



HAL
open science

Rôle du gène de fusion **TMPRSS2.ERG** dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate

Carine Delliaux

► **To cite this version:**

Carine Delliaux. Rôle du gène de fusion **TMPRSS2.ERG** dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S009 . tel-01968027

HAL Id: tel-01968027

<https://theses.hal.science/tel-01968027>

Submitted on 2 Jan 2019

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

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

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE-NORD DE FRANCE

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Discipline : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

ROLE DU GENE DE FUSION *TMPRSS2:ERG*
DANS LA FORMATION DES METASTASES
OSSEUSES DU CANCER DE LA PROSTATE

Présentée et soutenue publiquement par

Carine DELLIAUX

A Lille, le 14 Juin 2017

Composition du jury :

Dr Virginie VLAEMINCK-GUILLEM

Rapporteur

Dr Dominique HEYMANN

Rapporteur

Dr Olivier CUVILLIER

Examineur

Dr Yvan DE LAUNOIT

Examineur

Pr Bruno QUESNEL

Examineur

Dr Martine DUTERQUE-COQUILLAUD

Directeur de thèse

CNRS UMR8161 Mécanismes de la Tumorigenèse et Thérapies Ciblées

À mon Papy Gérard

« The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka' but 'That's funny'... »

Isaac Asimov

« How often have I said to you that when you have eliminated the impossible,
whatever remains, however improbable, must be the truth ? »

Sherlock Holmes

Remerciements

Un moment émouvant pour tout doctorant est le jour où il entreprend d'écrire ses remerciements. Cela signifie que « la fin est proche »... ce qui en soi est une bonne nouvelle. Presque quatre années, quarante cinq mois, mille trois cent cinquante trois jours (2016 étant bissextile), au moins une dizaine de milliers d'heures à préparer cette thèse de Doctorat... Après avoir terminé la rédaction du manuscrit, je me réjouis d'écrire ces remerciements, pour toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation et à la réussite de ce travail. **MERCI à tous !**

Merci à l'**Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille-Nord de France**, de m'avoir permis d'effectuer cette thèse, à l'**Université de Lille 2**, mon employeur, ainsi qu'à l'**Institut Pasteur de Lille**, au **Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais**, et à la **Fondation pour la Recherche Médicale**, mes co-financeurs.

Merci aux membres du jury d'avoir spontanément accepté d'évaluer mon travail, au professeur **Bruno Quesnel** d'avoir accepté de présider ce jury, aux docteurs **Virginie Vlaeminck-Guillem** et **Dominique Heymann** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, et aux docteurs **Olivier Cuvillier** et **Yvan de Launoit** d'avoir accepté d'être examinateurs.

Merci également aux docteurs **Edith Bonnelye** et **Florence Pinet** d'avoir accepté de participer à mes deux Comités de Suivi de Thèse. Votre expertise et vos conseils ont permis de poursuivre au mieux les différents aspects de ce travail.

Merci au docteur **Yvan de Launoit**, directeur du laboratoire, de m'avoir accueillie au sein de l'UMR8161. Votre enthousiasme et vos conseils lors de nos réunions d'équipe, ainsi que votre soutien dans la poursuite de ma carrière scientifique sont importants.

Merci à ma directrice de thèse, le docteur **Martine Duterque-Coquillaud**. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir encadrée durant cette thèse. Merci pour ces heures de discussions, scientifiques pour beaucoup, mais pas que... Merci pour votre positive-attitude : « le parking n'est jamais complet, même si c'est ce qui est indiqué à l'entrée ». Merci pour votre compréhension, votre disponibilité et votre soutien. J'ai énormément appris à vos côtés,

sur la science mais également sur moi-même, et je pense pouvoir dire que nous avons partagé beaucoup plus qu'un simple (petit) bureau. Je garderai un excellent souvenir de ces cinq années à vos côtés au labo, mais aussi en congrès à travers la France et le Monde, à Deauville, à Paris, à Limoges, à Rotterdam, et à la Nouvelle-Orléans... « En outre », Merci-pour-tout !

Merci évidemment à l'ensemble de mon équipe, l'**équipe ETS**.

En particulier, merci à nos deux supers-techniciennes, pour votre enthousiasme à toute épreuve. **Nathalie Vanpouille**, « Super-Maman », ta force de caractère m'impressionne et est pour moi un exemple à suivre. Nos manips en duo me manqueront, et je n'oublierai pas que « Les cellules parfaites sont des connasses ». Merci pour ton expertise scientifique et ton implication dans ce travail de thèse. J'ai trouvé en ta personne une oreille attentive à mes petits maux, merci pour ça aussi, et pour tous tes conseils. J'ai vraiment eu énormément de plaisir à travailler avec toi, et je te souhaite le meilleur pour la suite. **Anne-Claire Flourens**, « Super-Mamie » désormais, merci pour ces heures d'immunohistochimie et de clonage en tout genre. Je me suis beaucoup amusée à te surprendre parfois lors de mes arrivées plus matinales au labo. N'oublie pas les Ctrl+C, Ctrl+V pour les tableaux Excel que tu affectionnes tant. Je te souhaite encore beaucoup de superbes croisières, et aussi plus de chance en CHIP, ta persévérance finira par payer... Et surtout, merci les filles pour toutes ces pauses Thé-Chocolat, toujours très réconfortantes.

Merci au professeur **Anne Chotteau**, à **Isabelle Damour** et à **Mandy Dumortier** qui ont rejoint notre équipe plus récemment. Votre œil neuf sur mes projets et vos conseils ont été très utiles lors de nos réunions d'équipe. Mandy, bon courage pour ta fin de thèse. J'espère qu'une de tes manips te fera quand même passer d'un état « neutre » à « excité ». Peut-être un magnifique Western blot ETV1 ! Aussi, si tu continues à « me suivre » avec un décalage d'un an il me semble, il t'arrivera bientôt quelque chose de formidable. Je te le souhaite.

Enfin, merci aux autres membres passés et présents de l'équipe, **Sébastien Flajollet** et **Rachel Deplus** en Postdoc, **Tian Tian** et **Anthony Turpin** en Thèse, **Alice Pham-Becker** en Master 2 Recherche, **Nuria Balibrea** en Bachelor... Merci à tous pour votre sympathie et ces moments partagés. Je vous souhaite le meilleur dans la suite de vos carrières, en espérant que vous parviendrez à faire ce que vous aimez.

Merci à nos collaborateurs, **Antonino Bongiovanni**, **Elizabeth Werkmeister** et **Meryem Tardivel** pour la microscopie, **Hélène Bauderlique** pour le FACS, **Ludovic Huot** pour les purifs ADN/ARN, le docteur **David Hot** pour les microarrays et Ingenuity, les

professeurs **Xavier Leroy** et **Arnaud Villers** pour les échantillons tumoraux prostatiques humains, et les docteurs **Edith Bonnelye** et **Philippe Clézardin** pour les modèles murins de métastases osseuses.

Merci à **tous les membres de l'UMR8161**, passés et présents. **Sarah**, je ne suis plus du tout à jour sur « Orange is the New Black » depuis que tu n'es plus là, et j'ai perdu beaucoup de mon algérien, reviens ! « Twahachték Habibti ». **Rami**, merci pour tes encouragements et tes supers plats libanais ! **Laurissa**, je n'oublie pas ta devise, « un mec gay, c'est un mec qui ne t'a pas rencontrée » **Racha**, j'espère que tu as finalement trouvé ta voie. **Hana** et **Leslie**, les deux inséparables, votre complicité et votre bonne humeur en culture cell font toujours tellement plaisir à voir. **Nicole**, notre secrétaire, tu commandes plus vite que ton ombre. **Catherine**, **Chantal**, **Gaëlle**, **Ingrid**, **Nathalie M** et **Nathalie S**, merci pour votre aide et vos conseils techniques.

Merci au docteur **Marie-Claire Peers** et à toute l'équipe de moniteurs de TP d'Histologie de la Faculté de Médecine de Lille. Marie-Claire, j'ai découvert avec vous l'enseignement et vous avez su me transmettre votre passion. Merci pour votre encadrement durant ces trois ans, merci pour votre disponibilité et votre énorme gentillesse... Et merci pour ces moments partagés tous ensemble autour d'une bonne crêpe et d'un bolet de cidre au Triskell. Je vous souhaite une excellente retraite bien méritée, et une bonne continuation à chacun des membres de l'équipe, passés et présents.

Merci à mes amis qui, pour le meilleur et pour le pire, ont toujours été présents. J'aurais tellement de choses à dire, mais je vais me contenter de quelques petites anecdotes.

Fanny... Il suffisait d'un coup de fil pour que tu débarques avec tes pots de glace (vanille/noix de macadamia, quelle mémoire !) ou ta bouteille de bière, selon la gravité de la situation... Depuis ce premier jour de cours en L3 (dans l'amphi du bâtiment C15, quelle mémoire bis !), on ne s'est plus quittées... Enfin presque, tu as toujours eu la bougeotte entre l'Australie, la Nouvelle-Zélande, la Réunion, et maintenant le Canada ! Mais patience, je te rejoins très bientôt « petite fleur des champs ». Merci de m'avoir attendu (souvent) pendant nos footings, merci de m'avoir aidé (souvent) à monter à dos de « dadous », merci d'avoir ri (souvent) lors de mes appels désespérés pour une araignée... Merci d'être comme tu es... Ah oui, avant d'oublier, merci à **Pierre** de supporter tout ça !

Amandine... Docteur Cian, je n'ai plus personne avec qui râler... boire un thé désormais à l'IBL ! Aaaaaaah la thèse, ses manips qui foirent, ses parasites qui crèvent, ses cellules contaminées... J'espère que tes choix te permettront de trouver ton bonheur. Merci à toi et **Johann** d'avoir été là, pour tous ces moments partagés, ces soirées jeux au Dernier Bar (trop rare), ces parties de rire, ces journées à Walibi... A quand notre descente de la Lesse ?!

Caroline... « Carolaine », j'ai tellement de souvenirs avec toi, et ça commence comme ça : été 2009, Wimereux beach, le soleil, les cocotiers (OK je vais trop loin)... et le JFK ! Bon sang on en aura passé des heures de service à courir comme des dingues, avec pour seul réconfort notre Ti'planteur du Squal. Mais de toute façon, « Quand l'océan t'jettes à terre, tu sais c'qu'il faut faire ? Une promenade en mer, une promenade en mer, une promenade en mer, en mer... Qu'est c'qu'il faut faire... nager, nager... ».

Lucie... La salsa et notre rencontre ont été pour moi une bouffée d'oxygène à un moment particulier de ma vie. Il t'aura fallu faire quelques efforts avant de réussir à me sortir des cours pour pratiquer en soirée, sauf qu'après c'est toi qui a disparu ! Tu es une personne rayonnante, toujours de bonne humeur, et, de manière assez paradoxale, même quand tu râles ! Te voir me redonne toujours le sourire et l'énergie pour avancer ! Merci pour tes petits plats équilibrés de fin de thèse, et aussi merci pour tes conseils avisés sur le « self-control ».

Olivier... Je dois également te remercier pour tes supers talents de cuisinier, sauf que maintenant on dirait que je ne pense qu'à manger ! En même temps, tes pâtisseries sont juste incroyables... Merci pour tous ces pas de danse, merci pour toutes ces histoires et photos de Cap Vert (intéressant !), de Tibet (trop jalouse !), de Mongolie (je te déteste !), merci pour toutes les cartes postales (OK, tu en auras une un jour, promis !), merci pour ton soutien et ton réconfort. Tu es pour moi un ami très cher, et tu connais ta prochaine destination de voyage...

Priscilla, ma plus vieille amie... Aie, je viens de compter...16 ans ! On a pris des chemins différents depuis longtemps maintenant, mais l'amitié reste. Beaucoup de bonheur à toi et ta petite famille. **Cécile**, Bordeaux et ton accent du Sud me manque. J'espère pouvoir être là pour « votre Grand Jour ». Courage pour ta thèse ! **Binôme**, OK, **Matthieu** ! J'ai deux excellents souvenirs avec toi sans savoir en trouver un plus important que l'autre : notre « Sans Valentin(e) » et notre marathon Star Wars, qu'on n'a jamais fini d'ailleurs... **Julien** et **Rouxmain**, nos soirées au Mac se sont faites trop rares. Merci pour les pauses « Axioscan » au CHR. **Martos** et **Trifi**, je garde d'excellents souvenirs de nos années à la Fac, pas toujours très assidus, mais je suis fière de ce que l'on est devenu tous les quatre, avec **Gyss**. Une pensée également pour **Ghassan**, prend soin de toi là-bas... Tu me manques.

Merci à **Mathieu**, ma plus belle rencontre au cours de cette thèse. Je dois sans doute remercier l'AACR pour ça, ou peut-être plutôt American Airlines d'avoir des problèmes de fuite dans ses avions ! Malgré la distance, tu as été présent à mes côtés dans toutes les étapes de cette dernière année de thèse, de la soumission d'article à l'écriture du manuscrit, en passant par mes entretiens de Postdoc. Merci pour ces heures de discussion métabolisme, de bioinformatiques, d'Illustrator... Merci d'avoir toujours su tirer le meilleur de moi-même ! Je n'y serais jamais parvenu sans toi. Maintenant, la « vraie » vie va commencer, et le meilleur reste à venir. Je t'aime, et tu sais, « Il n'y a pas de hasard dans les rencontres... Elles ont lieu quand nous atteignons une limite, que nous avons besoin de mourir pour renaître. Les rencontres nous attendent mais parfois nous les empêchons d'avoir lieu... Si nous sommes désespérés et si nous n'avons rien à perdre, ou au contraire enthousiasmés par la vie, l'inconnu se manifeste et notre univers change. Les rencontres les plus importantes ont été préparées par les âmes bien avant que les corps ne se voient... » Paulo Coelho.

