P., Sibaud, Y., Mounetou, E., Bamdad, M., & Awitor, O. K. (2018). Cytotoxicity Study of Gold Nanoparticles on the Basal-Like Triple-Negative HCC-1937 Breast Cancer Cell Line. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, *09*(01), 13-25. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2018.91002>
- Mateo, D., Morales, P., Ávalos, A., & Haza, A. I. (2014). Oxidative stress contributes to gold nanoparticle-induced cytotoxicity in human tumor cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *24*(3), 161-172. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.869783>
- Mathupala, S. P., Rempel, A., & Pedersen, P. L. (2001). Glucose catabolism in cancer cells : Identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(46), 43407-43412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108181200>
- Matsushita, M., Fujita, K., & Nonomura, N. (2020). Influence of Diet and Nutrition on Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041447>
- McDermott, N., Meunier, A., Mooney, B., Nortey, G., Hernandez, C., Hurley, S., Lynam-Lennon, N., Barsoom, S. H., Bowman, K. J., Marples, B., Jones, G. D. D., & Marignol, L. (2016). Fractionated radiation exposure amplifies the radioresistant nature of prostate cancer cells. *Scientific reports*, *6*, 34796. <https://doi.org/10.1038/srep34796>
- McDonnell, T. J., Navone, N. M., Troncoso, P., Pisters, L. L., Conti, C., von Eschenbach, A. C., Brisbay, S., & Logothetis, C. J. (1997). Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. *The Journal of Urology*, *157*(2), 569-574.
- McKiernan, J., Donovan, M. J., van O'Neill, V., Bentink, S., Noerholm, M., Belzer, S., Skog, J., Kattan, M. W., Partin, A., Andriole, G., Brown, G., Wei, J. T., Thompson, I. M., & Carroll, P. (2016). A Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer at Initial Biopsy. *JAMA oncology*, *2*(7), 882-889. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0097>
- McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Coulter, J. A., Jain, S., Butterworth, K. T., Schettino, G., Dickson, G. R., Hounsell, A. R., O'Sullivan, J. M., Prise, K. M., Hirst, D.

- G., & Currell, F. J. (2011). Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles. *Scientific Reports*, 1(1), 18. <https://doi.org/10.1038/srep00018>
- McMahon, S. J., Paganetti, H., & Prise, K. M. (2016). Optimising element choice for nanoparticle radiosensitisers. *Nanoscale*, 8(1), 581-589. <https://doi.org/10.1039/C5NR07089A>
- McNeal. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, 2(1), 35-49. <https://doi.org/10.1002/pros.2990020105>
- McNeal, & Bostwick, D. G. (1986). Intraductal dysplasia: A premalignant lesion of the prostate. *Human pathology*, 17(1), 64-71. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(86\)80156-3](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(86)80156-3)
- McVary, K. T. (2003). Clinical evaluation of benign prostatic hyperplasia. *Reviews in urology*, 5 Suppl 5, S3-S11.
- Mearns, E. M., & Stamey, T. A. (1968). Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *Investigative Urology*, 5(5), 492-518.
- Medici, D., Hay, E. D., & Olsen, B. R. (2008). Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Molecular biology of the cell*, 19(11), 4875-4887. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0506>
- Meeker, A. K., Hicks, J. L., Iacobuzio-Donahue, C. A., Montgomery, E. A., Westra, W. H., Chan, T. Y., Ronnett, B. M., & De Marzo, A. M. (2004). Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(10), 3317-3326. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0984-03>
- Meeker, A. K., Hicks, J. L., Platz, E. A., March, G. E., Bennett, C. J., Delannoy, M. J., & de Marzo, A. M. (2002). Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer research*, 62(22), 6405-6409.
- Mehta, P. B., Jenkins, B. L., McCarthy, L., Thilak, L., Robson, C. N., Neal, D. E., & Leung, H.

- Y. (2003). MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene*, 22(9), 1381-1389. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206154>
- Melancon, M. P., Zhou, M., & Li, C. (2011). Cancer theranostics with near-infrared light-activatable multimodal nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*, 44(10), 947-956. <https://doi.org/10.1021/ar200022e>
- Memarzadeh, S., Xin, L., Mulholland, D. J., Mansukhani, A., Wu, H., Teitell, M. A., & Witte, O. N. (2007). Enhanced paracrine FGF10 expression promotes formation of multifocal prostate adenocarcinoma and an increase in epithelial androgen receptor. *Cancer cell*, 12(6), 572-585. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.11.002>
- Mendes, F., Sales, T., Domingues, C., Schugk, S., Abrantes, A. M., Gonçalves, A. C., Teixeira, R., Silva, R., Casalta-Lopes, J., Rocha, C., Laranjo, M., Simões, P. C., Sarmento Ribeiro, A. B., Botelho, M. F., & Rosa, M. S. (2015). Effects of X-radiation on lung cancer cells : The interplay between oxidative stress and P53 levels. *Medical Oncology*, 32(12), 266. <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0712-x>
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 7(10), 763-777. <https://doi.org/10.1038/nrc2222>
- Mercader, C., Musquera, M., Franco, A., Alcaraz, A., & Ribal, M. J. (2020). Primary cryotherapy for localized prostate cancer treatment. *The Aging Male*, 1-7. <https://doi.org/10.1080/13685538.2020.1796960>
- Mesicek, J., Lee, H., Feldman, T., Jiang, X., Skobeleva, A., Berdyshev, E. V., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., & Kolesnick, R. (2010). Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells. *Cellular signalling*, 22(9), 1300-1307. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.04.006>
- Minelli, A., Bellezza, I., Conte, C., & Culig, Z. (2009). Oxidative stress-related aging : A role for prostate cancer? *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1795(2), 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.11.001>
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-

- osmotic type of mechanism. *Nature*, *191*, 144-148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Mitra, R., Chao, O., Urasaki, Y., Goodman, O. B., & Le, T. T. (2012). Detection of lipid-rich prostate circulating tumour cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *BMC cancer*, *12*, 540. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-540>
- Modica-Napolitano, J. S., & Aprile, J. R. (2001). Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *49*(1-2), 63-70. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00125-9](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00125-9)
- Molinié, V., Hervé, J.-M., Lugagne, P.-M., Yonneau, L., Ellard, S., Leuret, T., & Botto, H. (2005). [Value of new prostate cancer markers : Alpha methylacyl CoA racemase (P504S) and p63]. *Progres En Urologie: Journal De l'Association Francaise D'urologie Et De La Societe Francaise D'urologie*, *15*(4), 611-615.
- Molinié, V., Vieillefond, A., Michiels, J.-F., & pour la commission prostate de l'AFAQAP. (2008). [Evaluation of p63 and p504s markers for the diagnosis of prostate cancer]. *Annales De Pathologie*, *28*(5), 417-423. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2008.05.004>
- Mollica, V., Rizzo, A., Rosellini, M., Marchetti, A., Ricci, A. D., Cimadamore, A., Scarpelli, M., Bonucci, C., Andrini, E., Errani, C., Santoni, M., Montironi, R., & Massari, F. (2021). Bone Targeting Agents in Patients with Metastatic Prostate Cancer : State of the Art. *Cancers*, *13*(3), 546. <https://doi.org/10.3390/cancers13030546>
- Montanari, M., Rossetti, S., Cavaliere, C., D'Aniello, C., Malzone, M. G., Vanacore, D., Di Franco, R., La Mantia, E., Iovane, G., Piscitelli, R., Muscariello, R., Berretta, M., Perdonà, S., Muto, P., Botti, G., Bianchi, A. A. M., Veneziani, B. M., & Facchini, G. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer : An overview. *Oncotarget*, *8*(21), 35376-35389. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15686>
- Morgan, Parsels, L. A., Maybaum, J., & Lawrence, T. S. (2014). Improving the efficacy of chemoradiation with targeted agents. *Cancer discovery*, *4*(3), 280-291. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0337>
- Morgan, R., Boxall, A., Bhatt, A., Bailey, M., Hindley, R., Langley, S., Whitaker, H. C., Neal, D. E., Ismail, M., Whitaker, H., Annels, N., Michael, A., & Pandha, H. (2011).

- Engrailed-2 (EN2): A tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(5), 1090-1098. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2410>
- Morrison, D. E., Aitken, J. B., Jonge, M. D. de, Issa, F., Harris, H. H., & Rendina, L. M. (2014). Synthesis and Biological Evaluation of a Class of Mitochondrially-Targeted Gadolinium(III) Agents. *Chemistry – A European Journal*, 20(50), 16602-16612. <https://doi.org/10.1002/chem.201404107>
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M. M., Mills, K. D., Patel, P., Hsu, J. T., Hong, A. L., Ford, E., Cheng, H.-L., Kennedy, C., Nunez, N., Bronson, R., ... Alt, F. W. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2), 315-329. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>
- Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., Cumberbatch, M. G., de Santis, M., Fossati, N., Gross, T., Henry, A. M., Joniau, S., Lam, T. B., Mason, M. D., Matveev, V. B., Moldovan, P. C., van den Bergh, R. C. N., van den Broeck, T., van der Poel, H. G., van der Kwast, T. H., Rouvière, O., ... Cornford, P. (2017). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1 : Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European urology*, 71(4), 618-629.
- Mui, Y. F., Fernández-Gallardo, J., Elie, B. T., Gubran, A., Maluenda, I., Sanaú, M., Navarro, O., & Contel, M. (2016). Titanocene–Gold Complexes Containing N-Heterocyclic Carbene Ligands Inhibit Growth of Prostate, Renal, and Colon Cancers in Vitro. *Organometallics*, 35(9), 1218-1227. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.6b00051>
- Mulcahy Levy, J. M., Towers, C. G., & Thorburn, A. (2017). Targeting Autophagy in Cancer. *Nature reviews. Cancer*, 17(9), 528-542. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>
- Müller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., & Pfizenmaier, K. (1995). PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *The EMBO Journal*, 14(9), 1961-1969. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07188.x>

- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence : From physiology to pathology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(7), 482-496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Murat, F.-J., Poissonnier, L., Pasticier, G., & Gelet, A. (2007). High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) for Prostate Cancer. *Cancer Control*, *14*(3), 244-249. <https://doi.org/10.1177/107327480701400307>
- Murata, K., Saga, R., Monzen, S., Tsuruga, E., Hasegawa, K., & Hosokawa, Y. (2019). Understanding the mechanism underlying the acquisition of radioresistance in human prostate cancer cells. *Oncology Letters*, *17*(6), 5830-5838. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10219>
- Murillo-Garzón, V., & Kypta, R. (2017). WNT signalling in prostate cancer. *Nature reviews. Urology*, *14*(11), 683-696. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.144>
- Murtola, T. J., Syväälä, H., Pennanen, P., Bläuer, M., Solakivi, T., Ylikomi, T., & Tammela, T. L. J. (2012). The importance of LDL and cholesterol metabolism for prostate epithelial cell growth. *PloS one*, *7*(6), e39445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039445>
- Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell*, *7*(3), 683-694. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00214-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00214-3)
- Nandy, A., Samanta, T., Mallick, S., Mitra, P., Seth, S. K., Saha, K. D., Al-Deyab, S. S., & Dinda, J. (2016). Synthesis of gold(III) ← gold(I)–NHC through disproportionation : The role of gold(I)–NHC in the induction of apoptosis in HepG2 cells. *New Journal of Chemistry*, *40*(7), 6289-6298. <https://doi.org/10.1039/C5NJ02979A>
- Nass, S., & Nass, M. M. (1963). INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. II. ENZYMATIC AND OTHER HYDROLYTIC TREATMENTS. *The Journal of cell biology*, *19*, 613-629. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.3.613>
- Navone, N. M., Labate, M. E., Troncoso, P., Pisters, L. L., Conti, C. J., von Eschenbach, A. C., & Logothetis, C. J. (1999). P53 mutations in prostate cancer bone metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential. *The*

Journal of Urology, 161(1), 304-308.

- Nelson, W. G., de Marzo, A. M., DeWeese, T. L., Lin, X., Brooks, J. D., Putzi, M. J., Nelson, C. P., Gropman, J. D., & Kensler, T. W. (2001). Preneoplastic prostate lesions : An opportunity for prostate cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 952, 135-144. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02734.x>
- Nelson, W. G., & Kastan, M. B. (1994). DNA strand breaks : The DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), 1815-1823. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1815>
- Ni, J., Cozzi, P. J., Hao, J. L., Beretov, J., Chang, L., Duan, W., Shigdar, S., Delprado, W. J., Graham, P. H., Bucci, J., Kearsley, J. H., & Li, Y. (2014). CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance. *The Prostate*, 74(6), 602-617. <https://doi.org/10.1002/pros.22775>
- Niedzwiecka, K., Tisi, R., Penna, S., Lichocka, M., Plochocka, D., & Kucharczyk, R. (2018). Two mutations in mitochondrial ATP6 gene of ATP synthase, related to human cancer, affect ROS, calcium homeostasis and mitochondrial permeability transition in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(1), 117-131. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.10.003>
- Nieto, C. M., Rider, L. C., & Cramer, S. D. (2014). Influence of stromal–epithelial interactions on androgen action. *Endocrine-Related Cancer*, 21(4), T147-T160. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0138>
- Nieuwdorp, M., Gilijamse, P. W., Pai, N., & Kaplan, L. M. (2014). Role of the microbiome in energy regulation and metabolism. *Gastroenterology*, 146(6), 1525-1533. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.008>
- Nilsson, I., & Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Progress in Cell Cycle Research*, 4, 107-114. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4253-7_10
- Nishiyama, T. (2014). Serum testosterone levels after medical or surgical androgen deprivation : A comprehensive review of the literature. *Urologic Oncology*, 32(1),

38.e17-28. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.03.007>

- Nomiya, T., Tsuji, H., Kawamura, H., Ohno, T., Toyama, S., Shioyama, Y., Nakayama, Y., Nemoto, K., Tsujii, H., & Kamada, T. (2016). A multi-institutional analysis of prospective studies of carbon ion radiotherapy for prostate cancer : A report from the Japan Carbon ion Radiation Oncology Study Group (J-CROS). *Radiotherapy and Oncology*, *121*(2), 288-293. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.10.009>
- Noren Hooten, N., Kompaniez, K., Barnes, J., Lohani, A., & Evans, M. K. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(52), 44679-44690. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255869>
- Nugent, S. M. E., Mothersill, C. E., Seymour, C., McClean, B., Lyng, F. M., & Murphy, J. E. J. (2007). Increased mitochondrial mass in cells with functionally compromised mitochondria after exposure to both direct gamma radiation and bystander factors. *Radiation research*, *168*(1), 134-142. <https://doi.org/10.1667/RR0769.1>
- Nupponen, N., & Visakorpi, T. (1999). Molecular biology of progression of prostate cancer. *European urology*, *35*(5-6), 351-354. <https://doi.org/10.1159/000019907>
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5468), 1053-1058. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053>
- Oehninger, L., Rubbiani, R., & Ott, I. (2013). N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, *42*(10), 3269-3284. <https://doi.org/10.1039/c2dt32617e>
- Ogawa, Y., Kobayashi, T., Nishioka, A., Kariya, S., Hamasato, S., Seguchi, H., & Yoshida, S. (2003). Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral T cells. *International Journal of Molecular Medicine*, *11*(2), 149-152.
- Ogunlewe, J. O., & Osegbe, D. N. (1989). Zinc and cadmium concentrations in indigenous

- blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate. *Cancer*, 63(7), 1388-1392. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19890401\)63:7<textless1388::aid-cncr2820630725>textgreater3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19890401)63:7<textless1388::aid-cncr2820630725>textgreater3.0.co;2-m)
- Ojalill, M., Virtanen, N., Rappu, P., Siljamäki, E., Taimen, P., & Heino, J. (2020). Interaction between prostate cancer cells and prostate fibroblasts promotes accumulation and proteolytic processing of basement membrane proteins. *The Prostate*, 80(9), 715-726. <https://doi.org/10.1002/pros.23985>
- Olivero, O. A., Semino, C., Kassim, A., Lopez-Larrazza, D. M., & Poirier, M. C. (1995). Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA of Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*, 346(4), 221-230. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(95\)90039-x](https://doi.org/10.1016/0165-7992(95)90039-x)
- Olsen, D. R., Bruland, Ø. S., Frykholm, G., & Norderhaug, I. N. (2007). Proton therapy – A systematic review of clinical effectiveness. *Radiotherapy and Oncology*, 83(2), 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2007.03.001>
- Ouyang, M., Zeng, L., Huang, H., Jin, C., Liu, J., Chen, Y., Ji, L., & Chao, H. (2017). Fluorinated cyclometalated iridium(III) complexes as mitochondria-targeted theranostic anticancer agents. *Dalton Transactions*, 46(20), 6734-6744. <https://doi.org/10.1039/C7DT01043E>
- Ouyang, Y., Peng, Y., Li, J., Holmgren, A., & Lu, J. (2018). Modulation of thiol-dependent redox system by metal ions via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Metallomics*, 10(2), 218-228. <https://doi.org/10.1039/c7mt00327g>
- Paganini-Hill, A., Chao, A., Ross, R. K., & Henderson, B. E. (1987). Vitamin A, beta-carotene, and the risk of cancer : A prospective study. *Journal of the National Cancer Institute*, 79(3), 443-448.
- Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D., & Yahalom, J. (2001). A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer research*, 61(2), 439-444.
- Palayoor, S. T., Macklis, R. M., Bump, E. A., & Coleman, C. N. (1995). Modulation of radiation-induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. *Radiation*

research, 141(3), 235-243.

- Papa, S., Martino, P. L., Capitanio, G., Gaballo, A., de Rasmio, D., Signorile, A., & Petruzzella, V. (2012). The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology*, 942, 3-37. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1
- Papadopoulos, V., & Miller, W. L. (2012). Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(6), 771-790. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.002>
- Park, J. S., Sharma, L. K., Li, H., Xiang, R., Holstein, D., Wu, J., Lechleiter, J., Naylor, S. L., Deng, J. J., Lu, J., & Bai, Y. (2009). A heteroplasmic, not homoplasmic, mitochondrial DNA mutation promotes tumorigenesis via alteration in reactive oxygen species generation and apoptosis. *Human Molecular Genetics*, 18(9), 1578-1589. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp069>
- Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O'Sullivan, J. M., Fosså, S. D., Chodacki, A., Wiechno, P., Logue, J., Seke, M., Widmark, A., Johannessen, D. C., Hoskin, P., Bottomley, D., James, N. D., Solberg, A., Syndikus, I., Kliment, J., Wedel, S., ... ALSYMPCA Investigators. (2013). Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 369(3), 213-223. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213755>
- Parr, R. L., Dakubo, G. D., Crandall, K. A., Maki, J., Reguly, B., Aguirre, A., Wittock, R., Robinson, K., Alexander, J. S., Birch-Machin, M. A., Abdel-Malak, M., Froberg, M. K., Diamandis, E. P., & Thayer, R. E. (2006). Somatic mitochondrial DNA mutations in prostate cancer and normal appearing adjacent glands in comparison to age-matched prostate samples without malignant histology. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 8(3), 312-319. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.050112>
- Parsons, J. K., Carter, H. B., Partin, A. W., Windham, B. G., Metter, E. J., Ferrucci, L., Landis, P., & Platz, E. A. (2006). Metabolic factors associated with benign prostatic hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(7), 2562-2568. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2799>

- Pastorino, J. G., Shulga, N., & Hoek, J. B. (2002). Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7610-7618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109950200>
- Patra, K. C., Wang, Q., Bhaskar, P. T., Miller, L., Wang, Z., Wheaton, W., Chandel, N., Laakso, M., Muller, W. J., Allen, E. L., Jha, A. K., Smolen, G. A., Clasquin, M. F., Robey, B., & Hay, N. (2013). Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell*, 24(2), 213-228. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.06.014>
- Paul-Gilloteaux, P., Potiron, V., Delpon, G., Supiot, S., Chiavassa, S., Paris, F., & Costes, S. V. (2017). Optimizing radiotherapy protocols using computer automata to model tumour cell death as a function of oxygen diffusion processes. *Scientific reports*, 7(1), 2280. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01757-6>
- Paull, R., Wolfe, J., Hébert, P., & Sinkula, M. (2003). Investing in nanotechnology. *Nature biotechnology*, 21(10), 1144-1147. <https://doi.org/10.1038/nbt1003-1144>
- Paunesku, T., Gutiontov, S., Brown, K., & Woloschak, G. E. (2015). Radiosensitization and nanoparticles. *Cancer Treatment and Research*, 166, 151-171. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16555-4_7
- Pawlik, T. M., & Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 59(4), 928-942. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005>
- Pearson, C. G., Shikazono, N., Thacker, J., & O'Neill, P. (2004). Enhanced mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when present within a clustered DNA damage site. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 263-270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh150>
- Pelton, K., Freeman, M. R., & Solomon, K. R. (2012). Cholesterol and prostate cancer. *Current opinion in pharmacology*, 12(6), 751-759. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.07.006>
- Peng, H., Wang, Y., & Luo, W. (2020). Multifaceted role of branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Oncogene*, 39(44), 6747-6756. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01480-z>