Enfin, plus que quiconque, merci à ma famille, qui m'a toujours soutenu et encouragé dans mes choix, tant professionnels que personnels. **Maman, Papa**, votre amour inconditionnel et votre présence à mes côtés depuis toutes ces années m'ont été indispensables, tant dans les bons moments que dans les moments plus difficiles (Bon là Papa, on sait que c'est « Eus'mère »). **Alexandre, Nina**, vous formez un super couple, et depuis peu une superbe famille, pleine de motivation et d'énergie que vous avez su me transmettre, chacun à votre manière (« Fais un bisou à ta sœur ! »). Toi aussi **Lilou**, du haut de ton année et demi, merci de faire de moi une Marraine comblée. Ne grandis pas trop vite... Et bientôt ton premier vol en solitaire ! **Maxime**, « petit » frère, je suis fière de la personne que tu deviens. Je suis certaine que tu fais un excellent professeur d'Histoire-Géographie et je te souhaite le meilleur pour ta thèse à venir. Au passage, je me dis souvent que, peut-être, si j'assistais à quelques uns de tes cours, tu pourrais guérir mon aversion pour cette matière, solidement acquise en plusieurs années de Lycée en série Scientifique... Et puis je me réveille... Et je me dis qu'en fait non... Impossible. Ou alors seulement pour l'histoire des vikings qui te passionnent tant. Vous six, j'aimerais pouvoir vous remercier à hauteur de ce que vous avez fait pour moi, mais quelques lignes ne suffiraient pas. Je vous aime, tout simplement. Vous allez tellement me manquer de l'autre côté de l'Atlantique, en particulier nos repas de famille si... Animés ? Mouvementés ? Vivants ! En fait il n'existe pas d'adjectif pour les qualifier, et j'ai pourtant beaucoup cherché ! Je sais qu'on sera toujours présent les uns pour les autres, et puis, vous viendrez faire un tour dans « Le Grand Nord Canadien » !

SOMMAIRE

RESUME	5
ABSTRACT	6
ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	15
I. INTRODUCTION	19
1. AVANT-PROPOS	21
2. CANCER DE LA PROSTATE	23
2.1 PROSTATE	23
2.1.1 STRUCTURE ANATOMIQUE ET HISTOLOGIQUE DE LA PROSTATE	23
2.1.2 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA PROSTATE	26
2.1.3 MALADIES AFFECTANT LA PROSTATE	27
2.2 NOTIONS CLINIQUES DU CANCER DE LA PROSTATE	27
2.2.1 EPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE DU CANCER DE LA PROSTATE	27
2.2.2 SYMPTOMES, DEPISTAGE, DIAGNOSTIC ET CLASSIFICATION DES CANCERS DE LA PROSTATE	29
2.2.3 PRINCIPES ET CHOIX DE TRAITEMENTS	33
2.3 CANCER DE LA PROSTATE RESISTANT A LA CASTRATION	36
2.3.1 REGULATION HORMONALE DE LA PROSTATE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE	36
2.3.2 ROLE DU RECEPTEUR AUX ANDROGENES DANS LE CANCER DE LA PROSTATE	38
2.3.2.1 Amplification de AR et « Hypersensitivity pathway »	39
2.3.2.2 Mutations de AR et « Promiscuous pathway »	39
2.3.2.3 Activation aberrante de AR et « Outlaw pathway »	40
2.3.2.4 Activation constitutive de AR	40
2.3.2.5 Co-activateurs et co-répresseurs de AR	40
2.3.2.6 Stéroïdogénèse alternative	41
2.3.2.7 Cas particulier du cancer de la prostate neuroendocrine	41
2.4 ALTERATIONS GENOMIQUES DU CANCER DE LA PROSTATE	42
3. METASTASES OSSEUSES ASSOCIEES AU CANCER DE LA PROSTATE	45
3.1 METASTASES OSSEUSES : UN PROCESSUS MULTI-ETAPES	46
3.1.1 COLONISATION DE L'OS PAR LES CELLULES TUMORALES CIRCULANTES	48

3.1.2 DORMANCE ET SURVIE DES CELLULES TUMORALES DISSEMINÉES DANS L'OS.....	52
3.1.3 CROISSANCE DES CELLULES TUMORALES DISSEMINÉES ET FORMATION DE LÉSIONS OSSEUSES	55
3.1.3.1 Influence des cellules tumorales disséminées sur le microenvironnement osseux.....	56
3.1.3.2 Notion de cercle vicieux dans les métastases osseuses du cancer de la prostate	57
3.2 TRAITEMENTS DES METASTASES OSSEUSES	59
3.3 MODELES D'ETUDE <i>IN VIVO</i> DES METASTASES OSSEUSES	61
3.3.1 INJECTIONS ORTHOTOPIQUES.....	62
3.3.2 INJECTIONS INTRAVASCULAIRES.....	63
3.3.3 INJECTIONS INTRA-OSSEUSES.....	65
3.3.4 INJECTIONS SOUS-CUTANÉES ET TRANSPLANTATIONS SOUS-CUTANÉES DE FRAGMENTS D'OS HUMAINS .	65
4. GENE DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i>	67
4.1 FAMILLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ETS.....	67
4.2 FACTEUR DE TRANSCRIPTION <i>ERG</i>	69
4.2.1 STRUCTURE GENOMIQUE ET ISOFORMES	69
4.2.2 DOMAINES FONCTIONNELS.....	71
4.2.3 PARTENAIRES DE LIAISON ET PARTENAIRES FONCTIONNELS	72
4.2.4 FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES	73
4.2.4.1 Expression et localisation	75
4.2.4.2 Rôle dans la mise en place du système vasculaire	76
4.2.4.3 Rôle dans l'hématopoïèse	78
4.2.4.4 Rôle dans la mise en place du cartilage.....	78
4.2.5 FONCTIONS PATHOLOGIQUES.....	80
4.2.5.1 Implications dans les leucémies.....	80
4.2.5.2 Implications dans le sarcome d'Ewing.....	82
4.3 GENE DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i> DANS LE CANCER DE LA PROSTATE.....	83
4.3.1 DECOUVERTE DES GENES DE FUSION	84
4.3.2 MECANISMES DE REMANIEMENTS CHROMOSOMIQUES	87
4.3.3 ORIGINE DE LA FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i>	87
4.3.4 MULTIPLES ISOFORMES DE TRANSCRITS DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i>	88
4.3.4 PREVALENCE DU GENE DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i>	90
4.3.4 ROLE DU GENE DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i>	92
4.3.4.1 Etudes fonctionnelles <i>in vivo</i>	92
4.3.4.2 Coopération avec d'autres altérations génomiques	94
4.3.4.3 Recherche de gènes cibles et de signatures génétiques associées <i>in vitro</i>	95
4.3.5 MARQUEUR DIAGNOSTIQUE ET/OU PRONOSTIQUE.....	97

4.3.6 NOUVELLES THERAPIES POTENTIELLES CIBLANT ERG OU SES COFACTEURS	100
5. PROJET DE THESE	103
<hr/>	
II. RESULTATS	107
<hr/>	
6. CARACTERISATION DES METASTASES OSSEUSES INDUITES PAR LES CELLULES PC3-TMPRSS2:ERG ET PC3C-TMPRSS2:ERG LORS DE L'IMPLANTATION INTRA-TIBIALE CHEZ LA SOURIS.	109
<hr/>	
7. ETUDE DE GENES MODULES PAR LA FUSION TMPRSS2:ERG DANS LES CLONES PC3C	111
<hr/>	
7.1 ETUDE DE FSCN1 (FASCIN 1)	113
7.1.1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	113
7.1.1.1 Structure et expression.....	113
7.1.1.2 Implications physiologiques.....	114
7.1.1.3 Implications pathologiques dans les cancers.....	115
7.1.1.4 Implications pathologiques dans le cancer de la prostate et ses métastases osseuses ...	117
7.1.2 RESULTATS	118
7.1.2.1 Expression et régulation transcriptionnelle de <i>FSCN1</i> dans des lignées cellulaires tumorales prostatiques.....	118
7.1.2.2 Rôle de FSCN1 dans la migration et l'invasion cellulaire <i>in vitro</i>	126
7.1.2.3 Expression de FSCN1 dans le cancer de la prostate et ses métastases chez l'homme	129
7.1.3 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	135
7.1.3.1 Expression et régulation transcriptionnelle de <i>FSCN1</i> dans des lignées de cellules tumorales prostatiques.....	135
7.1.3.2 Rôle de FSCN1 dans la migration et l'invasion cellulaire <i>in vitro</i>	136
7.1.2.3 Expression de FSCN1 dans le cancer de la prostate et ses métastases chez l'homme	136
7.1.2.4 Effet de AR sur l'expression de FSCN1 et le développement de tumeur <i>in vivo</i>	137
7.1.2.5 Rôle de FSCN1 dans le tropisme des cellules tumorales vers l'os, et le développement de métastases ostéocondensantes <i>in vivo</i>	137
7.2 ETUDE DU RECEPTEUR HCAR1 (HYDROXYCARBOXYLIC ACID RECEPTOR 1)	139
7.2.1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	139
7.2.1.1 Structure, ligand, expression et régulation	139
7.2.1.2 Implications physiologiques.....	140
7.2.1.3 Implications pathologiques.....	142
7.2.2 RESULTATS	143
7.2.2.1 Expression de HCAR1 dans le cancer de la prostate et ses métastases chez l'homme	144

7.2.2.2 Expression et régulation transcriptionnelle de <i>HCAR1</i> dans des lignées de cellules tumorales prostatiques.....	149
7.2.2.3 Rôle de <i>HCAR1</i> dans la migration cellulaire <i>in vitro</i>	153
7.2.3 DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	154
7.2.3.1 Expression de <i>HCAR1</i> dans le cancer de la prostate et ses métastases chez l'homme	154
7.2.3.2 Développement d'outils pour les études fonctionnelles de <i>HCAR1</i>	155
7.2.3.3 Rôle de <i>HCAR1</i> dans le métabolisme des cellules tumorales <i>in vitro</i>	157
7.2.3.4 Rôle de <i>HCAR1</i> dans le tropisme des cellules tumorales vers l'os, et le développement de métastases ostéocondensantes <i>in vivo</i>	161
III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES	163
8. DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES	165
8.1 CHOIX DES MODELES CELLULAIRES ET ANIMAUX	165
8.2 ROLE DU GENE DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i> DANS LA FORMATION DES METASTASES OSSEUSES DU CANCER DE LA PROSTATE	167
8.3 ROLE DU RECEPTEUR AUX ANDROGENES, UN « GARDE-FOU » ?.....	169
8.4 SOUS-GROUPES DE PATIENTS ET THERAPIES CIBLEES	170
IV. ANNEXES	173
9. FIGURE SUPPLEMENTAIRE POUR FSCN1 ET <i>HCAR1</i>	175
10. PUBLICATIONS AU COURS DE LA THESE	177
10.1 PUBLICATION N°1.....	179
10.2 PUBLICATION N°2.....	223
10.3 PUBLICATION N°3.....	245
V. BIBLIOGRAPHIE	271

RESUME

Les tumeurs locales de la prostate sont associées à une évolution lente et une bonne survie, alors que les stades plus avancés révèlent dans 80% des cas des métastases osseuses incurables. La découverte de gènes de fusion issus de remaniements chromosomiques, tels que *TMPRSS2:ERG* dans plus de 50% des cas, a ouvert une nouvelle voie dans la compréhension du processus de cancérisation de la prostate. La présence de ce gène de fusion peut être associée à un mauvais pronostic dans de nombreuses études cliniques. Cependant, son rôle précis au cours de la cancérisation et de la progression du cancer de la prostate reste à déterminer. Le gène *Erg* (*Ets-related gene*) code un facteur de transcription dont l'expression est notamment associée à la mise en place du cartilage, et plus largement du squelette. Ceci suggère un rôle potentiel du gène de fusion impliquant ce facteur, et de ses gènes cibles, dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate.

Pour notre étude, nous avons utilisé des lignées de cellules tumorales prostatiques PC3 et PC3c, exprimant stablement le gène de fusion *TMPRSS2:ERG* et précédemment établies au laboratoire. Dans un premier temps, en utilisant un modèle d'injections intra-tibiales chez les souris SCID, nous avons démontré que l'expression ectopique de la fusion améliore la capacité d'induction de lésions ostéocondensantes en inhibant l'ostéolyse dans le modèle PC3 ostéolytique, et en stimulant l'ostéoformation dans le modèle PC3c mixte (ostéolytique et ostéocondensant). Cette expression ectopique de la fusion augmente également l'ostéomimétisme dans les deux modèles cellulaires, c'est-à-dire l'acquisition d'un phénotype semblable aux cellules osseuses leur conférant des avantages de survie et de propagation dans la moelle osseuse. En outre, trois nouveaux gènes cibles de *TMPRSS2:ERG* ont été mis en évidence : *ET-1* (*Endothelin-1*), stimulant la différenciation ostéoblastique et inhibant la résorption osseuse ostéoclastique, *ALPL* (*Alkaline Phosphatase Liver/Bone/Kidney*), marqueur de différenciation des ostéoblastes, et *COL1A1* (*Collagen Type 1 Alpha 1*), composant de la matrice osseuse, témoignant d'un rôle du gène de fusion dans la formation de métastases ostéocondensantes du cancer de la prostate.

Par ailleurs, deux autres gènes ont été étudiés, codant soit une protéine impliquée dans la stabilisation de structures particulières appelées invadopodes, soit une protéine impliquée dans le métabolisme des lipides.

L'ensemble de ces résultats contribue à mieux comprendre les mécanismes de cancérisation et d'évolution métastatique du cancer de la prostate, en particulier l'influence de l'expression du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans les métastases osseuses de ce cancer.

ABSTRACT

Local prostate cancers are associated with slow progression and good survival, while advanced stages reveal incurable bone metastases in 80% of cases. The discovery of fusion genes resulting from chromosomal rearrangements, such as *TMPRSS2:ERG* in more than 50% of cases, opened a new way in understanding the process of prostate cancer. The presence of this fusion gene may be associated with poor prognosis in many clinical studies. However, its precise role during cancerization and progression of prostate cancer remains to be determined. The *Erg* gene (*Ets-related gene*) encodes a transcription factor whose expression is associated in particular with embryonic skeleton development. This suggests a potential role of the fusion gene involving this factor, and its target genes, in the formation of prostate cancer bone metastases.

In this study, we used prostate cancer cell lines PC3 and PC3c, stably expressing the *TMPRSS2:ERG* fusion gene and previously established in the laboratory. First, using a model of intratibial injections in SCID mice, we demonstrated that ectopic expression of the fusion enhances the ability to induce osteoblastic lesions by inhibiting osteolysis in the osteolytic PC3 model, and by stimulating osteoformation in the mixed PC3c model (osteolytic and osteoblastic). This ectopic expression of the fusion also increases osteomimicry in both cell models, meaning the acquisition of a bone-cell-like phenotype which gives them advantages of survival and spread in the bone marrow. In addition, three new *TMPRSS2:ERG* target genes have been described: *ET-1* (*Endothelin-1*), stimulating osteoblastic differentiation and inhibiting osteoclastic bone resorption, *ALPL* (*Alkaline Phosphatase Liver/Bone/Kidney*), a marker of the osteoblasts differentiation, and *COL1A1* (*Collagen Type 1 Alpha 1*), a component of the bone matrix, providing novel insights into the role of the fusion gene in the formation of osteoblastic metastases of prostate cancer.

In addition, two other genes have been studied, encoding either a protein involved in the stabilization of particular structures called invadopodia, or a protein involved in lipid metabolism.

All these results contribute to decipher the mechanisms of cancerization and metastatic progression of prostate cancer, in particular the influence of the expression of *TMPRSS2:ERG* fusion gene in prostate cancer bone metastases.

ABBREVIATIONS

2-DG	2-Deoxy-D-Glucose
3,5-DHBA	3,5-Dihydroxybenzoic Acid
3'RACE	3' Rapid Amplification of cDNA Ends
3' et 5'UTR	3' et 5' Untranslated Region
AcH3	Acetylated histone H3
ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
ADAMTS1	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif 1
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AKT	Protein Kinase B
ALPL	Alkaline Phosphatase Liver/Bone/Kidney
AMACR	Alpha-Methylacyl-CoA Racemase
AMPc	Adenosine Monophosphate cyclique
ANOVA	Analysis Of Variance
ANXA2	Annexin A2
ANXA2R	Annexin A2 Receptor
AP1	Activated Protein 1
AR	Androgen Receptor
AR-V	Androgen Receptor-Variant
ARE	Androgen Response Element
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adenosine Triphosphate
BIC	Bicalutamide
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA2	Breast Cancer 2
BSP	Bone Sialoprotein
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CaSR	Calcium-Sensing Receptor
CBP	CREB-Binding Protein
CDH11	Cadherin 11

CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
ChIP-seq	Chromatin Immunoprecipitation Sequencing
CID	C-terminal Inhibitory Domain
CLDN5	Claudin 5
COL1	Collagen Type 1
COL1A1	Collagen Type 1 Alpha 1
Col2a1	Collagen Type 2 alpha 1
COPA	Cancer Outlier Profile Analysis
COX2	Cyclooxygenase 2
CPT	Carnitine O-Palmitoyltransférase
CRAF	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
CRH	Corticotropine-Releasing Hormone
CRISP3	Cysteine Rich Secretory Protein 3
CRPC	Castrate-Resistant Prostate Cancer
CTAD	C-terminal Transcriptional Activation Domain
CTC	Circulating Tumor Cell
CXCR4 and 6	Chemokine C-X-C motif Receptor 4 and 6
CXCL12 and 16	Chemokine C-X-C motif Ligand 12 and 16
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHT	Dihydrotestostérone
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DN-ERG	Dominant-Negative ERG
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
DTC	Disseminated Tumor Cell
EBS	ETS Binding Site
ECAR	Extracellular Acidification Rate
EGF	Epidermal Growth factor
EIP	ERG Inhibitory Peptides
ELF4	E74-Like Factor 4
ELK1, 3 and 4	ETS domain-containing protein Elk-1, -3 and -4
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase 3

ENZ	Enzalutamide
ERα	Estrogen Receptor α
ERRα	Estrogen Related Receptor α
ERF	ETS2 Repressor Factor
ERG	ETS-Related Gene
ERK2	Extracellular signal-Regulated Kinase 2
ESET	ERG associated protein with a Suppressor of variegation, Enhancer of zest and Trithorax domain
ET-1	Endothelin-1
ETAR	Endothelin A Receptor
ETS	E Twenty-Six or E26 Transformation-Specific
ETV1, 4 and 5	ETS variant 1, 4 and 5
EWS	Ewing Sarcoma breakpoint region 1 protein
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FBJ	Finkel-Biskis-Jinkins
FEV	Fifth Ewing sarcoma Variant
FGF	Fibroblast Growth Factor
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
FLI1	Friend Leukemia virus Integration 1
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FOXC	Forkhead box C
FSCN1	Fascin 1
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
FUS/TLS	Fused in Sarcoma/Translocated in Sarcoma
GABPA	GA-Binding Protein transcription factor, Alpha subunit
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
GAS6	Growth Arrest-Specific 6
GATA2	GATA-binding protein 2
GFP	Green Fluorescent Protein
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
HCAR1	Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1
HDAC1, 2 and 3	Histone Deacetylase 1, 2 and 3

HERPUD1	Homocysteine- and Endoplasmic Reticulum stress-inducible Protein, Ubiquitin-like Domain-containing 1
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HSC	Hematopoietic Stem Cell
HSL	Hormone-sensitive Lipase
HSP	Heat-Shock Protein
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM1 and 2	Intercellular Adhesion Molecule 1 and 2
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IgG	Immunoglobulin G
IHC	Immunohistochemistry
IκB	Inhibitor of Kappa B
IL-6 and 8	Interleukin-6 and 8
JUN	JU-Nana
kDa	kilodalton
KLF2	Kruppel-Like Factor 2
KO	Knock Out
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LAL-T	Leuémie Aiguë Lymphoblastique de type T
LAM	Leucémie Aiguë Myéloblastique
LBD	Ligand Binding Domain
LH	Luteinizing Hormone
LHRH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
LMO2	LIM domain only 2
LYL1	Lymphoblastic Leukemia derived sequence 1
MAG1	Metastasis-Associated Gene 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Mb	Megabase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MCT	Monocarboxylate transporters
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2

Mld2	Multilineage defect 2
MMP2, 3 and 9	Matrix Metalloproteinase 2, 3 and 9
mSin3A et 3B	mammalian Switch independant 3A et 3B
MT1-MMP	Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase 1
MYC	Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NDRG1	N-myc Downstream Regulated 1
NEPC	Neuroendocrine Prostate Cancer
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa-B
NID	N-terminal Inhibitory Domain
NKX3.1	NK3 homeobox 1
NTAD	N-terminal Transcriptional Activation Domain
NTD	N-Terminal Domain
OCN	Osteocalcin
OCR	Oxygen Consumption Rate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OST	On-SighT
PARP1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PCA3	Prostate Cancer Gene 3
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDX	Patient-Derived tumor Xenograft
PEA3	Polyoma Enhancer Activator 3
PGC1α	PPAR γ co-activator
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIN	Prostatic Intraepithelial Neoplasia
PIWIL1	Piwi-Like protein 1
PKA	Protein Kinase A
PLAT	Plasminogen Activator, Tissue
PLAU	Plasminogen Activator, Urokinase
PLXNA2 and B1	Plexin A2 and B1
PM	Poids moléculaire

PNT	Pointed
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ
PSA	Prostate Specific Antigen
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10
PTHrP	Parathyroid Hormone-related Protein
QSY	Glutamine Sérine Tyrosine
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RANK	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand
Ras	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RB1	Retinoblastoma 1
RGG	Arginine Glycine Glycine
RNP-C	Ribonucleoprotein-C
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
RTUP	Résection transurétrale de la prostate
RUNX1 and 2	Runt-related transcription factor 1 and 2
RXR	Retinoid X Receptor
SAM	Sterile Alpha Module
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SCL	Stem Cell Leukemia
SHBG	Sex-Hormone Binding Globulin
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SLC45A3	Solute carrier family 45 member 3
SNO	Spindle-shaped N-cadherin ⁺ CD45 ⁻ osteoblast
Sp1	Specific Protein 1
SPOP	Speckle-type POZ protein
SRF	Serum Response Factor
TET	TLS/EWS/TAF15
TFF3	Trefoil factor 3
TGFβ	Transforming Growth Factor β

TIE1 and 2	Tyrosine kinase with Immunoglobulin like and EGF like domains 1 and 2
TMA	Tissue Microarray
TMPRSS2	Transmembrane Protease, Serine 2
TOP2B	Topoisomerase (DNA) 2 Beta
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
TSS	Transcription Start Site
UBC9	Ubiquitin Conjugating enzyme 9
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator
USP9X	Ubiquitin Specific Peptidase 9, X-linked
v-ets	avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VE-Cadherin	Vascular Endothelial-Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR1 and 2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 and 2
VTN	Vitronectin
VWF	Von Willebrand Factor
WB	Western Blot
wHTH	winged helix-turn-helix
WNT	Wingless-type MMTV integration site family

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURE 2.1 : LOCALISATION DE LA PROSTATE HUMAINE.....	23
FIGURE 2.2 : ANATOMIE ZONALE DE LA PROSTATE HUMAINE SELON McNEAL.....	24
FIGURE 2.3 : STRUCTURE DE LA GLANDE PROSTATIQUE.....	26
TABLEAU 2.1 : INCIDENCE, MORTALITE ET PREVALENCE A 5 ANS DES CANCERS DANS LE MONDE CHEZ L’HOMME.....	28
TABLEAU 2.2 : INCIDENCE, MORTALITE ET PREVALENCE A 5 ANS DES CANCERS EN FRANCE METROPOLITAINE CHEZ L’HOMME	28
FIGURE 2.4 : SCORE DE GLEASON DES CANCERS DE LA PROSTATE.....	31
TABLEAU 2.3 : CLASSIFICATION TNM DES CANCERS DE LA PROSTATE	32
TABLEAU 2.4 : CLASSIFICATION DE D’AMICO DES CANCERS DE LA PROSTATE.....	33
TABLEAU 2.5 : CLASSIFICATION EN GROUPE DE GRADES DES CANCER DE LA PROSTATE.....	33
TABLEAU 2.6 : RECOMMANDATIONS THERAPEUTIQUES SELON LE STADE TUMORAL	34
FIGURE 2.5 : REGULATION HORMONALE DE LA PRODUCTION DES ANDROGENES	38
FIGURE 2.6 : MECANISMES DE L’ANDROGENO-INDEPENDANCE	39
TABLEAU 2.7 : PRINCIPALES ALTERATIONS GENOMIQUES DES CANCER DE LA PROSTATE	43
FIGURE 3.1 : RADIOGRAPHIE DES DEUX TYPES DE METASTASES OSSEUSES CHEZ L’HOMME	46
FIGURE 3.2 : PROCESSUS MULTI-ETAPES DE DEVELOPPEMENT DES METASTASES OSSEUSES	47
TABLEAU 3.1 : LISTE DES PROTEINES CLES IMPLIQUEES DANS LA COLONISATION DE L’OS PAR LES CELLULES TUMORALES PROSTATIQUES DISSEMINEEES	51
FIGURE 3.3 : DORMANCE ET REACTIVATION DES CELLULES TUMORALES PROSTATIQUES DISSEMINEEES DANS L’OS	53
TABLEAU 3.2 : MOLECULES PRODUITES PAR LES CELLULES TUMORALES PROSTATIQUES IMPLIQUEES DANS LA FORMATION DE LA METASTASE OSSEUSE	57
FIGURE 3.4 : CERCLE VICIEUX DANS LES METASTASES OSSEUSES DU CANCER DE LA PROSTATE	58
TABLEAU 3.3 : PRINCIPALES LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES DE CANCER DE LA PROSTATE ET LEURS CARACTERISTIQUES	62
FIGURE 3.5 : DIFFERENTS MODELES D’INJECTIONS UTILISES POUR ETUDIER LA PROGRESSION DU CANCER DE LA PROSTATE ET LES METASTASES OSSEUSES.....	64
FIGURE 4.1 : FAMILLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ETS HUMAINS, ALIGNES SUR LE DOMAINE ETS, SIGNATURE DE LA FAMILLE ETS.....	68
FIGURE 4.2 : STRUCTURE DU GENE <i>ERG</i> HUMAIN ET DE SES ISOFORMES	70
FIGURE 4.3 : DOMAINES FONCTIONNELS DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION <i>ERG</i>	72
TABLEAU 4.1 : PARTENAIRES DE LIAISON ET PARTENAIRES FONCTIONNELS DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION <i>ERG</i>	73
FIGURE 4.4 : MODE D’ACTION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ETS.....	74
FIGURE 4.5 : COMPARAISON DES STRUCTURES DE LA PROTEINE <i>ERG</i> PLEINE LONGUEUR ET DES PROTEINES DE FUSION ELF4: <i>ERG</i> , FUS/TLS: <i>ERG</i> , EWS: <i>ERG</i> ET TMPRSS2: <i>ERG</i>	82
FIGURE 4.6 : GENES DE FUSION IDENTIFIES DANS LE CANCER DE LA PROSTATE.....	85
FIGURE 4.7 : GENE DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i> DANS LE CANCER DE LA PROSTATE	86
FIGURE 4.8 : MULTIPLES ISOFORMES DE TRANSCRITS DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i>	88
FIGURE 4.9 : COMPARAISON DES PRODUITS PROTEIQUES ISSUS DU GENE <i>ERG</i> PLEINE LONGUEUR, ET DU GENE DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i> DE TYPE T1E4	89