- Pesini, A., Iglesias, E., Bayona-Bafaluy, M. P., Garrido-Pérez, N., Meade, P., Gaudó, P., Jiménez-Salvador, I., Andrés-Benito, P., Montoya, J., Ferrer, I., Pesini, P., & Ruiz-Pesini, E. (2019). Brain pyrimidine nucleotide synthesis and Alzheimer disease. *Aging*, *11*(19), 8433-8462. <https://doi.org/10.18632/aging.102328>
- Petrocelli, T., Poon, R., Drucker, D. J., Slingerland, J. M., & Rosen, C. F. (1996). UVB radiation induces p21Cip1/WAF1 and mediates G1 and S phase checkpoints. *Oncogene*, *12*(7), 1387-1396.
- Petros, J. A., Baumann, A. K., Ruiz-Pesini, E., Amin, M. B., Sun, C. Q., Hall, J., Lim, S., Issa, M. M., Flanders, W. D., Hosseini, S. H., Marshall, F. F., & Wallace, D. C. (2005). MtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(3), 719-724. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408894102>
- Petrovics, G., Liu, A., Shaheduzzaman, S., Furusato, B., Furusato, B., Sun, C., Chen, Y., Nau, M., Ravindranath, L., Chen, Y., Dobi, A., Srikantan, V., Sesterhenn, I. A., McLeod, D. G., Vahey, M., Moul, J. W., & Srivastava, S. (2005). Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene*, *24*(23), 3847-3852. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208518>
- Pettus, B. J., Chalfant, C. E., & Hannun, Y. A. (2002). Ceramide in apoptosis : An overview and current perspectives. *Biochimica et biophysica acta*, *1585*(2-3), 114-125. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(02\)00331-1](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(02)00331-1)
- Phillips, A. F., Millet, A. R., Tigano, M., Dubois, S. M., Crimmins, H., Babin, L., Charpentier, M., Piganeau, M., Brunet, E., & Sfeir, A. (2017). Single-Molecule Analysis of mtDNA Replication Uncovers the Basis of the Common Deletion. *Molecular cell*, *65*(3), 527-538.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.014>
- Pinto, C. I. G., Bucar, S., Alves, V., Fonseca, A., Abrunhosa, A. J., da Silva, C. L., Guerreiro, J. F., & Mendes, F. (2020). Copper-64 Chloride Exhibits Therapeutic Potential in Three-Dimensional Cellular Models of Prostate Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.609172>
- Pommier, Y., & Kohn, K. W. (2003). Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie :

- Nouvelles cibles thérapeutiques. *médecine/sciences*, 19(2), 173-186.
<https://doi.org/10.1051/medsci/2003192173>
- Prakash, A., & Doublé, S. (2015). Base Excision Repair in the Mitochondria. *Journal of cellular biochemistry*, 116(8), 1490-1499. <https://doi.org/10.1002/jcb.25103>
- Price, D. (1936). Normal development of the prostate and seminal vesicles of the rat with a study of experimental postnatal modifications. *American Journal of Anatomy*, 60(1), 79-127. <https://doi.org/10.1002/aja.1000600105>
- Prins. (2008). Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocrine-related cancer*, 15(3), 649-656. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0043>
- Prins, & Birch, L. (1995). The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology*, 136(3), 1303-1314. <https://doi.org/10.1210/endo.136.3.7867585>
- Prins, & Birch, L. (1997). Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology*, 138(5), 1801-1809. <https://doi.org/10.1210/endo.138.5.5106>
- Prins, Birch, L., & Green, G. L. (1991). Androgen Receptor Localization in Different Cell Types of the Adult Rat Prostate*. *Endocrinology*, 129(6), 3187-3199. <https://doi.org/10.1210/endo-129-6-3187>
- Prins, Birch, L., Habermann, H., Chang, W. Y., Tebeau, C., Putz, O., & Bieberich, C. (2001). Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reproduction, Fertility, and Development*, 13(4), 241-252. <https://doi.org/10.1071/rd00107>
- Prins, Chang, W. Y., Wang, Y., & van Breemen, R. B. (2002). Retinoic acid receptors and retinoids are up-regulated in the developing and adult rat prostate by neonatal estrogen exposure. *Endocrinology*, 143(9), 3628-3640. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220184>
- Prins, & Korach, K. S. (2008). The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73(3), 233-244. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.10.013>

- Prins, Marmer, M., Woodham, C., Chang, W., Kuiper, G., Gustafsson, J. A., & Birch, L. (1998). Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology*, *139*(3), 874-883. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5827>
- Prins, & Putz, O. (2008). Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, *76*(6), 641-659. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00277.x>
- Prise, K. M., & O'Sullivan, J. M. (2009). Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, *9*(5), 351-360. <https://doi.org/10.1038/nrc2603>
- Pritchard, C., Mecham, B., Dumpit, R., Coleman, I., Bhattacharjee, M., Chen, Q., Sikes, R. A., & Nelson, P. S. (2009). Conserved gene expression programs integrate mammalian prostate development and tumorigenesis. *Cancer Research*, *69*(5), 1739-1747. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6817>
- Pu, H., Horbinski, C., Hensley, P. J., Matuszak, E. A., Atkinson, T., & Kyprianou, N. (2014). PARP-1 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate tumorigenesis. *Carcinogenesis*, *35*(11), 2592-2601. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu183>
- Qian, W., Nishikawa, M., Haque, A. Md., Hirose, M., Mashimo, M., Sato, E., & Inoue, M. (2005). Mitochondrial density determines the cellular sensitivity to cisplatin-induced cell death. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *289*(6), C1466-C1475. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00265.2005>
- Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, *33*(1), 9-23. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.09.006>
- Rackham, O., Shearwood, A.-M. J., Thyer, R., McNamara, E., Davies, S. M. K., Callus, B. A., Miranda-Vizueté, A., Berners-Price, S. J., Cheng, Q., Arnér, E. S. J., & Filipovska, A. (2011). Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: Implications for development of specific inhibitors. *Free Radical Biology and Medicine*, *50*(6), 689-699. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.015>

- Rae, C., & Mairs, R. J. (2019). AMPK activation by AICAR sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy. *Oncotarget*, *10*(7), 749-759. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26598>
- Raffo, A. J., Perlman, H., Chen, M. W., Day, M. L., Streitman, J. S., & Buttyan, R. (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Research*, *55*(19), 4438-4445.
- Rahman, W. N., Bishara, N., Ackerly, T., He, C. F., Jackson, P., Wong, C., Davidson, R., & Geso, M. (2009). Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *5*(2), 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.01.014>
- Ramteke, A., Ting, H., Agarwal, C., Mateen, S., Somasagara, R., Hussain, A., Graner, M., Frederick, B., Agarwal, R., & Deep, G. (2015). Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Molecular carcinogenesis*, *54*(7), 554-565. <https://doi.org/10.1002/mc.22124>
- Regulla, D., Schmid, E., Friedland, W., Panzer, W., Heinzmann, U., & Harder, D. (2002). Enhanced values of the RBE and H ratio for cytogenetic effects induced by secondary electrons from an X-irradiated gold surface. *Radiation Research*, *158*(4), 505-515. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)158\[0505:evotra\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)158[0505:evotra]2.0.co;2)
- Reimann, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Dörr, J. R., Tabor, V., Aichele, P., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., & Schmitt, C. A. (2010). Tumor Stroma-Derived TGF- β Limits Myc-Driven Lymphomagenesis via Suv39h1-Dependent Senescence. *Cancer Cell*, *17*(3), 262-272. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.043>
- Reis, S. T. D., Pontes-Júnior, J., Antunes, A. A., Sousa-Canavez, J. M. de, Abe, D. K., Cruz, J. A. S. da, Dall'oglio, M. F., Crippa, A., Passerotti, C. C., Ribeiro-Filho, L. A., Viana, N. I., Srougi, M., & Leite, K. R. M. (2011). Tgf- β 1 expression as a biomarker of poor prognosis in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, *66*(7), 1143-1147. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011000700004>
- Ren, D., Dai, Y., Yang, Q., Zhang, X., Guo, W., Ye, L., Huang, S., Chen, X., Lai, Y., Du, H., Lin, C., Peng, X., & Song, L. (2019). Wnt5a induces and maintains prostate cancer cells

- dormancy in bone. *The Journal of experimental medicine*, 216(2), 428-449. <https://doi.org/10.1084/jem.20180661>
- Renard Penna, R., Brenot-Rossi, I., Salomon, L., & Soulié, M. (2015). Imagerie du cancer de la prostate : IRM et imagerie nucléaire. *Progrès en Urologie*, 25(15), 933-946. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2015.07.016>
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer : How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, 49(11), 1603-1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Ribeiro, R., Monteiro, C., Cunha, V., Oliveira, M. J., Freitas, M., Fraga, A., Príncipe, P., Lobato, C., Lobo, F., Morais, A., Silva, V., Sanches-Magalhães, J., Oliveira, J., Pina, F., Mota-Pinto, A., Lopes, C., & Medeiros, R. (2012). Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 31, 32. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-32>
- Rigoulet, M., Bouchez, C. L., Paumard, P., Ransac, S., Cuvellier, S., Duvezin-Caubet, S., Mazat, J. P., & Devin, A. (2020). Cell energy metabolism : An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1861(11), 148276. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148276>
- Rinninella, E., Cintoni, M., Raoul, P., Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Pulcini, G., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). Food Components and Dietary Habits : Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. *Nutrients*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/nu11102393>
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Robinson, D., van Allen, E. M., Wu, Y.-M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J.-M., Montgomery, B., Taplin, M.-E., Pritchard, C. C., Attard, G., Beltran, H., Abida, W., Bradley, R. K., Vinson, J., Cao, X., Vats, P., Kunju, L. P., Hussain, M., Feng, F. Y., ... Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell*, 162(2), 454. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.053>