TABLEAU 4.2 : ETUDES CLINIQUES DE L'INCIDENCE DU GENE DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i> DANS LES CANCERS DE LA PROSTATE.....	91
TABLEAU 4.3 : MODELES DE SOURIS TRANSGENIQUES POUR L'ETUDE DU ROLE DE LA FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i> ET LEURS PHENOTYPES.....	93
TABLEAU 4.4 : ASSOCIATION PRONOSTIQUE DU GENE DE FUSION <i>TMPRSS2:ERG</i> DANS LES CANCERS DE LA PROSTATE	99
FIGURE 7.1 : LES ETAPES DE FORMATION DES INVADOPODES.....	116
FIGURE 7.2 : EXPRESSION DE <i>FSCN1</i> DANS LES CLONES PC3C ANDROGENO-INDEPENDANTS SUREXPRIMANT LA FUSION DE MANIERE ECTOPIQUE.....	119
FIGURE 7.3 : FIXATION DE ERG SUR LE LOCUS <i>FSCN1</i> DANS LES CELLULES PC3C-T1E4-H	120
FIGURE 7.4 : EXPRESSION DE <i>FSCN1</i> DANS LES CELLULES VCAP ANDROGENO-DEPENDANTES EXPRIMANT LA FUSION DE MANIERE ENDOGENE	121
FIGURE 7.5 : EXPRESSION DE <i>FSCN1</i> DANS DES LIGNEES DE CELLULES TUMORALES PROSTATIQUES EXPRIMANT OU NON AR	122
FIGURE 7.6 : EXPRESSION DE <i>ERG</i> , <i>PSA</i> ET <i>FSCN1</i> DANS LES CELLULES VCAP ANDROGENO-DEPENDANTES EXPRIMANT LA FUSION DE MANIERE ENDOGENE.....	124
FIGURE 7.7 : ANALYSE DE CHIP-SEQ PUBLIES DU RECEPTEUR AUX ANDROGENES AR SUR LE LOCUS <i>FSCN1</i> DANS SEPT LIGNEES DE CELLULES EXPRIMANT AR.....	125
FIGURE 7.8 : MARQUAGE IMMUNOFLUORESCENT DE <i>FSCN1</i> ET ERG DANS LES CLONES PC3C ANDROGENO-INDEPENDANTS SUREXPRIMANT LA FUSION DE MANIERE ECTOPIQUE	127
FIGURE 7.9 : TEST DE DEGRADATION DE LA GELATINE ET MARQUAGE IMMUNOFLUORESCENT DE CORTACTIN ET F-ACTINE DANS LES CLONES PC3C ANDROGENO-INDEPENDANTS SUREXPRIMANT LA FUSION DE MANIERE ECTOPIQUE	127
FIGURE 7.10 : MARQUAGE IMMUNOFLUORESCENT DE <i>FSCN1</i> ET CORTACTINE DANS LES CLONES PC3C ANDROGENO-INDEPENDANTS SUREXPRIMANT LA FUSION DE MANIERE ECTOPIQUE	128
FIGURE 7.11 : TEST DE MIGRATION EFFECTUE SUR LE CLONE PC3C-T1E4-H TRAITÉ AVEC UN siRNA CONTROLE OU SPECIFIQUE DE <i>FSCN1</i>	129
FIGURE 7.12 : EXPRESSION DE <i>FSCN1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE CANCERS PRIMAIRES DE LA PROSTATE	130
FIGURE 7.13 : MARQUAGE IMMUNOHISTOCHEMIE DE <i>FSCN1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE CANCERS PRIMAIRES DE LA PROSTATE.....	131
FIGURE 7.14 : MARQUAGE IMMUNOHISTOCHEMIE DE <i>FSCN1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE METASTASES GANGLIONNAIRES ASSOCIEES AU CANCER DE LA PROSTATE	132
FIGURE 7.15 : MARQUAGE IMMUNOHISTOCHEMIE DE <i>FSCN1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE METASTASES OSSEUSES ASSOCIEES AU CANCER DE LA PROSTATE	133
FIGURE 7.16 : META-ANALYSES DE L'EXPRESSION DE <i>FSCN1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE CANCERS DE LA PROSTATE.....	134
FIGURE 7.17 : META-ANALYSE DE L'EXPRESSION DE <i>FSCN1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE METASTASES ASSOCIEES AU CANCER DE LA PROSTATE	135
FIGURE 7.18 : REGULATION DE LA FONCTION ADIPOCYTAIRE PAR LE RECEPTEUR <i>HCAR1</i>	141
FIGURE 7.19 : EXPRESSION DE <i>HCAR1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE CANCERS PRIMAIRES DE LA PROSTATE	145
FIGURE 7.20 : MARQUAGE IMMUNOHISTOCHEMIE DE <i>HCAR1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE CANCERS PRIMAIRES DE LA PROSTATE.....	146

FIGURE 7.21 : MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE <i>HCAR1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE METASTASES GANGLIONNAIRES ASSOCIEES AU CANCER DE LA PROSTATE	146
FIGURE 7.22 : MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE <i>HCAR1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE METASTASES OSSEUSES ASSOCIEES AU CANCER DE LA PROSTATE	147
FIGURE 7.23 : META-ANALYSES DE L'EXPRESSION DE <i>HCAR1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE CANCERS DE LA PROSTATE.....	148
FIGURE 7.24 : META-ANALYSES DE L'EXPRESSION DE <i>HCAR1</i> DANS DES ECHANTILLONS HUMAINS DE METASTASES ASSOCIEES AU CANCER DE LA PROSTATE	149
FIGURE 7.25 : EXPRESSION DE <i>HCAR1</i> DANS LES CELLULES PC3C ET VCAP, DEUX LIGNEES TUMORALES PROSTATIQUES HUMAINES	150
FIGURE 7.26 : ANALYSE DE CHIP-SEQ PUBLIES DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ERG SUR LE LOCUS <i>HCAR1</i> DANS LES CELLULES VCAP	152
FIGURE 7.27 : TEST DE MIGRATION EFFECTUE SUR LE CLONE PC3C-T1E4-H TRAITÉ AVEC UN siRNA CONTRÔLE OU SPECIFIQUE DE <i>HCAR1</i>	154
FIGURE 7.28 : UTILISATION DE VECTEURS D'EXPRESSION DE <i>HCAR1</i> ET DE siRNA SPECIFIQUE DE <i>HCAR1</i> POUR L'OPTIMISATION DE LA DETECTION DE LA PROTEINE EN WESTERN BLOT.....	156
FIGURE 7.29 : RÔLE DE <i>HCAR1</i> DANS LE MÉTABOLISME DES CELLULES TUMORALES ?	157
TABLEAU 7.1 : <i>HCAR1</i> , UN SENSEUR MÉTABOLIQUE INFLUENÇANT LA B-OXYDATION ET LE MÉTABOLISME MITOCHONDRIAL ?	160
FIGURE 8.1 : ALTERATIONS GÉNOMIQUES RETROUVÉES DANS LES CRPC MÉTASTATIQUES.....	171
FIGURE 9.1 : EXPRESSION DE ERG DANS LES CELLULES PC3C ET VCAP, DEUX LIGNEES TUMORALES PROSTATIQUES HUMAINES	175

I. INTRODUCTION

1. AVANT-PROPOS

Le cancer est une pathologie touchant des milliers d'individus chaque année dans le monde, et dont l'incidence augmente avec l'âge. Il est caractérisé par la présence d'une ou plusieurs tumeurs malignes impliquant de nombreux changements dynamiques dans le génome. Une tumeur se développe par un processus formellement analogue à l'évolution de Darwin. En effet, une succession d'altérations génomiques, conférant chacune un avantage de croissance ou de survie, conduit à la transformation progressive d'une cellule normale en cellule tumorale, lui permettant d'échapper au contrôle de l'organisme, de se multiplier indéfiniment, d'envahir les tissus voisins en les détruisant, et même, de se répandre dans l'organisme sous forme de métastases. Cependant, malgré d'importantes avancées de la recherche en cancérologie ces dernières années, les bases moléculaires du développement tumoral restent mal comprises.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse, portant sur l'étude d'une altération génétique particulière, le gène de fusion *TMPRSS2:ERG*, retrouvée dans plus de la moitié des cas de cancer de la prostate, très répandu chez les hommes à partir de 50 ans. Plus précisément, nous avons étudié le rôle de ce gène de fusion, dans les phénotypes agressifs du cancer de la prostate, c'est-à-dire dans les métastases osseuses incurables, cherchant ainsi à déterminer si cette altération génétique est impliquée dans le tropisme des cellules tumorales prostatiques vers l'os, ou dans leur développement directement dans le microenvironnement osseux, sous forme de métastases.

2. CANCER DE LA PROSTATE

Pour comprendre le rôle du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate, nous allons d'abord présenter, dans cette première partie, les notions essentielles de la prostate et du cancer de la prostate.

2.1 Prostate

2.1.1 Structure anatomique et histologique de la prostate

La prostate est la glande exocrine la plus volumineuse de l'appareil génital masculin. Très petite à la naissance, son volume augmente lors de la puberté, puis de nouveau après 50 ans. Chez l'homme adulte, la prostate saine est souvent comparée à une petite châtaigne, tant par sa forme générale que par sa taille, de 3 cm de hauteur, 4 cm de largeur et un volume estimé à 20 cm³ environ. C'est un organe ferme, palpable à travers la paroi rectale. Située sous la vessie et en avant du rectum, elle se développe autour de la partie initiale du canal de l'urètre, et est traversée par les deux canaux éjaculateurs en provenance des vésicules séminales (Figure 2.1). La prostate se situe ainsi au croisement des voies urinaires et spermatiques appelé carrefour uro-génital.

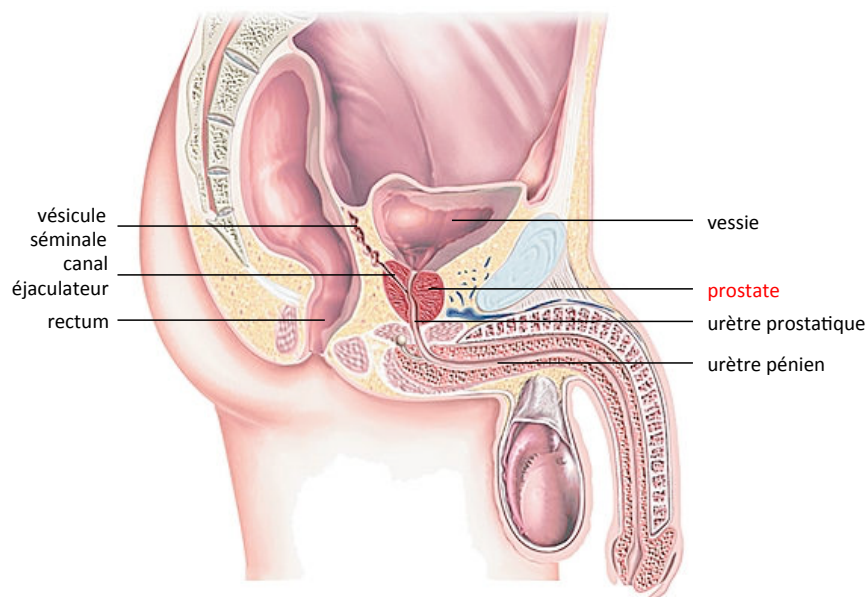


Figure 2.1 : Localisation de la prostate humaine

Adapté d'après l'Encyclopédie Larousse.

L'organisation anatomique de la prostate a fait l'objet de nombreuses études. Après la description des lobes prostatiques par Lowsley et al. en 1915, le modèle anatomique accepté actuellement est celui de McNeal et al. établi en 1968 (Lowsley, 1915; McNeal, 1968). Selon ce modèle zonal, la prostate peut ainsi être divisée en plusieurs zones anatomiques (Figure 2.2) (De Marzo *et al.*, 2007; Selman, 2011) :

- la **zone de transition** : elle entoure l'urètre au centre de la prostate et représente 5% de la masse glandulaire prostatique. Avec le vieillissement, cette zone augmente en taille et peut donner un adénome de la prostate également appelé hypertrophie bénigne de la prostate, survenant fréquemment chez des hommes âgés de plus de 70 ans.
- la **zone centrale** : elle se situe en arrière de la zone de transition, entoure les canaux éjaculateurs et représente 25% de la masse glandulaire prostatique.
- la **zone périphérique** : elle entoure la zone centrale et l'urètre et représente 70% de la masse glandulaire prostatique. C'est également la zone la plus touchée par les tumeurs malignes, environ 75%. Se trouvant la plus proche du rectum, elle est facilement palpable par le médecin lors d'un toucher rectal.
- la **zone fibro-musculaire antérieure** : elle se situe en avant de l'urètre, est constituée de fibres musculaires lisses et striées et est complètement dépourvue de tissu glandulaire.

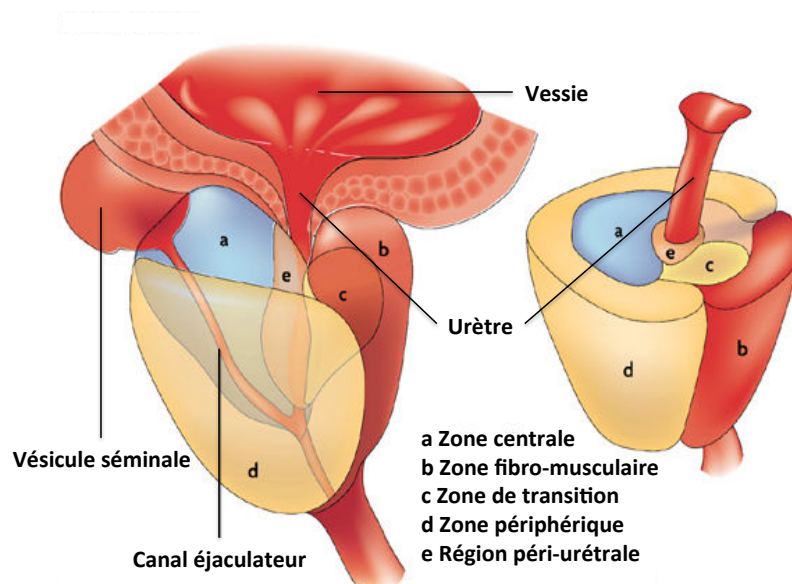


Figure 2.2 : Anatomie zonale de la prostate humaine selon McNeal

Adapté d'après (De Marzo *et al.*, 2007).

La prostate est un organe musculaire et glandulaire, composé d'environ 30 à 50 glandes tubulo-alvéolaires s'ouvrant directement dans l'urètre prostatique par l'intermédiaire d'une vingtaine de longs canaux. Ces glandes sont réparties en trois groupes : des glandes muqueuses péri-urétrales, des glandes sous-muqueuses péri-urétrales, et des glandes prostatiques principales périphériques, assurant l'essentiel de la fonction sécrétoire de la prostate. Les glandes prostatiques sont enrobées dans un stroma constitué par un tissu fibro-élastique riche en fibres musculaires lisses, permettant la contraction, et servant à expulser les sécrétions prostatiques dans l'urètre.

D'un point de vue histologique, les glandes prostatiques sont formées par des cellules jointives constituant l'épithélium prostatique. Dans cet épithélium simple ou pseudostratifié, il y a au moins trois types de cellules distinctes (Figure 2.3):

- Les **cellules luminales sécrétrices** : androgéno-dépendantes, elles jouent un rôle essentiel dans la sécrétion prostatique et présentent un aspect variable selon le degré de stimulation androgénique (cubique bas, inactif ; cylindrique haut, actif). Au niveau moléculaire, elles sont caractérisées par l'expression du récepteur aux androgènes (AR, Androgen Receptor), des cytokératines 8 et 18 et du marqueur de surface CD57 (Abate-Shen and Shen, 2000).
- Les **cellules basales** : elles ne jouent aucun rôle dans la sécrétion de la prostate et forment une couche cellulaire continue et aplatie entre les cellules luminales et la membrane basale. Elles expriment les cytokératines 5 et 14, le marqueur de surface CD44, et très faiblement AR (Abate-Shen and Shen, 2000).
- Les **cellules neuroendocrines** : ces cellules rares ont une origine embryonnaire inconnue, et fourniraient des signaux paracrines favorisant la croissance des cellules luminales. Elles n'expriment pas AR et sont androgéno-indépendantes ; dispersées entre les cellules basales, elles expriment la chromogranine A, la synaptophysine, la sérotonine, et d'autres neuropeptides (Abate-Shen and Shen, 2000).

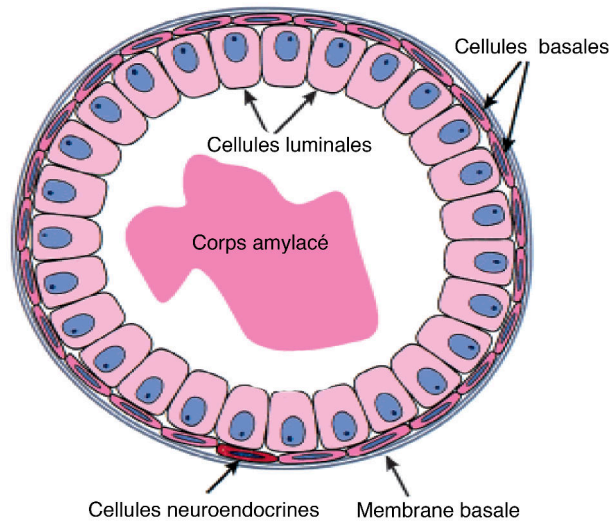


Figure 2.3 : Structure de la glande prostatique

Adapté d'après (Abate-Shen and Shen, 2000).

On trouve occasionnellement dans la lumière des alvéoles glandulaires des concrétions prostatiques, encore appelées corps amylicés, dont la taille peut atteindre 2 mm ; ce sont des agrégats concentriques de composants sécrétoires et de cellules épithéliales.

2.1.2 Fonctions physiologiques de la prostate

La fonction principale de la prostate est de produire la partie liquide du sperme. Ce liquide prostatique acide (pH 6,4) contribue pour environ 30% au volume de l'éjaculat, le reste étant produit par les vésicules séminales, situées en arrière de la vessie et au-dessus de la prostate. Ce liquide est riche en minéraux et en protéines et assure le maintien et la nutrition des spermatozoïdes. Deux protéines ont une signification diagnostique, la phosphatase acide prostatique et l'antigène prostatique spécifique, le PSA. En effet, leurs concentrations augmentent souvent dans le sang en cas de cancer de la prostate. Le PSA est une protéase servant à liquéfier les sécrétions visqueuses des glandes vésiculeuses. Le liquide séminal se mélange avec les spermatozoïdes en provenance des testicules au moment de l'éjaculation, et passent par les canaux déférents.

La prostate joue également un rôle dans le contrôle du passage de l'urine. En effet, l'urètre s'étend de la vessie au pénis en passant par la prostate où il est entouré de deux sphincters ou anneaux musculaires, l'un à l'entrée, l'autre à la sortie de la glande. Les fibres musculaires composant ces sphincters sont contrôlées par le système nerveux autonome et se contractent ou se relâchent, permettant ainsi de gérer la continence.

2.1.3 Maladies affectant la prostate

La prostate peut être le siège de trois principales maladies : la prostatite, l'adénome de la prostate (ou hypertrophie bénigne de la prostate), et le cancer de la prostate. Ces trois maladies sont différentes, même si elles peuvent avoir des symptômes similaires, et un diagnostic différentiel permet d'identifier de quelle maladie il s'agit en prenant en compte les éléments confirmant ou infirmant le type d'affection en cause.

La **prostatite** est une infection ou inflammation de la prostate d'origine bactérienne ou non. Elle peut toucher beaucoup d'hommes, quel que soit leur âge : environ 50 % des hommes ont une forme de prostatite au cours de leur vie. Une prostatite n'augmente pas le risque de développer un cancer de la prostate.

L'**adénome de la prostate** (ou hypertrophie bénigne de la prostate) est une affection bénigne qui se manifeste par une augmentation de taille de la prostate en raison d'une croissance accrue des cellules dont la plupart sont situées dans la zone de transition de la prostate. Avec l'âge, la prostate devient naturellement plus grosse : presque tous les hommes de plus de 70 ans ont un adénome de la prostate. Un adénome de la prostate n'augmente pas le risque de développer un cancer de la prostate.

Le **cancer de la prostate** correspond au développement de cellules cancéreuses dans la prostate. Dans environ 90 % des cas, l'histologie du cancer de la prostate est un adénocarcinome, c'est-à-dire un cancer d'origine épithéliale glandulaire, atteignant particulièrement les cellules luminales sécrétrices produisant une partie du liquide séminal. Il existe d'autres formes de cancers rares de la prostate.

2.2 Notions cliniques du cancer de la prostate

2.2.1 Epidémiologie et facteurs de risque du cancer de la prostate

Au niveau mondial, le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus fréquent chez l'homme, d'après les données regroupées par l'étude GLOBOCAN 2012 réalisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui estime l'incidence, la mortalité et la prévalence à 5 ans des cancers dans le monde en 2012 (source : globocan.iarc.fr) (Tableau

2.1). On estime que 1,1 million d'hommes dans le monde ont reçu un diagnostic de cancer de la prostate en 2012, représentant 15% des cancers diagnostiqués chez les hommes. Près de 70% des cas se produisent dans des régions plus développées, probablement en raison des pratiques de dépistage qui y sont plus répandues.

Avec près de 307 000 décès en 2012, le cancer de la prostate est la cinquième cause de décès par cancer chez les hommes, représentant 6,6% des décès d'hommes. Étant donné que les tests de dépistage du PSA ont un effet beaucoup plus important sur l'incidence que sur la mortalité, les taux de mortalité varient moins dans le monde.

Tableau 2.1 : Incidence, mortalité et prévalence à 5 ans des cancers dans le monde chez l'homme

Adapté d'après (GLOBOCAN 2012, OMS).

Cancer	Incidence	Mortalité	Prévalence (5ans)
Poumon	1 241 601	1 098 702	1 266 696
Prostate	1 094 916	307 481	3 857 500
Colorectal	746 298	373 639	1 953 431
Estomac	631 293	468 970	1 030 787
Foie	554 369	521 041	453 345

En France métropolitaine, le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent de l'homme de plus de 50 ans, nettement devant les cancers pulmonaires et colorectaux, avec près de 56 000 nouveaux cas estimés en 2012 (Tableau 2.2). Son incidence est en augmentation, en raison du vieillissement de la population, de l'amélioration de la sensibilité des techniques diagnostiques, et de la diffusion du dépistage par dosage du PSA. Parallèlement, son taux de mortalité est en diminution, du fait de l'amélioration du diagnostic, plus précoce, et de l'efficacité des traitements. Il représente la troisième cause de décès par cancer chez l'homme, avec 8 600 décès estimés en 2012.

Tableau 2.2 : Incidence, mortalité et prévalence à 5 ans des cancers en France métropolitaine chez l'homme

Adapté d'après (GLOBOCAN 2012, OMS).

Cancer	Incidence	Mortalité	Prévalence (5 ans)
Prostate	56 841	8 606	224 299
Poumon	28 033	22 907	38 076
Colorectal	21 524	8 991	65 163
Vessie	9 283	3 654	28 439
Rein	7 358	2 894	23 150

Les causes du cancer de la prostate ne sont pas encore bien comprises, mais plusieurs études ont démontré qu'il existe des facteurs de risque favorisant son développement. En particulier, l'âge est le facteur de risque le plus significatif ; très rare avant 50 ans, le cancer de la prostate voit son incidence augmenter progressivement avec l'âge. En France, l'âge moyen au moment du diagnostic est de près de 70 ans en 2011 selon les informations fournies par l'Institut National du Cancer. Les antécédents familiaux (Carter *et al.*, 1992; Valeri *et al.*, 1999) ainsi que les caractéristiques ethnogéographiques constituent également des facteurs de risque. En effet, le cancer de la prostate est plus fréquent chez les hommes d'origine afro-antillaise alors que les populations caucasiennes et asiatiques présentent un risque moindre (Damber and Aus, 2008). Il est probable que des facteurs environnementaux, notamment le mode de vie et plus particulièrement les habitudes alimentaires, soient en cause (Whittemore *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 2008). Un risque potentiel lié à l'utilisation de pesticides, notamment la chlordécone, reste à démontrer.

2.2.2 Symptômes, dépistage, diagnostic et classification des cancers de la prostate

Le cancer de la prostate est souvent asymptomatique jusqu'à des stades relativement avancés. La présence de certains symptômes peut évoquer un cancer de la prostate localement avancé, tels que des troubles urinaires irritatifs ou obstructifs pouvant aboutir à terme à une insuffisance rénale, une hémospérmié ou une hématurie, une altération de l'état général, ou évoquer un cancer de la prostate métastatique, tels que des douleurs osseuses révélatrices de métastases osseuses, ou des signes neurologiques (paresthésie, déficit musculaire des jambes, syndrome de la queue-de-cheval) témoignant d'une compression médullaire par des métastases rachidiennes.

Afin de diagnostiquer précocement les cancers de la prostate et d'accroître les chances de réussite du traitement, un dépistage par le dosage du PSA total sérique et un toucher rectal sont prescrits aux sujets présentant des facteurs de risque, et/ou des signes cliniques, et/ou aux patients qui le souhaitent à partir de 50 ans. Cependant, les avis sont partagés concernant le dépistage précoce systématique de ce cancer car il existe des risques de surdiagnostic ou de surtraitement (Bretthauer and Kalager, 2013). De plus, il n'existe pas de preuve de son réel impact sur l'épidémiologie du cancer de la prostate, notamment sur l'amélioration de la survie (Andriole *et al.*, 2009; Schroder *et al.*, 2009).