- Robles, & Curtis. (2001). P53-Mediated Apoptosis and Genomic Instability Diseases. *Acta Oncologica*, 40(6), 696-701. <https://doi.org/10.1080/02841860152619106>
- Rodríguez-Dorantes, M., Cruz-Hernandez, C. D., Cortés-Ramírez, S. A., Cruz-Burgos, J. M., Reyes-Grajeda, J. P., Peralta-Zaragoza, O., & Losada-Garcia, A. (2021). Prostate Cancer Spheroids : A Three-Dimensional Model for Studying Tumor Heterogeneity. In M. Robles-Flores (Éd.), *Cancer Cell Signaling : Methods and Protocols* (p. 13-17). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0759-6_2
- Roeske, J. C., Nunez, L., Hoggarth, M., Labay, E., & Weichselbaum, R. R. (2007). Characterization of the theoretical radiation dose enhancement from nanoparticles. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 6(5), 395-401. <https://doi.org/10.1177/153303460700600504>
- Rosa, S., Connolly, C., Schettino, G., Butterworth, K. T., & Prise, K. M. (2017). Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnology*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12645-017-0026-0>
- Rossi, S., Graner, E., Febbo, P., Weinstein, L., Bhattacharya, N., Onody, T., Bubley, G., Balk, S., & Loda, M. (2003). Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Molecular cancer research : MCR*, 1(10), 707-715.
- Rostad, K., Hellwinkel, O. J. C., Haukaas, S. A., Halvorsen, O. J., Øyan, A. M., Haese, A., Budäus, L., Albrecht, H., Akslen, L. A., Schlomm, T., & Kalland, K.-H. (2009). TMPRSS2:ERG fusion transcripts in urine from prostate cancer patients correlate with a less favorable prognosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 117(8), 575-582. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02517.x>
- Rottenberg, S., Disler, C., & Perego, P. (2021). The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 21(1), 37-50. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00308-y>
- Rozet, F., Hennequin, C., Beauval, J.-B., Beuzeboc, P., Cormier, L., Fromont, G., Mongiat-Artus, P., Ouzzane, A., Ploussard, G., Azria, D., Brenot-Rossi, I., Cancel-Tassin, G., Cussenot, O., Leuret, T., Rebillard, X., Soulié, M., Renard-Penna, R., & Méjean, A. (2016). [CCAFU french national guidelines 2016-2018 on prostate cancer]. *Progres En*

Urologie: Journal De l'Association Francaise D'urologie Et De La Societe Francaise D'urologie, 27 Suppl 1, S95-S143. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(16\)30705-9](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(16)30705-9)

- Ruan, S., Xie, R., Qin, L., Yu, M., Xiao, W., Hu, C., Yu, W., Qian, Z., Ouyang, L., He, Q., & Gao, H. (2019). Aggregable Nanoparticles-Enabled Chemotherapy and Autophagy Inhibition Combined with Anti-PD-L1 Antibody for Improved Glioma Treatment. *Nano Letters*, 19(11), 8318-8332. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b03968>
- Rudek, B., McNamara, A., Ramos-Méndez, J., Byrne, H., Kuncic, Z., & Schuemann, J. (2019). Radio-enhancement by gold nanoparticles and their impact on water radiolysis for x-ray, proton and carbon-ion beams. *Physics in Medicine and Biology*, 64(17), 175005. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/ab314c>
- Rundlöf, A.-K., & Arnér, E. S. J. (2004). Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6(1), 41-52. <https://doi.org/10.1089/152308604771978336>
- Russell, O., & Turnbull, D. (2014). Mitochondrial DNA disease-molecular insights and potential routes to a cure. *Experimental cell research*, 325(1), 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.03.012>
- Russo, G., Mischì, M., Scheepens, W., de La Rosette, J. J., & Wijkstra, H. (2012). Angiogenesis in prostate cancer : Onset, progression and imaging. *BJU international*, 110(11 Pt C), E794-808. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11444.x>
- Russo, Regis, F., Castelli, T., Favilla, V., Privitera, S., Giardina, R., Cimino, S., & Morgia, G. (2017). A Systematic Review and Meta-analysis of the Diagnostic Accuracy of Prostate Health Index and 4-Kallikrein Panel Score in Predicting Overall and High-grade Prostate Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*, 15(4), 429-439.e1. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2016.12.022>
- Ruvolo, P. P., Deng, X., Carr, B. K., & May, W. S. (1998). A Functional Role for Mitochondrial Protein Kinase C α in Bcl2 Phosphorylation and Suppression of Apoptosis *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(39), 25436-25442. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25436>

- Saad, F., Gleason, D. M., Murray, R., Tchekmedyian, S., Venner, P., Lacombe, L., Chin, J. L., Vinholes, J. J., Goas, J. A., Zheng, M., & Zoledronic Acid Prostate Cancer Study Group. (2004). Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(11), 879-882. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh141>
- Sabin, R. J., & Anderson, R. M. (2011). Cellular Senescence—Its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integrity*, 2(1), 7. <https://doi.org/10.1186/2041-9414-2-7>
- Sacca, P. A., Creydt, V. P., Choi, H., Mazza, O. N., Fletcher, S. J., Vallone, V. B. F., Scorticati, C., Chasseing, N. A., & Calvo, J. C. (2012). Human periprostatic adipose tissue : Its influence on prostate cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 30(1), 113-122. <https://doi.org/10.1159/000339051>
- Sadeghi, R. N., Karami-Tehrani, F., & Salami, S. (2015). Targeting prostate cancer cell metabolism : Impact of hexokinase and CPT-1 enzymes. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(4), 2893-2905. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2919-4>
- Salami, S. S., Schmidt, F., Laxman, B., Regan, M. M., Rickman, D. S., Scherr, D., Bueti, G., Siddiqui, J., Tomlins, S. A., Wei, J. T., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., & Sanda, M. G. (2013). Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urologic oncology*, 31(5), 566-571. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.04.001>
- Salomon, L., Azria, D., Bastide, C., Beuzeboc, P., Cormier, L., Cornud, F., Eiss, D., Eschwège, P., Gaschignard, N., Hennequin, C., Molinié, V., Mongiat Artus, P., Moreau, J.-L., Péneau, M., Peyromaure, M., Ravery, V., Rebillard, X., Richaud, P., Rischmann, P., ... Oncology Committee of the French Association of Urology (CCAFU). (2010). [Recommendations Onco-Urology 2010 : Prostate cancer]. *Progres En Urologie: Journal De l'Association Francaise D'urologie Et De La Societe Francaise D'urologie*, 20 Suppl 4, S217-251. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(10\)70042-7](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(10)70042-7)

- Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Brogna, C., Piccirilli, M., D'Andrea, G., Occhiogrosso, G., Pichierri, A., & Caroli, E. (2005). Brain metastasis from prostate cancer. Report of 13 cases and critical analysis of the literature. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 24(2), 203-207.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 73, 39-85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>
- Sanchez, P., Hernández, A. M., Stecca, B., Kahler, A. J., DeGueme, A. M., Barrett, A., Beyna, M., Datta, M. W., Datta, S., & Ruiz i Altaba, A. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12561-12566. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404956101>
- Santana, P., Peña, L. A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E. H., Fuks, Z., & Kolesnick, R. (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*, 86(2), 189-199. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80091-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80091-4)
- Saramäki, O. R., Tammela, T. L. J., Martikainen, P. M., Vessella, R. L., & Visakorpi, T. (2006). The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 45(7), 639-645. <https://doi.org/10.1002/gcc.20327>
- Sarma, A. V., Parsons, J. K., McVary, K., & Wei, J. T. (2009). Diabetes and benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms—what do we know? *The Journal of urology*, 182(6 Suppl), S32-7. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.07.088>
- Sato, M., & Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(8), 1979-1984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.010>
- Sawada, M., Nakashima, S., Banno, Y., Yamakawa, H., Takenaka, K., Shinoda, J., Nishimura,

- Y., Sakai, N., & Nozawa, Y. (2000). Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells. *Oncogene*, *19*(31), Article 31. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203699>
- Sawada, M., Nakashima, S., Kiyono, T., Nakagawa, M., Yamada, J., Yamakawa, H., Banno, Y., Shinoda, J., Nishimura, Y., Nozawa, Y., & Sakai, N. (2001). P53 regulates ceramide formation by neutral sphingomyelinase through reactive oxygen species in human glioma cells. *Oncogene*, *20*(11), 1368-1378. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204207>
- Schaeffer, E. M., Marchionni, L., Huang, Z., Simons, B., Blackman, A., Yu, W., Parmigiani, G., & Berman, D. M. (2008). Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer. *Oncogene*, *27*(57), 7180-7191. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.327>
- Schapira, A. H. V. (2006). Mitochondrial disease. *Lancet (London, England)*, *368*(9529), 70-82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68970-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68970-8)
- Schapira, A. H. V. (2012). Mitochondrial diseases. *Lancet (London, England)*, *379*(9828), 1825-1834. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61305-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61305-6)
- Scheble, V. J., Braun, M., Beroukhim, R., Mermel, C. H., Ruiz, C., Wilbertz, T., Stiedl, A.-C., Petersen, K., Reischl, M., Kuefer, R., Schilling, D., Fend, F., Kristiansen, G., Meyerson, M., Rubin, M. A., Bubendorf, L., & Perner, S. (2010). ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *23*(8), 1061-1067. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.87>
- Scher, H. I., Lu, D., Schreiber, N. A., Louw, J., Graf, R. P., Vargas, H. A., Johnson, A., Jendrisak, A., Bambury, R., Danila, D., McLaughlin, B., Wahl, J., Greene, S. B., Heller, G., Marrinucci, D., Fleisher, M., & Dittamore, R. (2016). Association of AR-V7 on Circulating Tumor Cells as a Treatment-Specific Biomarker With Outcomes and Survival in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncology*, *2*(11), 1441-1449. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1828>
- Schirris, T. J. J., Ritschel, T., Herma Renkema, G., Willems, P. H. G. M., Smeitink, J. A. M., & Russel, F. G. M. (2015). Mitochondrial ADP/ATP exchange inhibition : A novel off-