Le dosage du PSA et le toucher rectal permettent de détecter une anomalie de la prostate, mais ne permettent pas à eux seuls d'affirmer le diagnostic du cancer de la prostate car d'autres causes bénignes peuvent induire une augmentation du taux de PSA ou du volume de la glande prostatique. La certitude du diagnostic n'est acquise qu'après l'examen anatomopathologique d'une biopsie prostatique ou de pièces opératoires, permettant l'observation d'éventuelles cellules tumorales.

L'étendue du cancer au moment du diagnostic et son évolution potentielle sont deux facteurs importants à prendre en considération pour choisir des traitements adaptés. Au niveau clinique, les médecins utilisent différentes classifications pour définir les stades des cancers de la prostate et estimer le risque de progression.

- Le **score de Gleason** : score histopronostique, élaboré en 1966 par le Docteur Donald F. Gleason et redéfini en 2005, caractérisant le degré de différenciation de la tumeur (Figure 2.4). C'est un facteur pronostique essentiel dans la prise en charge du cancer de la prostate, reconnu internationalement et adopté par l'OMS. Plusieurs foyers tumoraux d'évolution différente et à des stades de différenciation pouvant être différents coexistent au sein de la glande prostatique. Ainsi, pour attribuer ce score, le pathologiste observe les tissus issus de biopsies au microscope afin d'identifier les deux grades histologiques les plus représentés dans la tumeur, assigne un nombre à chacun de ces deux modèles, allant de 1 (bien différenciés, bon pronostic), à 5 (peu différenciés, mauvais pronostic), puis additionne ces deux nombres (Egevad, 2008). Le score de Gleason se situe habituellement entre 6 et 10 car il est difficile pour le pathologiste de déterminer avec certitude qu'une tumeur de bas grade, inférieure à 6, est cancéreuse.

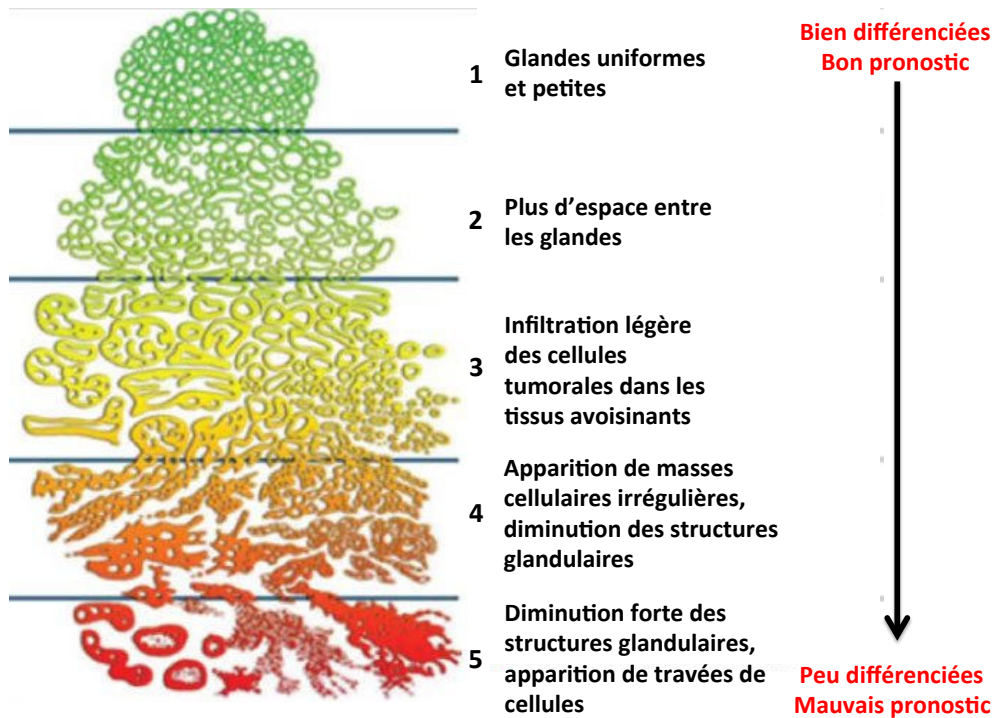


Figure 2.4 : Score de Gleason des cancers de la prostate

- La **classification TNM** : classification clinique basée sur trois critères : la taille de la tumeur (T), la présence ou non de cellules cancéreuses dans les ganglions (N), et la présence ou non de métastases (M) (Tableau 2.3). Selon le bilan de ces trois critères, les cancers de la prostate sont classés en quatre stades :
 - Cancer de la prostate localisé : T1/T2, N0, M0
 - Cancer de la prostate localement avancé : T3/T4, N0/Nx, M0
 - Cancer de la prostate avec atteinte ganglionnaire pelvienne : tous T, N1, M0
 - Cancer de la prostate métastatique : tous T, tous N, M1

Tableau 2.3 : Classification TNM des cancers de la prostate

T : Tumeur primitive	
Tx	Tumeur primitive non évaluée
T0	Tumeur primitive non retrouvée
T1	Tumeur ni palpable au toucher rectal ni visible en imagerie
T1a	Tumeur occupant moins de 5% du tissu réséqué
T1b	Tumeur occupant plus de 5% du tissu réséqué
T1c	Tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'une élévation du taux de PSA
T2	Tumeur limitée à la prostate
T2a	Tumeur atteignant la moitié d'un lobe au moins
T2b	Tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais sans atteindre les deux lobes
T2c	Tumeur atteignant les deux lobes
T3	Extension au-delà de la capsule
T3a	Extension extra-capsulaire uni- ou bilatérale
T3b	Extension aux vésicules séminales uni- ou bilatérale
T4	Tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscles releveurs de l'anus ou paroi pelvienne)

N : Ganglions régionaux	
NX	Ganglions régionaux non évalués
N0	Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1	Atteinte ganglionnaire régionale

M : Métastases à distance	
MX	Métastases à distance non évaluées
M0	Absence de métastase à distance
M1	Métastases à distance
M1a	Atteinte des ganglions non régionaux
M1b	Atteinte osseuse
M1c	Autres sites

- La **classification de d'Amico** : permet de guider la prise en charge des patients en classant les tumeurs prostatiques localisées en trois groupes en fonction de leur risque de progression (récidive biochimique) après prostatectomie totale, radiothérapie externe et curiethérapie interstitielle (Tableau 2.4) (D'Amico *et al.*, 1998). Les groupes à risque intermédiaire et à risque élevé sont hétérogènes, il suffit d'avoir un des trois critères pour définir l'appartenance à ces groupes. Une distinction existe au sein du groupe à risque intermédiaire entre les tumeurs de score de Gleason 3+4 et les tumeurs de score de Gleason 4+3 qui appartiendrait plutôt au groupe à haut risque (D'Amico *et al.*, 1998).

Tableau 2.4 : Classification de d'Amico des cancers de la prostate

Risque de progression	PSA (ng/mL)	Score de Gleason	Stade clinique
Faible	< 10	≤ 6	≤ T2a
Intermédiaire	> 10 et < 20	7	T2b
Élevé	> 20	≥ 7	T2c-T3a

Récemment, un nouveau concept de classification a été défini et adopté par la société internationale des pathologies urologiques 2014, consistant à former des groupes de grades, et permettant d'aligner les grades de cancer de la prostate aux grades des autres cancers. Cette nouvelle classification histopathologique permet notamment de mettre en avant les différences cliniques entre les scores de Gleason 7 (3+4) et 7 (4+3) (Tableau 2.5) (Epstein *et al.*, 2016).

Tableau 2.5 : Classification en groupe de grades des cancer de la prostate

Nouvelle catégorie	Description histologique	Score de Gleason
Grade 1	- Glandes individuelles bien formées	≤ 6 (3+3 ou 3+2 ou 2+3 ou 2+2)
Grade 2	- Principalement des glandes individuelles bien formées - Quelques glandes mal formées, fusionnées et /ou cribriformes	7 (3+4)
Grade 3	- Principalement des glandes mal formées, fusionnées et/ou cribriformes - Quelques glandes individuelles bien formées	7 (4+3)
Grade 4	- Glandes mal formées, fusionnées et/ou cribriformes OU - Principalement des glandes individuelles bien formées avec quelques pertes de formation glandulaire OU - Principalement pertes de formation glandulaire avec quelques glandes individuelles bien formées (mais des glandes mal formées, fusionnées et/ou cribriformes peuvent être une composante mineure)	8 (4+4 ou 3+5 ou 5+3)
Grade 5	- Perte de formation glandulaire OU glandes nécrosées - Avec ou sans glandes mal formées, fusionnées et/ou cribriformes	9 - 10

2.2.3 Principes et choix de traitements

Les stratégies thérapeutiques définies par la Haute Autorité de Santé en 2012 sont décrites dans le Tableau 2.6. Le traitement sera choisi en fonction :

- des **caractéristiques du cancer de la prostate**, c'est-à-dire son stade TNM et sa classification de d'Amico pour les tumeurs localisées
- des **caractéristiques de la prostate**, c'est-à-dire son volume

- des **caractéristiques du patient**, c'est-à-dire son âge, les comorbidités, et l'existence de troubles mictionnels
- des **préférences du patient**, selon les bénéfices et les effets indésirables de chaque traitement, en particulier dans le cas où il existe des alternatives thérapeutiques présentant un rapport bénéfice/risque équivalent.

Tableau 2.6 : Recommandations thérapeutiques selon le stade tumoral

Stade non métastatique	
Tumeur localisée à faible risque*	<p>Traitement immédiat : prostatectomie (+/- curage ganglionnaire) ou radiothérapie externe ou curiethérapie</p> <p>Traitement différé à discuter dans des situations particulières** : « surveillance active » ou « abstention surveillance clinique »</p>
Tumeur localisée à risque intermédiaire*	<p>Traitement immédiat : prostatectomie (curage ganglionnaire recommandé) ou radiothérapie externe** (+/- hormonothérapie) ou exceptionnellement curiethérapie</p> <p>Traitement différé à discuter dans des situations particulières** : « abstention surveillance clinique »</p>
Tumeur localisée à haut risque*	Prostatectomie totale (curage ganglionnaire recommandé) ou radiothérapie externe*** en association à une hormonothérapie prolongée (2-3 ans)
Tumeur localement avancée (stade T3b-T4)	Radiothérapie externe*** en association à une hormonothérapie prolongée (2-3 ans)
Stade métastatique (N+ ou M+)	
Atteinte ganglionnaire (N+) ou à distance (M+)	Hormonothérapie (+/- radiothérapie pelvi-prostatique si N+, M0) ; chimiothérapie en cas de résistance à la castration

(*) Classification de d'Amico ; (**) Tumeur asymptomatique ; (***) En cas de radiothérapie, curage ganglionnaire à discuter

Ces traitements peuvent être regroupés en trois catégories : la surveillance active sans traitement particulier, les traitements curatifs, dont la chirurgie et la radiothérapie, et les traitements palliatifs, dont l'hormonothérapie et la chimiothérapie.

- **Surveillance active** : beaucoup de cancers de la prostate de score de Gleason 6 ou de faible risque de progression selon d'Amico ne vont pas progresser ou évoluer lentement sans avoir d'impact sur la survie du patient. Ainsi, le traitement n'est pas systématique, et cette décision médicale est prise dans le cas d'un cancer de la prostate cliniquement localisé, asymptomatique, et à faible risque de progression pour des patients dont l'espérance de vie est supérieure à 10 ans. Il s'agit d'une surveillance active nécessitant un suivi par PSA tous les 6 mois et des re-biopsies régulières. Elle a

pour objectif de différer la mise en place d'un traitement, y compris à visée curative, et les effets indésirables qui l'accompagnent, tant qu'il n'est pas nécessaire.

- **Chirurgie** : la prostatectomie totale est un traitement curatif proposé aux patients atteints d'un cancer de la prostate localisé ou localement avancé, dont l'espérance de vie est de plus de 10 ans, et classiquement âgés de moins de 75 ans. Il consiste en l'exérèse chirurgicale complète de la prostate et des vésicules séminales. Un curage ganglionnaire pelvien consistant à enlever les ganglions lymphatiques du bassin doit être effectué en cas de risque intermédiaire ou élevé si le choix du traitement est la prostatectomie totale. La résection transurétrale de la prostate (RTUP) est une intervention pratiquée afin de soulager les symptômes de l'obstruction des voies urinaires causés par une augmentation de la taille de la prostate, exerçant une pression sur l'urètre. Elle est pratiquée dans les cas de cancer avancé de la prostate, ou chez des hommes dont l'état de santé ne permet pas de subir une prostatectomie radicale.
- **Radiothérapie** : la radiothérapie externe est un traitement curatif consistant à irradier la loge prostatique, guidée par imagerie. La radiothérapie interne ou curiethérapie est un traitement curatif consistant en la mise en place de radioéléments, souvent des grains d'iode radioactifs, directement dans la prostate, sous contrôle échographique. Elle est indiquée pour les patients atteints d'un cancer de la prostate localisé et de faible risque d'Amico ayant une espérance de vie de plus de 10 ans. Elle peut être associée à une hormonothérapie de courte durée de 6 mois pour les cancers à risque intermédiaire ou de longue durée de 3 ans pour les cancers à haut risque de progression.
- **Hormonothérapie** : traitement palliatif ayant pour but de supprimer l'effet des androgènes, cruciaux pour la fonction des cellules prostatiques normales, mais également pour la croissance des cellules prostatiques tumorales. Il s'effectue par blocage de leur synthèse ou de leur action, associé ou non à un blocage de leur fixation sur leurs récepteurs périphériques AR.