- target mechanism underlying ibipinabant-induced myotoxicity. *Scientific reports*, 5, 14533. <https://doi.org/10.1038/srep14533>
- Schlechte, H., Lenk, S. V., Löning, T., Schnorr, D., Rudolph, B. D., Ditscherlein, G., & Loening, S. A. (1998). P53 tumour suppressor gene mutations in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *European urology*, 34(5), 433-440. <https://doi.org/10.1159/000019778>
- Schöder, H., & Larson, S. M. (2004). Positron emission tomography for prostate, bladder, and renal cancer. *Seminars in nuclear medicine*, 34(4), 274-292. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2004.06.004>
- Schöpf, B., Weissensteiner, H., Schäfer, G., Fazzini, F., Charoentong, P., Naschberger, A., Rupp, B., Fendt, L., Bukur, V., Giese, I., Sorn, P., Sant'Anna-Silva, A. C., Iglesias-Gonzalez, J., Sahin, U., Kronenberg, F., Gnaiger, E., & Klocker, H. (2020). OXPHOS remodeling in high-grade prostate cancer involves mtDNA mutations and increased succinate oxidation. *Nature Communications*, 11(1), 1487. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15237-5>
- Schroek, F. R., Jacobs, B. L., Bhayani, S. B., Nguyen, P. L., Penson, D., & Hu, J. (2017). Cost of New Technologies in Prostate Cancer Treatment : Systematic Review of Costs and Cost Effectiveness of Robotic-assisted Laparoscopic Prostatectomy, Intensity-modulated Radiotherapy, and Proton Beam Therapy. *European Urology*, 72(5), 712-735. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.03.028>
- Schuster, D. M., Nanni, C., & Fanti, S. (2016). PET Tracers Beyond FDG in Prostate Cancer. *Seminars in nuclear medicine*, 46(6), 507-521. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.07.005>
- Schwartz, G. G., & Hulka, B. S. (1990). Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer ? (Hypothesis). *Anticancer research*, 10(5A), 1307-1311.
- Serizawa, H., Mäkelä, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A., & Young, R. A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature*, 374(6519), 280-282. <https://doi.org/10.1038/374280a0>

- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593-602. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81902-9)
- Sexl, V., Diehl, J. A., Sherr, C. J., Ashmun, R., Beach, D., & Roussel, M. F. (1999). A rate limiting function of cdc25A for S phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2. *Oncogene*, 18(3), 573-582. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202362>
- Shannon, J. M., & Cunha, G. R. (1983). Autoradiographic localization of androgen binding in the developing mouse prostate. *The Prostate*, 4(4), 367-373. <https://doi.org/10.1002/pros.2990040406>
- Shapiro, G. I., Edwards, C. D., Ewen, M. E., & Rollins, B. J. (1998). P16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), 378-387. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.1.378>
- Sharma, P. M., Ponnaiya, B., Taveras, M., Shuryak, I., Turner, H., & Brenner, D. J. (2015). High Throughput Measurement of γ H2AX DSB Repair Kinetics in a Healthy Human Population. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121083>
- Sharma, & Sampath. (2019). Mitochondrial DNA Integrity : Role in Health and Disease. *Cells*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/cells8020100>
- Shen, M. M., & Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer : New prospects for old challenges. *Genes & development*, 24(18), 1967-2000. <https://doi.org/10.1101/gad.1965810>
- Shimada, K., Anai, S., Fujii, T., Tanaka, N., Fujimoto, K., & Konishi, N. (2013). Syndecan-1 (CD138) contributes to prostate cancer progression by stabilizing tumour-initiating cells. *The Journal of pathology*, 231(4), 495-504. <https://doi.org/10.1002/path.4271>
- Shimada, K., Nakamura, M., de Velasco, M. A., Tanaka, M., Ouji, Y., & Konishi, N. (2009). Syndecan-1, a new target molecule involved in progression of androgen-independent prostate cancer. *Cancer science*, 100(7), 1248-1254. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01174.x>

- Shimizu, H., Ross, R. K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B. E., & Mack, T. M. (1991). Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *British journal of cancer*, *63*(6), 963-966. <https://doi.org/10.1038/bjc.1991.210>
- Shimura, T., Noma, N., Sano, Y., Ochiai, Y., Oikawa, T., Fukumoto, M., & Kunugita, N. (2014). AKT-mediated enhanced aerobic glycolysis causes acquired radioresistance by human tumor cells. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, *112*(2), 302-307. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.07.015>
- Shimura, T., Sasatani, M., Kawai, H., Kamiya, K., Kobayashi, J., Komatsu, K., & Kunugita, N. (2017). A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *16*(6), 565-573. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1284716>
- Shipitsin, M., Small, C., Choudhury, S., Giladi, E., Friedlander, S., Nardone, J., Hussain, S., Hurley, A. D., Ernst, C., Huang, Y. E., Chang, H., Nifong, T. P., Rimm, D. L., Duniy, J., Loda, M., Berman, D. M., & Blume-Jensen, P. (2014). Identification of proteomic biomarkers predicting prostate cancer aggressiveness and lethality despite biopsy-sampling error. *British journal of cancer*, *111*(6), 1201-1212. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.396>
- Shokolenko, I. N., Wilson, G. L., & Alexeyev, M. F. (2013). Persistent damage induces mitochondrial DNA degradation. *DNA repair*, *12*(7), 488-499. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.023>
- Shokolenko, I. N., Wilson, G. L., & Alexeyev, M. F. (2016). The “fast” and the “slow” modes of mitochondrial DNA degradation. *Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis*, *27*(1), 490-498. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.905829>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *66*(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *69*(1), 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>

- Sigounas, G., Anagnostou, A., & Steiner, M. (1997). D α -tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutrition and cancer*, 28(1), 30-35. <https://doi.org/10.1080/01635589709514549>
- Siiteri, P. K., & Wilson, J. D. (1974). Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 38(1), 113-125. <https://doi.org/10.1210/jcem-38-1-113>
- Simpson, P. V., Casari, I., Paternoster, S., Skelton, B. W., Falasca, M., & Massi, M. (2017). Defining the Anti-Cancer Activity of Tricarbonyl Rhenium Complexes : Induction of G2/M Cell Cycle Arrest and Blockade of Aurora-A Kinase Phosphorylation. *Chemistry – A European Journal*, 23(27), 6518-6521. <https://doi.org/10.1002/chem.201701208>
- Singh, K. K., Russell, J., Sigala, B., Zhang, Y., Williams, J., & Keshav, K. F. (1999). Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents. *Oncogene*, 18(48), Article 48. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203056>
- Sinnott, J. A., Rider, J. R., Carlsson, J., Gerke, T., Tyekucheva, S., Penney, K. L., Sesso, H. D., Loda, M., Fall, K., Stampfer, M. J., Mucci, L. A., Pawitan, Y., Andersson, S.-O., & Andr n, O. (2015). Molecular differences in transition zone and peripheral zone prostate tumors. *Carcinogenesis*, 36(6), 632-638. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv051>
- Sitaram, N., & Nagaraj, R. (1995). Seminalplasmin. *BioEssays*, 17(5), 415-422. <https://doi.org/10.1002/bies.950170509>
- Skvortsova, Skvortsov, S., Stasyk, T., Raju, U., Popper, B.-A., Schiestl, B., von Guggenberg, E., Neher, A., Bonn, G. K., Huber, L. A., & Lukas, P. (2008). Intracellular signaling pathways regulating radioresistance of human prostate carcinoma cells. *Proteomics*, 8(21), 4521-4533. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800113>
- Slater, J. D., Rossi, C. J., Yonemoto, L. T., Bush, D. A., Jabola, B. R., Levy, R. P., Grove, R. I., Preston, W., & Slater, J. M. (2004). Proton therapy for prostate cancer : The initial Loma Linda University experience. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 59(2), 348-352. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.10.011>
- Smith, A. L. M., Whitehall, J. C., Bradshaw, C., Gay, D., Robertson, F., Blain, A. P., Hudson,

- G., Pyle, A., Houghton, D., Hunt, M., Sampson, J. N., Stamp, C., Mallett, G., Amarnath, S., Leslie, J., Oakley, F., Wilson, L., Baker, A., Russell, O. M., ... Greaves, L. C. (2020). Age-associated mitochondrial DNA mutations cause metabolic remodeling that contributes to accelerated intestinal tumorigenesis. *Nature Cancer*, *1*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00112-5>
- Smith, Saad, F., Coleman, R., Shore, N., Fizazi, K., Tombal, B., Miller, K., Sieber, P., Karsh, L., Damião, R., Tammela, T. L., Egerdie, B., Van Poppel, H., Chin, J., Morote, J., Gómez-Veiga, F., Borkowski, T., Ye, Z., Kupic, A., ... Goessl, C. (2012). Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: Results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, *379*(9810), 39-46. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61226-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61226-9)
- Sokoll, L. J., Ellis, W., Lange, P., Noteboom, J., Elliott, D. J., Deras, I. L., Blase, A., Koo, S., Sarno, M., Rittenhouse, H., Groskopf, J., & Vessella, R. L. (2008). A multicenter evaluation of the PCA3 molecular urine test: Pre-analytical effects, analytical performance, and diagnostic accuracy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *389*(1-2), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.11.003>
- Solomon, K. R., & Freeman, M. R. (2011). The complex interplay between cholesterol and prostate malignancy. *The Urologic clinics of North America*, *38*(3), 243-259. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2011.04.001>
- Sreekumar, A., Laxman, B., Rhodes, D. R., Bhagavathula, S., Harwood, J., Giacherio, D., Ghosh, D., Sanda, M. G., Rubin, M. A., & Chinnaiyan, A. M. (2004). Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *96*(11), 834-843. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh145>
- Stephens, F. O. (1997). Phytoestrogens and prostate cancer: Possible preventive role. *The Medical journal of Australia*, *167*(3), 138-140. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1997.tb138812.x>
- Suarez, C. D., Deng, X., & Hu, C.-D. (2014). Targeting CREB inhibits radiation-induced neuroendocrine differentiation and increases radiation-induced cell death in prostate cancer cells. *American journal of cancer research*, *4*(6), 850-861.