La suppression androgénique peut être réalisée par castration chirurgicale ou chimique. La castration chirurgicale est définitive et élimine les androgènes testiculaires de la circulation par la réalisation d'une ablation des testicules soit par pulpectomie bilatérale, conservant la paroi externe des testicules, soit par orchidectomie bilatérale, plus rarement utilisée, tout le testicule est enlevé. La

castration chimique est obtenue par l'utilisation de différentes classes d'agents hormonothérapeutiques.

Son efficacité pour contrôler la progression tumorale est en moyenne de 3 ans chez le patient métastatique, jusqu'à la survenue inéluctable de la résistance à la castration, marquant l'entrée dans la phase terminale de la maladie durant laquelle la survie des patients est de 18 à 24 mois (Zumsteg and Zelefsky, 2012).

- **Chimiothérapie** : traitement palliatif, utilisé dans le cas de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration et symptomatique, dont l'action est dirigée notamment sur les mécanismes de la division cellulaire. Plusieurs molécules de chimiothérapie sont disponibles et peuvent être utilisées successivement, on parle de lignes de traitement. La molécule de première ligne est le docétaxel qui stabilise les microtubules en inhibant leur dépolymérisation par liaison stable à la tubuline, entraînant un blocage de la mitose (Tannock *et al.*, 2004; Galsky *et al.*, 2012).

2.3 Cancer de la prostate résistant à la castration

Depuis la découverte de la dépendance androgénique, la suppression androgénique par castration chirurgicale ou chimique est le traitement de référence pour les patients avec une récurrence biochimique après thérapie primaire initiale, ainsi que pour ceux atteints d'un cancer de la prostate localement avancé ou métastatique (Huggins and Hodges, 1972).

Cependant, malgré la réponse initiale au blocage des androgènes, tous les patients finissent par progresser vers la résistance à la castration au bout de 2 à 3 ans (Harris *et al.*, 2009). Cet état se définit par la progression clinique (développement de métastases ou progression d'une maladie préexistante) ou biochimique (trois augmentations consécutives des taux sériques de PSA) de la maladie, en dépit de la castration et du faible taux de testostérone circulant (Saad and Hotte, 2010; Cookson *et al.*, 2013).

2.3.1 Régulation hormonale de la prostate en condition physiologique

L'activité de la prostate est connue pour être finement régulée par des hormones sexuelles stéroïdiennes, notamment les androgènes, qui jouent un rôle clé lors de la croissance et du développement fonctionnel de la prostate lors de la puberté, ainsi que dans l'homéostasie de la prostate chez l'adulte (Abate-Shen and Shen, 2000; Litvinov *et al.*, 2003). Ils peuvent agir via deux effets. D'une part, ils stimulent le renouvellement et le maintien de

l'épithélium prostatique en activant la production de facteurs de croissance, tels que TGF (Transforming Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) et FGF (Fibroblast Growth Factor), par les cellules stromales. D'autre part, ils contribuent au maintien des fonctions des cellules luminales sécrétrices, et notamment la production de protéines comme le PSA (Litvinov *et al.*, 2003).

Chez l'homme, les deux organes produisant les androgènes sont les testicules, 80 à 90%, et les glandes surrénales, 10 à 20%. La synthèse et la sécrétion des androgènes sont sous le contrôle du système hypothalamo-hypophysaire (Figure 2.5). La LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) et la CRH (Corticotrophine-Releasing Hormone) produites et activées dans l'hypothalamus interagissent avec leurs récepteurs au niveau de l'hypophyse, entraînant la synthèse et la sécrétion de LH (Luteinizing Hormone) et ACTH (Adrenocorticotropin Hormone) respectivement. La LH et l'ACTH interagissent à leur tour respectivement avec leurs récepteurs au niveau des cellules de Leydig dans les testicules, entraînant la synthèse et la sécrétion de testostérone, ou au niveau des cellules de la zone réticulée de la partie corticale des glandes surrénales, entraînant notamment la synthèse et la sécrétion d'androstènedione, de déhydroépiandrostérone (DHEA) et de testostérone. La testostérone, provenant des testicules, et les glucocorticoïdes, provenant de la zone fasciculée de la partie corticale des glandes surrénales, peuvent exercer un rétrocontrôle négatif sur la production respective de LHRH et LH, ou CRH et ACTH.

Seule une petite partie de la testostérone circulante est non liée et fonctionnellement active (3%), le reste est lié et séquestré par la SHBG (Sex-Hormone Binding Globulin). Cependant, la testostérone n'est pas le principal androgène fonctionnellement actif dans le microenvironnement prostatique. Après diffusion dans le cytoplasme, la testostérone est convertie par l'enzyme 5 α -réductase en DHT (dihydrotestostérone), qui a une affinité cinq fois plus élevée pour le LBD (Ligand Binding Domain) de AR (Lindzey *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1999; Feldman and Feldman, 2001; Green *et al.*, 2012).

Le récepteur nucléaire AR de 110 kDa est composé de quatre motifs distincts, le domaine amino-terminal (NTD), le domaine de liaison à l'ADN, la région charnière, et le domaine de fixation du ligand (LBD). Le récepteur cytoplasmique est lié par des protéines HSP (Heat-Shock Protein) dans son état inactif. La liaison androgénique, en particulier de DHT ou de testostérone, au LBD provoque une modification conformationnelle qui conduit à la dissociation du complexe HSP, suivie de la phosphorylation et de l'homodimérisation du récepteur, puis de la translocation au noyau et de la liaison aux éléments de réponse aux

androgènes (ARE, androgen response element) au niveau de la région promotrice des gènes régulés par AR, contrôlant ainsi la survie et la croissance des cellules prostatiques, la sécrétion de PSA, ainsi que d'autres voies de signalisation (Figure 2.5) (Shafi *et al.*, 2013). Cette interaction avec la région promotrice est sous l'influence de nombreux corégulateurs transcriptionnels, environ 150 identifiés, dont des enzymes permettant d'ouvrir la structure de la chromatine pour favoriser la transcription (Heemers and Tindall, 2007).

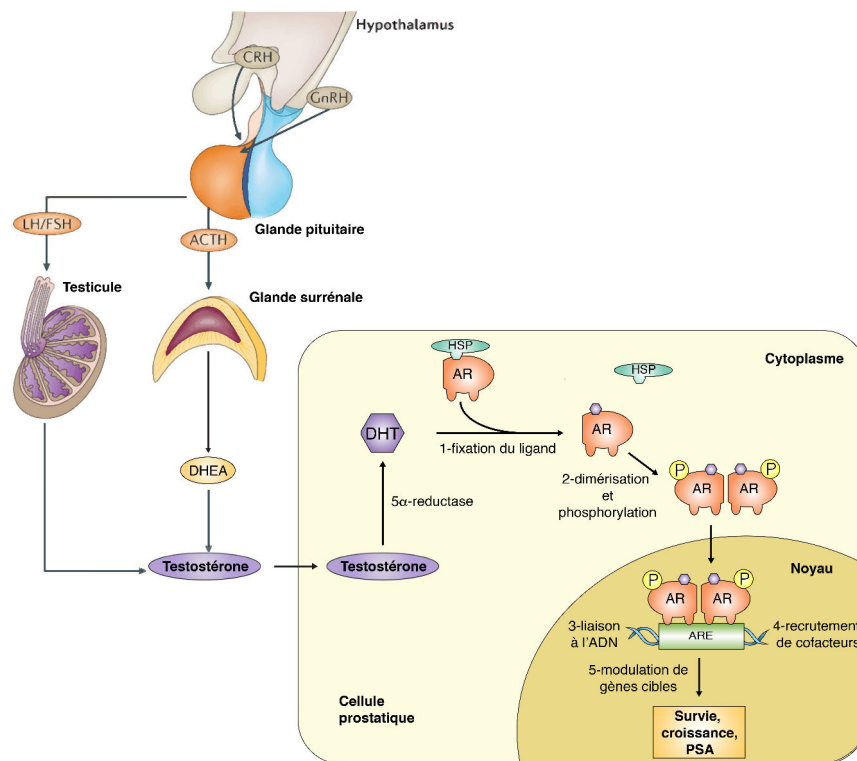


Figure 2.5 : Régulation hormonale de la production des androgènes
Adapté d'après (Narayanan *et al.*, 2016).

2.3.2 Rôle du récepteur aux androgènes dans le cancer de la prostate

La progression vers un cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC) est le plus souvent provoquée par la réactivation de la signalisation AR qui peut se produire par au moins six mécanismes de résistance différents, présentés individuellement ci-après et regroupés dans la Figure 2.6 (Watson *et al.*, 2015). Par ailleurs, un sous-ensemble de tumeurs CRPC échappant à la thérapie par suppression androgénique via un autre mécanisme dans lequel les tumeurs deviennent moins dépendantes de la signalisation AR, c'est-à-dire indifférentes aux androgènes, sera également présenté (Vlachostergios *et al.*, 2017). La

compréhension de ces mécanismes responsables de la résistance aux hormonothérapies du CRPC est essentielle au développement de nouvelles thérapies.

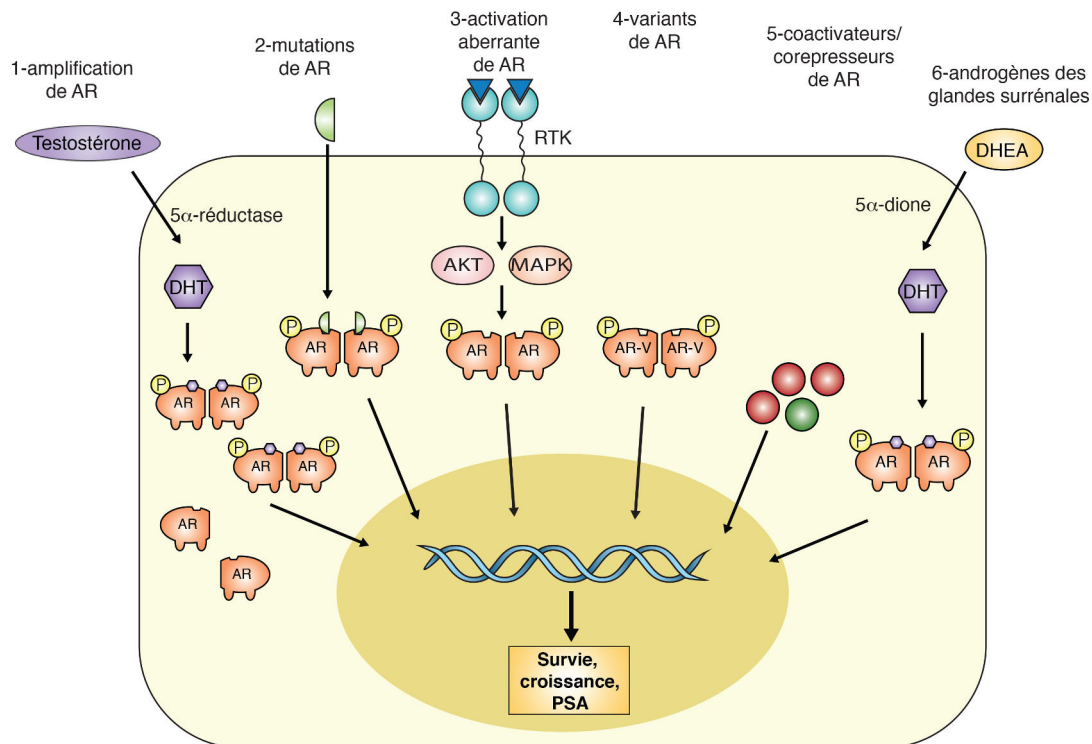


Figure 2.6 : Mécanismes de l'androgéno-indépendance
Adapté d'après (Chandrasekar *et al.*, 2015).

2.3.2.1 Amplification de AR et « Hypersensitivity pathway »

L'amplification de AR a été identifiée dans une partie significative des lignées cellulaires CRPC, allant de 30 à 80% (Liu *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2010). Elle permet au CRPC d'être hypersensible à des faibles niveaux d'androgènes persistants malgré la suppression androgénique, favorisant la progression de la maladie (Visakorpi *et al.*, 1995; Gregory *et al.*, 2001). Elle pourrait être due à une hyperprolifération sélective des cellules CRPC (Chen *et al.*, 2008).

2.3.2.2 Mutations de AR et « Promiscuous pathway »

Dans les CRPC, plusieurs mutations ponctuelles ont été identifiées sur le gène *AR* lui-même, conduisant à une augmentation de l'activité de AR en présence de faible dose d'androgènes produites par les glandes surrénales (Culig *et al.*, 1993), ou d'autres hormones

stéroïdiennes non androgéniques, telles que la progestérone (Taplin *et al.*, 1995), l'hydrocortisone (Zhao *et al.*, 2000), l'estradiol (Taplin *et al.*, 1995), mais également de certains antagonistes de AR, tels que la Flutamide et le Bicalutamide (Steinkamp *et al.*, 2009), convertis en agoniste via la mutation.