- Suburu, J., & Chen, Y. Q. (2012). Lipids and prostate cancer. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 98(1-2), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.03.003>
- Sugimura, Y., Cunha, G. R., & Donjacour, A. A. (1986). Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biology of Reproduction*, 34(5), 961-971. <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.5.961>
- Sun, Arnold, R. S., Q Sun, C., & A Petros, J. (2015). A mitochondrial DNA mutation influences the apoptotic effect of statins on prostate cancer : Mitochondrial DNA, Statins, and Cancer. *The Prostate*, 75(16), 1916-1925. <https://doi.org/10.1002/pros.23089>
- Sun, Zhang, M., Li, D., Li, M., & Wong, A. S.-T. (2016). Enhanced anti-cancer activities of a gold(III) pyrrolidinedithiocarbamate complex incorporated in a biodegradable metal-organic framework. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 163, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.020>
- Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Schenk, H., Sidorkina, O., Laval, J., Trunk, J., Monteleone, D., & Sutherland, J. (2001). Clustered DNA damages induced by high and low LET radiation, including heavy ions. *Physica Medica: PM: An International Journal Devoted to the Applications of Physics to Medicine and Biology: Official Journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*, 17 Suppl 1, 202-204.
- Suzuki, H., Freije, D., Nusskern, D. R., Okami, K., Cairns, P., Sidransky, D., Isaacs, W. B., & Bova, G. S. (1998). Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer Research*, 58(2), 204-209.
- Suzuki, H., Ueda, T., Ichikawa, T., & Ito, H. (2003). Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 10(2), 209-216. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0100209>
- Sweeney, C. J., Chen, Y.-H., Carducci, M., Liu, G., Jarrard, D. F., Eisenberger, M., Wong, Y.-N., Hahn, N., Kohli, M., Cooney, M. M., Dreicer, R., Vogelzang, N. J., Picus, J., Shevrin, D., Hussain, M., Garcia, J. A., & DiPaola, R. S. (2015). Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 373(8), 737-746. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503747>

- Swinnen, Heemers, H., van de Sande, T., de Schrijver, E., Brusselmans, K., Heyns, W., & Verhoeven, G. (2004). Androgens, lipogenesis and prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 92(4), 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.013>
- Swinnen, Roskams, T., Joniau, S., van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., Heyns, W., & Verhoeven, G. (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *International journal of cancer*, 98(1), 19-22. <https://doi.org/10.1002/ijc.10127>
- Swinnen, Ulrix, W., Heyns, W., & Verhoeven, G. (1997). Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens : Evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 12975-12980. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12975>
- Szumiel, I. (2015). Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability : The pivotal role of mitochondria. *International journal of radiation biology*, 91(1), 1-12. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.934929>
- Takagi, M., Demizu, Y., Terashima, K., Fujii, O., Jin, D., Niwa, Y., Daimon, T., Murakami, M., Fuwa, N., & Okimoto, T. (2017). Long-term outcomes in patients treated with proton therapy for localized prostate cancer. *Cancer Medicine*, 6(10), 2234-2243. <https://doi.org/10.1002/cam4.1159>
- Tang, J. T., Yamazaki, H., Inoue, T., Koizumi, M., Yoshida, K., Ozeki, S., & Inoue, T. (1999). Mitochondrial DNA influences radiation sensitivity and induction of apoptosis in human fibroblasts. *Anticancer Research*, 19(6B), 4959-4964.
- Tang, Ma, J., Sun, J., Yang, L., Yang, F., Zhang, W., Li, R., Wang, L., Wang, Y., & Wang, H. (2018). Genistein and AG1024 synergistically increase the radiosensitivity of prostate cancer cells. *Oncology Reports*, 40(2), 579-588. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6468>
- Tantivejkul, K., Kalikin, L. M., & Pienta, K. J. (2004). Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *Journal of cellular biochemistry*, 91(4), 706-717. <https://doi.org/10.1002/jcb.10664>

- Tauber, J., Dlasková, A., Šantorová, J., Smolková, K., Alán, L., Špaček, T., Plecítá-Hlavatá, L., Jabůrek, M., & Ježek, P. (2013). Distribution of mitochondrial nucleoids upon mitochondrial network fragmentation and network reintegration in HEPG2 cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(3), 593-603. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.11.019>
- Taylor, P. R., Dawsey, S. M., Hu, N., Albanes, D., & Wu, M. (1995). Nutritional intervention to prevent hereditary cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 17, 43-47.
- Teiten, M.-H., Gaascht, F., Eifes, S., Dicato, M., & Diederich, M. (2010). Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes & nutrition*, 5(1), 61-74. <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0152-3>
- Testa, C., Pultrone, C., Manners, D. N., Schiavina, R., & Lodi, R. (2016). Metabolic Imaging in Prostate Cancer: Where We Are. *Frontiers in oncology*, 6, 225. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00225>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Thin, R. (1999). Prostatitis. *Hospital Medicine*, 60(10), 710-713. <https://doi.org/10.12968/hosp.1999.60.10.1213>
- Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Ford, L. G., Lippman, S. M., Crawford, E. D., Crowley, J. J., & Coltman, C. A. (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≥ 4.0 ng per milliliter. *The New England journal of medicine*, 350(22), 2239-2246. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031918>
- Thorley, A. J., & Tetley, T. D. (2013). New perspectives in nanomedicine. *Pharmacology & therapeutics*, 140(2), 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.008>
- Thyagarajan, B., Padua, R. A., & Campbell, C. (1996). Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *The Journal of Biological Chemistry*,

271(44), 27536-27543. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27536>

- Timms, B. G. (2008). Prostate development : A historical perspective. *Differentiation*, 76(6), 565-577. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x>
- Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Cancer risk : Role of environment—Response. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6223), 729-731. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6592>
- Tomlins, S. A., Aubin, S. M. J., Siddiqui, J., Lonigro, R. J., Sefton-Miller, L., Miick, S., Williamsen, S., Hodge, P., Meinke, J., Blase, A., Penabella, Y., Day, J. R., Varambally, R., Han, B., Wood, D., Wang, L., Sanda, M. G., Rubin, M. A., Rhodes, D. R., ... Chinnaiyan, A. M. (2011). Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Science translational medicine*, 3(94), 94ra72. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001970>
- Tomlins, S. A., Day, J. R., Lonigro, R. J., Hovelson, D. H., Siddiqui, J., Kunju, L. P., Dunn, R. L., Meyer, S., Hodge, P., Groskopf, J., Wei, J. T., & Chinnaiyan, A. M. (2016). Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *European urology*, 70(1), 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.04.039>
- Tomlins, S. A., Mehra, R., Rhodes, D. R., Cao, X., Wang, L., Dhanasekaran, S. M., Kalyana-Sundaram, S., Wei, J. T., Rubin, M. A., Pienta, K. J., Shah, R. B., & Chinnaiyan, A. M. (2007). Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nature genetics*, 39(1), 41-51. <https://doi.org/10.1038/ng1935>
- Torrano, V., Valcarcel-Jimenez, L., Cortazar, A. R., Liu, X., Urosevic, J., Castillo-Martin, M., Fernández-Ruiz, S., Morciano, G., Caro-Maldonado, A., Guiu, M., Zúñiga-García, P., Graupera, M., Bellmunt, A., Pandya, P., Lorente, M., Martín-Martín, N., Sutherland, J. D., Sanchez-Mosquera, P., Bozal-Basterra, L., ... Carracedo, A. (2016). The metabolic co-regulator PGC1 α suppresses prostate cancer metastasis. *Nature Cell Biology*, 18(6), 645-656. <https://doi.org/10.1038/ncb3357>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>

- Tørring, N., Dagnaes-Hansen, F., Sørensen, B. S., Nexø, E., & Hynes, N. E. (2003). ErbB1 and prostate cancer: ErbB1 activity is essential for androgen-induced proliferation and protection from the apoptotic effects of LY294002. *The Prostate*, *56*(2), 142-149. <https://doi.org/10.1002/pros.10245>
- Toulany, M. (2019). Targeting DNA Double-Strand Break Repair Pathways to Improve Radiotherapy Response. *Genes*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/genes10010025>
- Toulany, M., & Rodemann, H. P. (2015). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling as a key mediator of tumor cell responsiveness to radiation. *Seminars in Cancer Biology*, *35*, 180-190. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.07.003>
- Tournebize, J., Boudier, A., Joubert, O., Eidi, H., Bartosz, G., Maincent, P., Leroy, P., & Sapin-Minet, A. (2012). Impact of gold nanoparticle coating on redox homeostasis. *International Journal of Pharmaceutics*, *438*(1-2), 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.026>
- Townley, H. E., Kim, J., & Dobson, P. J. (2012). In vivo demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped titania nanoparticles. *Nanoscale*, *4*(16), 5043-5050. <https://doi.org/10.1039/c2nr30769c>
- Tran, DeGiovanni, P.-J., Piel, B., & Rai, P. (2017). Cancer nanomedicine: A review of recent success in drug delivery. *Clinical and Translational Medicine*, *6*(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0175-0>
- Tran, Ouk, S., Clegg, N. J., Chen, Y., Watson, P. A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P. M., Yoo, D., Kwon, A., Wasielewska, T., Welsbie, D., Chen, C. D., Higano, C. S., Beer, T. M., Hung, D. T., Scher, H. I., Jung, M. E., & Sawyers, C. L. (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5928), 787-790. <https://doi.org/10.1126/science.1168175>
- Trapp, S., & Horobin, R. W. (2005). A predictive model for the selective accumulation of chemicals in tumor cells. *European Biophysics Journal: EBJ*, *34*(7), 959-966. <https://doi.org/10.1007/s00249-005-0472-1>
- Tsugane, S., Mirra, A. P., Gotlieb, S. L. D., Laurenti, R., & Watanabe, S. (1990). *Cancer*

- incidence rates among Japanese immigrants in the city of Paulo, Brazil, 1969—78.* 5.
- Tsui, K.-H., Chang, P.-L., & Juang, H.-H. (2006). Zinc blocks gene expression of mitochondrial aconitase in human prostatic carcinoma cells. *International journal of cancer*, *118*(3), 609-615. <https://doi.org/10.1002/ijc.21411>
- Tu, S. M., McConnell, K., Marin, M. C., Campbell, M. L., Fernandez, A., von Eschenbach, A. C., & McDonnell, T. J. (1995). Combination adriamycin and suramin induces apoptosis in bcl-2 expressing prostate carcinoma cells. *Cancer Letters*, *93*(2), 147-155. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)03795-x](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)03795-x)
- Tuppin, P. (2016). *Dépistage individuel du cancer de la prostate chez les hommes de 40 ans et plus, France, 2009-2015. Données du système national d'information inter-régimes de l'Assurance maladie.* 7.
- Tuteja, N., & Tuteja, R. (2001). Unraveling DNA repair in human : Molecular mechanisms and consequences of repair defect. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *36*(3), 261-290. <https://doi.org/10.1080/20014091074192>
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., & Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal*, *27*(2), 433-446. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>
- Twum-Ampofo, J., Fu, D.-X., Passaniti, A., Hussain, A., & Siddiqui, M. M. (2016). Metabolic targets for potential prostate cancer therapeutics. *Current opinion in oncology*, *28*(3), 241-247. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000276>
- Urig, S., Fritz-Wolf, K., Réau, R., Herold-Mende, C., Tóth, K., Davioud-Charvet, E., & Becker, K. (2006). Undressing of phosphine gold(I) complexes as irreversible inhibitors of human disulfide reductases. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *45*(12), 1881-1886. <https://doi.org/10.1002/anie.200502756>
- Uygur, B., & Wu, W.-S. (2011). SLUG promotes prostate cancer cell migration and invasion via CXCR4/CXCL12 axis. *Molecular cancer*, *10*, 139. <https://doi.org/10.1186/1476->

- Vale, C. L., Burdett, S., Rydzewska, L. H. M., Albiges, L., Clarke, N. W., Fisher, D., Fizazi, K., Gravis, G., James, N. D., Mason, M. D., Parmar, M. K. B., Sweeney, C. J., Sydes, M. R., Tombal, B., Tierney, J. F., & STOpCaP Steering Group. (2016). Addition of docetaxel or bisphosphonates to standard of care in men with localised or metastatic, hormone-sensitive prostate cancer: A systematic review and meta-analyses of aggregate data. *The Lancet. Oncology*, *17*(2), 243-256. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00489-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00489-1)
- Van Booven, D. J., Kuchakulla, M., Pai, R., Frech, F. S., Ramasahayam, R., Reddy, P., Parmar, M., Ramasamy, R., & Arora, H. (2021). A Systematic Review of Artificial Intelligence in Prostate Cancer. *Research and Reports in Urology, Volume 13*, 31-39. <https://doi.org/10.2147/RRU.S268596>
- van den Eeden, S. K., Lu, R., Zhang, N., Quesenberry, C. P., Shan, J., Han, J. S., Tsiatis, A. C., Leimpeter, A. D., Lawrence, H. J., Febbo, P. G., & Presti, J. C. (2018). A Biopsy-based 17-gene Genomic Prostate Score as a Predictor of Metastases and Prostate Cancer Death in Surgically Treated Men with Clinically Localized Disease. *European urology*, *73*(1), 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.09.013>
- van der Blik, A. M., Shen, Q., & Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *5*(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011072>
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J. J., & van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature genetics*, *28*(3), 211-212. <https://doi.org/10.1038/90034>
- van Neste, Partin, A. W., Stewart, G. D., Epstein, J. I., Harrison, D. J., & van Criekinge, W. (2016). Risk score predicts high-grade prostate cancer in DNA-methylation positive, histopathologically negative biopsies. *The Prostate*, *76*(12), 1078-1087. <https://doi.org/10.1002/pros.23191>
- van Gisbergen, M. W., Voets, A. M., Starmans, M. H. W., de Coo, I. F. M., Yadak, R.,

- Hoffmann, R. F., Boutros, P. C., Smeets, H. J. M., Dubois, L., & Lambin, P. (2015). How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 764, 16-30. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.01.001>
- van Leenders, G. J. L. H., Dukers, D., Hessels, D., van den Kieboom, S. W. M., Hulsbergen, C. A., Witjes, J. A., Otte, A. P., Meijer, C. J., & Raaphorst, F. M. (2007). Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in prostate cancer with adverse pathologic and clinical features. *European urology*, 52(2), 455-463. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.11.020>
- van Neste, L., Hendriks, R. J., Dijkstra, S., Trooskens, G., Cornel, E. B., Jannink, S. A., de Jong, H., Hessels, D., Smit, F. P., Melchers, W. J. G., Leyten, G. H. J. M., de Reijke, T. M., Vergunst, H., Kil, P., Knipscheer, B. C., Hulsbergen-van de Kaa, C. A., Mulders, P. F. A., van Oort, I. M., van Criekinge, W., & Schalken, J. A. (2016). Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker-Based Risk Score. *European urology*, 70(5), 740-748. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.04.012>
- Vaupel, P., Schmidberger, H., & Mayer, A. (2019). The Warburg effect: Essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International Journal of Radiation Biology*, 95(7), 912-919. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589653>
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, 13(7), 379-386. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>
- Visbal, R., Fernández-Moreira, V., Marzo, I., Laguna, A., & Gimeno, M. C. (2016). Cytotoxicity and biodistribution studies of luminescent Au(I) and Ag(I) N-heterocyclic carbenes. Searching for new biological targets. *Dalton Transactions*, 45(38), 15026-15033. <https://doi.org/10.1039/C6DT02878K>
- Vlaeminck-Guillem, V., Campos-Fernandes, J.-L., Champetier, D., Chikh, K., Decaussin-Petrucci, M., Devonec, M., Gobeaux, N., Paparel, P., Perrin, P., Rodriguez-Lafrasse, C., & Ruffion, A. (2011). [Value of PCA3 urinary test for prostate biopsy decision: The

- Lyon-Sud University Hospital experience]. *Annales De Biologie Clinique*, 69(1), 31-39.
<https://doi.org/10.1684/abc.2010.0513>
- Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). P53 in health and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(4), 275-283. <https://doi.org/10.1038/nrm2147>
- Wahab, R., Dwivedi, S., Khan, F., Mishra, Y. K., Hwang, I. H., Shin, H.-S., Musarrat, J., & Al-Khedhairi, A. A. (2014). Statistical analysis of gold nanoparticle-induced oxidative stress and apoptosis in myoblast (C2C12) cells. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 123, 664-672. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.012>
- Wang, Huang, X., Zheng, X., Wang, X., Li, S., Zhang, L., Yang, Z., & Xia, Z. (2013). Enrichment of prostate cancer stem-like cells from human prostate cancer cell lines by culture in serum-free medium and chemoradiotherapy. *International journal of biological sciences*, 9(5), 472-479. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5855>
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z., & Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761-773. <https://doi.org/10.7150/jca.17648>
- Wang, Wang, J., & Sadar, M. D. (2008). Crosstalk between the androgen receptor and beta-catenin in castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Research*, 68(23), 9918-9927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1718>
- Wang, Xiong, H., Wu, F., Zhang, Y., Wang, J., Zhao, L., Guo, X., Chang, L.-J., Zhang, Y., You, M. J., Koochekpour, S., Saleem, M., Huang, H., Lu, J., & Deng, Y. (2014). Hexokinase 2-mediated Warburg effect is required for PTEN- and p53-deficiency-driven prostate cancer growth. *Cell Reports*, 8(5), 1461-1474. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.053>
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 123(3191), 309-314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology*, 8(6), 519-530.

<https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>

- Wardell, T. M., Ferguson, E., Chinnery, P. F., Borthwick, G. M., Taylor, R. W., Jackson, G., Craft, A., Lightowlers, R. N., Howell, N., & Turnbull, D. M. (2003). Changes in the human mitochondrial genome after treatment of malignant disease. *Mutation research*, 525(1-2), 19-27. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(02\)00313-5](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00313-5)
- Webster, T. J. (2006). Nanomedicine : What's in a definition? *International Journal of Nanomedicine*, 1(2), 115-116. <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.2.115>
- Wei, Z., Liu, X., Cheng, C., Yu, W., & Yi, P. (2021). Metabolism of Amino Acids in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.603837>
- Weinfurt, K. P., Li, Y., Castel, L. D., Saad, F., Timbie, J. W., Glendenning, G. A., & Schulman, K. A. (2005). The significance of skeletal-related events for the health-related quality of life of patients with metastatic prostate cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 16(4), 579-584. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi122>
- Weng, Y.-R., Cui, Y., & Fang, J.-Y. (2012). Biological Functions of Cytokeratin 18 in Cancer. *Molecular Cancer Research*, 10(4), 485-493. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0222>
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(12), 872-884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Whang, Y. E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R. E., Tran, C., Vessella, R. L., Said, J. W., Isaacs, W. B., & Sawyers, C. L. (1998). Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5246-5250. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5246>
- Whitesell, L., & Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 5(10), 761-772. <https://doi.org/10.1038/nrc1716>
- Whittaker, R. G., Schaefer, A. M., McFarland, R., Taylor, R. W., Walker, M., & Turnbull, D.

- M. (2007). Prevalence and progression of diabetes in mitochondrial disease. *Diabetologia*, 50(10), 2085-2089. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0779-9>
- Wiedemann, N., & Pfanner, N. (2017). Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 685-714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014352>
- Wilson, & Bohr, V. A. (2007). The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair*, 6(4), 544-559. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.017>
- Wilson, & Gloyna, R. E. (1970). The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 26, 309-336. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571126-5.50012-1>
- Wilson, J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase : Structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 12), 2049-2057. <https://doi.org/10.1242/jeb.00241>
- Wilson, & Lasnitzki, I. (1971). Dihydrotestosterone formation in fetal tissues of the rabbit and rat. *Endocrinology*, 89(3), 659-668. <https://doi.org/10.1210/endo-89-3-659>
- Wimpissinger, F., Stifter, K., Grin, W., & Stackl, W. (2007). The Female Prostate Revisited : Perineal Ultrasound and Biochemical Studies of Female Ejaculate. *The Journal of Sexual Medicine*, 4(5), 1388-1393. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2007.00542.x>
- Wise, D. R., Ward, P. S., Shay, J. E. S., Cross, J. R., Gruber, J. J., Sachdeva, U. M., Platt, J. M., DeMatteo, R. G., Simon, M. C., & Thompson, C. B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19611-19616. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117773108>
- Wisnibaugh, E. S., Andrews, P. E., Ferrigni, R. G., Schild, S. E., Keole, S. R., Wong, W. W., & Vora, S. A. (2014). Proton Beam Therapy for Localized Prostate Cancer 101 : Basics, Controversies, and Facts. *Reviews in Urology*, 16(2), 67-75.

- Wittekind, C., Compton, C. C., Greene, F. L., & Sobin, L. H. (2002). TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*, *94*(9), 2511-2516. <https://doi.org/10.1002/cncr.10492>
- Wolf, A., Agnihotri, S., Micallef, J., Mukherjee, J., Sabha, N., Cairns, R., Hawkins, C., & Guha, A. (2011). Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(2), 313-326. <https://doi.org/10.1084/jem.20101470>
- Wolfe, T., Chatterjee, D., Lee, J., Grant, J. D., Bhattarai, S., Taylor, R., Goodrich, G., Nicolucci, P., & Krishnan, S. (2015). Targeted gold nanoparticles enhance sensitization of prostate tumors to megavoltage radiation therapy in vivo. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, *11*(5), 1277-1283. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.12.016>
- Wu, & Huang, J. (2007). Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *The Journal of biological chemistry*, *282*(6), 3571-3583. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608487200>
- Wu, Niu, H.-S., Chen, L.-J., Cheng, J.-T., & Tong, Y.-C. (2016). Increase of human prostate cancer cell (DU145) apoptosis by telmisartan through PPAR-delta pathway. *European Journal of Pharmacology*, *775*, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.017>
- Wu, Sarkissyan, M., & Vadgama, J. V. (2015). Epigenetics in breast and prostate cancer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1238*, 425-466. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_23
- Xie, H., Xie, B., Liu, C., Wang, J., & Xu, Y. (2017). Association of PTEN expression with biochemical recurrence in prostate cancer: Results based on previous reports. *Oncotargets and therapy*, *10*, 5089-5097. <https://doi.org/10.2147/OTT.S132653>
- Xin, M., & Deng, X. (2006). Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, *281*(27), 18859-18867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512543200>
- Xiong, K., Chen, Y., Ouyang, C., Guan, R.-L., Ji, L.-N., & Chao, H. (2016). Cyclometalated iridium(III) complexes as mitochondria-targeted anticancer agents. *Biochimie*, *125*, 186-194. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.03.013>

- Xu, Fang, F., St Clair, D. K., Jossen, S., Sompol, P., Spasojevic, I., & St Clair, W. H. (2007). Suppression of RelB-mediated manganese superoxide dismutase expression reveals a primary mechanism for radiosensitization effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) in prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 6(7), 2048-2056. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0700>
- Xu, J., Stolk, J. A., Zhang, X., Silva, S. J., Houghton, R. L., Matsumura, M., Vedvick, T. S., Leslie, K. B., Badaro, R., & Reed, S. G. (2000). Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer research*, 60(6), 1677-1682.
- Yamamori, T., Sasagawa, T., Ichii, O., Hiyoshi, M., Bo, T., Yasui, H., Kon, Y., & Inanami, O. (2017). Analysis of the mechanism of radiation-induced upregulation of mitochondrial abundance in mouse fibroblasts. *Journal of radiation research*, 58(3), 292-301. <https://doi.org/10.1093/jrr/rw113>
- Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., & Inanami, O. (2012a). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free radical biology & medicine*, 53(2), 260-270. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033>
- Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., & Inanami, O. (2012b). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(2), 260-270. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033>
- Yang, & Duerksen-Hughes, P. J. (2001). Activation of a p53-independent, Sphingolipid-mediated Cytolytic Pathway in p53-negative Mouse Fibroblast Cells Treated with N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27129-27135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100729200>

- Yang, Kenfield, S. A., van Blarigan, E. L., Batista, J. L., Sesso, H. D., Ma, J., Stampfer, M. J., & Chavarro, J. E. (2015). Dietary patterns after prostate cancer diagnosis in relation to disease-specific and total mortality. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 8(6), 545-551. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0442>
- Yang, Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J. M., Dell'antonio, G., Mautner, J., Tonon, G., Haigis, M., Shirihai, O. S., Doglioni, C., Bardeesy, N., & Kimmelman, A. C. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & Development*, 25(7), 717-729. <https://doi.org/10.1101/gad.2016111>
- Yap, T. A., Sandhu, S. K., Carden, C. P., & de Bono, J. S. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors : Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(1), 31-49. <https://doi.org/10.3322/caac.20095>
- Yauch, Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J. C., Rubin, L. L., & de Sauvage, F. J. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, 455(7211). <https://doi.org/10.1038/nature07275>
- Yoo, & Cho, H. J. (2012). Benign prostatic hyperplasia : From bench to clinic. *Korean journal of urology*, 53(3), 139-148. <https://doi.org/10.4111/kju.2012.53.3.139>
- Yoo, Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., & Dunphy, W. G. (2009). The Mre11-Rad50-Nbs1 complex mediates activation of TopBP1 by ATM. *Molecular biology of the cell*, 20(9), 2351-2360. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1190>
- Yoshida, T., Goto, S., Kawakatsu, M., Urata, Y., & Li, T.-S. (2012). Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation. *Free radical research*, 46(2), 147-153. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.645207>
- Yoshimoto, M., Joshua, A. M., Cunha, I. W., Coudry, R. A., Fonseca, F. P., Ludkovski, O., Zielenska, M., Soares, F. A., & Squire, J. A. (2008). Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21(12), 1451-1460. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.96>

- Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), 1062-1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Yu, Lu, M., Jia, D., Ma, J., Ben-Jacob, E., Levine, H., Kaiparettu, B. A., & Onuchic, J. N. (2017). Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism : Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Cancer research*, 77(7), 1564-1574. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2074>
- Yu, & Yan, T. (2010). Effect of mtDNA mutation on tumor malignant degree in patients with prostate cancer. *The Aging Male*, 13(3), 159-165. <https://doi.org/10.3109/13685530903536668>
- Yue, S., Li, J., Lee, S.-Y., Lee, H. J., Shao, T., Song, B., Cheng, L., Masterson, T. A., Liu, X., Ratliff, T. L., & Cheng, J.-X. (2014). Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell metabolism*, 19(3), 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.019>
- Yusoff, A. A. (2015). Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumors : A mini-review. *Journal of cancer research and therapeutics*, 11(3), 535-544. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.161925>
- Zadra, G., Photopoulos, C., & Loda, M. (2013). The fat side of prostate cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(10), 1518-1532. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.03.010>
- Zaidi, N., Lupien, L., Kuemmerle, N. B., Kinlaw, W. B., Swinnen, J. V., & Smans, K. (2013). Lipogenesis and lipolysis : The pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Progress in lipid research*, 52(4), 585-589. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.08.005>
- Zaviacic and Ablin. (2000). The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term « prostate » in the human female. *Histology and Histopathology*, 15, 131-142. <https://doi.org/10.14670/HH-15.131>
- Zeng, Cao, Y., He, L., Ding, S., Bian, X., & Tian, G. (2021). Metal–ligand coordination nanomaterials for radiotherapy : Emerging synergistic cancer therapy. *Journal of*

- Zeng, Y., Opeskin, K., Horvath, L. G., Sutherland, R. L., & Williams, E. D. (2005). Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *The Prostate*, 65(3), 222-230. <https://doi.org/10.1002/pros.20288>
- Zeviani, M., Bresolin, N., Gellera, C., Bordoni, A., Pannacci, M., Amati, P., Moggio, M., Servidei, S., Scarlato, G., & DiDonato, S. (1990). Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome : A new autosomal dominant disease. *American Journal of Human Genetics*, 47(6), 904-914.
- Zhang, Lahn, M., & Huber, P. E. (2012). Translating the combination of TGF β blockade and radiotherapy into clinical development in glioblastoma. *Oncoimmunology*, 1(6), 943-945. <https://doi.org/10.4161/onci.19789>
- Zhang, Maddelein, M.-L., Wai-Yin Sun, R., Gornitzka, H., Cuvillier, O., & Hemmert, C. (2018). Pharmacomodulation on Gold-NHC complexes for anticancer applications—Is lipophilicity the key point? *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157, 320-332. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.070>
- Zhang, X., Li, X., Zhang, N., Yang, Q., & Moran, M. S. (2011). Low doses ionizing radiation enhances the invasiveness of breast cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical and biophysical research communications*, 412(1), 188-192. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.074>
- Zhang, X., Selvaraju, K., Saei, A. A., D'Arcy, P., Zubarev, R. A., Arnér, E. S.J., & Linder, S. (2019). Repurposing of auranofin : Thioredoxin reductase remains a primary target of the drug. *Biochimie*, 162, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.03.015>
- Zhao, S. G., Chang, S. L., Spratt, D. E., Erho, N., Yu, M., Ashab, H. A.-D., Alshalalfa, M., Speers, C., Tomlins, S. A., Davicioni, E., Dicker, A. P., Carroll, P. R., Cooperberg, M. R., Freedland, S. J., Karnes, R. J., Ross, A. E., Schaeffer, E. M., Den, R. B., Nguyen, P. L., & Feng, F. Y. (2016). Development and validation of a 24-gene predictor of response to postoperative radiotherapy in prostate cancer : A matched, retrospective analysis. *The Lancet. Oncology*, 17(11), 1612-1620. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30491-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30491-0)

- Zielie, P. J., Mobley, J. A., Ebb, R. G., Jiang, Z., Blute, R. D., & Ho, S. M. (2004). A novel diagnostic test for prostate cancer emerges from the determination of alpha-methylacyl-coenzyme a racemase in prostatic secretions. *The Journal of urology*, *172*(3), 1130-1133. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000133560.87118.4d>
- Zong, W.-X., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2016). Mitochondria and Cancer. *Molecular Cell*, *61*(5), 667-676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011>
- Zou, T., Lok, C.-N., Wan, P.-K., Zhang, Z.-F., Fung, S.-K., & Che, C.-M. (2018). Anticancer metal-N-heterocyclic carbene complexes of gold, platinum and palladium. *Current Opinion in Chemical Biology*, *43*, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.014>