2.3.2.3 Activation aberrante de AR et « Outlaw pathway »

L'activation de AR, indépendamment de la présence du ligand, est également un mécanisme important de progression vers la résistance à la castration. Diverses études *in vitro* suggèrent que des facteurs de croissance, des cytokines, ou encore des voies de signalisation impliquant des kinases, augmentent la signalisation AR, favorisant ainsi la progression vers la résistance à la castration de manière indépendante du ligand (Wang *et al.*, 2009). Par exemple, les voies de signalisation PI3K-AKT (Phosphoinositide 3 Kinase-Protein Kinase B) ou Ras-Raf-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), hyperactives dans le cancer de la prostate, sont capables de phosphoryler AR, renforçant ainsi son activité transcriptionnelle en absence d'androgènes, ou en présence d'une faible quantité (Lu *et al.*, 2006; Xin *et al.*, 2006).

2.3.2.4 Activation constitutive de AR

Des variants d'épissage de AR (AR-V, Androgen Receptor-Variant) ont plus récemment été identifiés. Ils sont constitutivement actifs, souvent en raison de la perte de la partie codant le domaine LBD de fixation du ligand (Guo *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010a; Dehm and Tindall, 2011). Les variants d'épissage prédominants sont AR-V1, AR-V7 et AR-V567, parmi eux ARV7 a été le plus étudié. En effet, AR-V7 est le seul variant pour lequel un anticorps spécifique est disponible, ayant ainsi permis de mettre en évidence une expression accrue dans les CRPC (Guo *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2009). Il régule à la fois les gènes classiquement dépendants de AR, mais également un nouvel ensemble de gènes, classiquement indépendant de AR. Ceci montre que les AR-V peuvent avoir un rôle semblable, mais également distinct, par rapport à la forme pleine longueur de AR dans les cellules du cancer de la prostate (Hu *et al.*, 2009; Dehm and Tindall, 2011).

2.3.2.5 Co-activateurs et co-répresseurs de AR

Plus de 150 molécules différentes ont déjà été identifiées comme co-activateurs et co-répresseurs de AR (Heemers and Tindall, 2007). En condition physiologique, AR recrute une

série de complexes corégulateurs, pour renforcer (co-activateurs), ou pour réprimer (co-répresseurs) l'activité transcriptionnelle. Beaucoup de ces corégulateurs sont des enzymes qui servent à moduler d'autres protéines dans le complexe, par phosphorylation, méthylation, acétylation ou ubiquitylation, mais ils ont aussi été identifiés comme protéines chaperonnes, recruteurs de la machinerie transcriptionnelle et régulateurs d'épissage d'ARN (Hermanson *et al.*, 2002; Agoulnik and Weigel, 2008; Wolf *et al.*, 2008). Les protéines co-activatrices peuvent être surexprimées dans le CRPC, alors que les protéines co-répressives sont retrouvées à des niveaux réduits, ceci favorise l'activité transcriptionnelle et la croissance stimulées par les androgènes (Chandrasekar *et al.*, 2015).

2.3.2.6 Stéroïdogénèse alternative

Le CRPC se développe en présence de taux d'androgènes circulants réduit suite à la castration. Cependant, dans des modèles de CRPC, des taux intra-tumoraux d'androgènes identiques ou plus élevés que chez les hommes n'ayant pas subi de castration ont été observés, ce qui suggère une autre production d'androgènes (Montgomery *et al.*, 2008; Massie *et al.*, 2011; Kumagai *et al.*, 2013; Mostaghel, 2014). Ceci est probablement dû à la production surrénalienne de précurseurs androgéniques tels que la DHEA (déhydroépiandrostérone), qui peut être convertie en DHT hautement actif via une voie alternative. En effet, le DHEA produit par la glande surrénale n'est pas affecté par la suppression androgénique et est toujours retrouvé dans la circulation. Dans la voie biochimique de la production de testostérone, il est converti en androstènedione, puis en DHT via la testostérone ou la 5 α -dione en tant qu'intermédiaire en présence ou en absence d'un traitement supprimant les androgènes respectivement. Ainsi, lors de la suppression androgénique, il existe une voie alternative appelée 5 α -dione, permettant la conversion en DHT en contournant complètement la testostérone. Cette voie s'est avérée prédominante dans le CRPC (Chang *et al.*, 2011; Yepuru *et al.*, 2013).

2.3.2.7 Cas particulier du cancer de la prostate neuroendocrine

Récemment, un sous-ensemble de tumeurs CRPC échappant à la thérapie par suppression androgénique via un nouveau mécanisme d'indépendance de la signalisation AR et associé à l'acquisition de caractéristiques neuroendocrines a été décrit (Vlachostergios *et al.*, 2017). En effet, ce cancer de la prostate neuroendocrine (NEPC) possède les mêmes caractéristiques morphologiques que d'autres tumeurs neuroendocrines provenant d'autres

sites primaires, telles que la présence de petites cellules avec un aspect granuleux « poivre et sel » de la chromatine et une absence de nucléole. Ainsi, son diagnostic est défini de manière histologique. Apparaissant rarement *de novo*, le NEPC représente moins de 2% des patients au moment du diagnostic du cancer de la prostate, mais représente 10 à 20% des patients CRPC (Nadal *et al.*, 2014; Parimi *et al.*, 2014). Cliniquement, il est souvent suspecté chez des patients qui progressent avec des taux de PSA restant faibles à modérés, suggérant moins de dépendance de AR, et une prédominance de métastases viscérales et/ou osseuses lytiques.

En outre, le NEPC peut également posséder des caractéristiques mixtes ou superposées avec un adénocarcinome de la prostate. Récemment, une étude a montré que les NEPC résistants à la castration et les adénocarcinomes CRPC ont des profils d'altérations génomiques largement similaires, suggérant une évolution clonale du NEPC à partir d'un précurseur d'adénocarcinome (Beltran *et al.*, 2016). Cependant, des différences épigénétiques ont été mises en évidence entre ces deux types de CRPC, notamment de méthylation des îlots CpG, suggérant un rôle important de l'épigénome dans la modulation du phénotype du NEPC (Beltran *et al.*, 2016). De manière intéressante, dans le cas du NEPC (n'exprimant donc pas AR) possédant le réarrangement chromosomique TMPRSS2:ERG dont l'expression est dépendante de AR (voir section 4.3 de l'introduction), la perte de la surexpression androgéno-dépendante de ERG entraîne une augmentation de la dédifférenciation, de la prolifération, de la résistance aux thérapies ciblant AR, et du phénotype NEPC (Mounir *et al.*, 2015).

2.4 Altérations génomiques du cancer de la prostate

Afin de comprendre les mécanismes de la tumorigenèse, il faut comprendre comment les cellules tumorales sont capables d'échapper aux différents mécanismes de contrôle, et ainsi d'acquérir un avantage de prolifération et de survie. L'émergence de nouvelles technologies expérimentales ont permis une avancée rapide de la compréhension des bases moléculaires du cancer de la prostate et ont révélé une importante hétérogénéité génétique, pouvant être à l'origine de l'hétérogénéité et du comportement cliniquement variable de la maladie. La compréhension de ces mécanismes, impliqués dès l'initiation du cancer ainsi que dans sa progression, a permis de mettre au point de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques.

Ainsi, de nombreux gènes voient leur expression ou leur activité fréquemment dérégulées dans les cas de cancer de la prostate (Khemlina *et al.*, 2015). Les altérations génomiques les plus fréquentes sont présentées dans le Tableau 2.7.

Tableau 2.7 : Principales altérations génomiques des cancer de la prostate

Adapté d'après (Khemlina *et al.*, 2015).

Gène	Fonction	Aberration et fréquence
<i>TMPRSS2:ETS</i>	Facteur de transcription androgéno-dépendant Rôle critique dans la progression du cancer de la prostate	Gène de fusion : 50-79%
<i>AR</i>	Récepteur nucléaire/Facteur de transcription dépendant de la fixation de son ligand Contrôle l'expression de gènes spécifiques ayant un rôle dans la survie et la croissance	Mutation : 2-18% Amplification : 5-52% (stade précoce 0-5% ; castration résistant 20-52%)
<i>P53</i>	Gène suppresseur de tumeur/Facteur de transcription Contrôle l'expression de gènes spécifiques ayant un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence et la réparation de l'ADN	Mutation : 3-47% Perte : 2-15%
<i>PTEN</i>	Gène suppresseur de tumeur Régule négativement la voie de signalisation intracellulaire PI3K-AKT ayant un rôle dans la survie, la prolifération et le métabolisme	Mutation : 2-14% Perte : 12-41%
<i>MYC</i>	Facteur de transcription Contrôle l'expression de gènes spécifiques ayant un rôle dans le cycle cellulaire, l'apoptose et la transformation cellulaire	Amplification : 2-20%
<i>RBI</i>	Gène suppresseur de tumeur Régulateur clé de l'entrée dans le cycle cellulaire	Mutation : 1-14% Perte : 5-23%

Parmi les altérations génomiques du cancer de la prostate, la présence des gènes de fusion *TMPRSS2:ETS* est la plus fréquemment retrouvée, plus particulièrement du gène de fusion *TMPRSS2:ERG*, issu d'une délétion de la région chromosomique entre les locus des gènes *TMPRSS2* (*Transmembrane Protease, Serine 2*) et *ERG* (*ETS-Related Gene*), qui sera décrit dans la section 4 de l'introduction. Nous évoquerons également dans cette section les interactions entre les différentes altérations génomiques, pouvant agir en synergie avec le gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans la progression du cancer de la prostate.

3. METASTASES OSSEUSES ASSOCIEES AU CANCER DE LA PROSTATE

Les cancers avancés sont susceptibles d'évoluer vers la formation de métastases (Gupta and Massague, 2006; Steeg, 2006; Eccles and Welch, 2007). Bien que les cellules métastatiques puissent théoriquement interférer avec n'importe quel organe, elles ont besoin de caractéristiques particulières qui leur permettent de croître dans des organes éloignés, et le microenvironnement spécifique de ces organes est essentiel au développement de métastases. En effet, dès 1889, le docteur Stephen Paget proposait déjà une théorie sur les métastases dite « seed and soil », selon laquelle l'organe touché par la métastase, le sol ou « soil », favorise la survie et la croissance de la cellule tumorale, la graine ou « seed » (Paget, 1889; Fidler, 2003). Parallèlement, l'expérience clinique démontre que les cellules métastatiques ont une préférence pour certains organes, tels que le poumon, le foie, l'os, le cerveau ou encore la glande surrénale. Ces microenvironnements métastatiques exercent des fonctions spécifiques et uniques, qui favorisent ou s'opposent à la colonisation par les cellules métastatiques (Fidler and Kripke, 2015).

Chez les patients atteints de cancer de la prostate avancé, le squelette est le site le plus fréquent de métastases, avec une incidence d'environ 80% (Coleman, 2006). Même si les patients atteints de métastases osseuses peuvent survivre jusqu'à 10 ans ou plus, l'établissement de ces métastases est une cause importante de morbidité, entraînant souvent des douleurs osseuses, des compressions de la moelle épinière, une hypercalcémie et des fractures pathologiques (Coleman, 2006). Les métastases osseuses peuvent être de trois types : ostéolytiques, caractérisées par une résorption osseuse due à une activité accrue des ostéoclastes qui résorbent l'os, ostéocondensantes, caractérisées par une augmentation de la densité osseuse due à une activité accrue des ostéoblastes qui forment l'os, et mixtes, ostéocondensantes et ostéolytiques (Figure 3.1). Ainsi, l'équilibre entre les activités des ostéoblastes et des ostéoclastes détermine le phénotype des lésions osseuses. Bien que la plupart des métastases osseuses du cancer de la prostate aient été classées comme ostéocondensantes, contrairement à celles du cancer du sein majoritairement ostéolytiques, la résorption et la formation osseuse sont toutes les deux dérégulées (Mundy, 2002; Roudier *et al.*, 2003; Roodman, 2004; Logothetis and Lin, 2005).

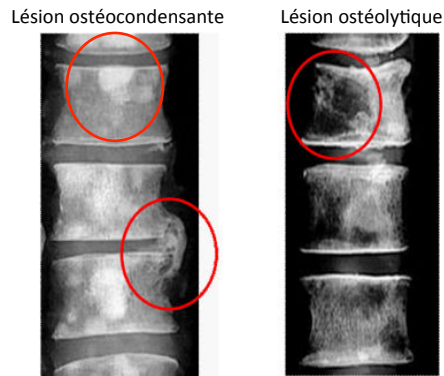


Figure 3.1 : Radiographie des deux types de métastases osseuses chez l'homme

Les métastases osseuses peuvent être classées en ostéocondensantes, c'est-à-dire qu'il y a une formation osseuse (cas du cancer de la prostate), et ostéolytiques, c'est-à-dire qu'il y a une résorption osseuse (cas des cancers du sein, du poumon ou du myélome). Il existe également des métastases osseuses mixtes, à la fois ostéocondensantes et ostéolytiques.

Pour la formation de métastases, la dissémination des cellules tumorales à partir du site primaire de croissance tumorale est nécessaire. Cependant, peu de ces cellules survivent et se développent dans des organes à distance car l'apparition de métastases est un processus complexe comprenant de nombreuses étapes.

3.1 Métastases osseuses : un processus multi-étapes

Pour que les cellules tumorales prostatiques puissent migrer vers l'os et s'y établir, elles doivent franchir plusieurs étapes précoces essentielles dont la mise en place d'un réseau vasculaire, la perte de propriétés adhésives et l'acquisition de propriétés invasives leur permettant ainsi de quitter le site initial et de pénétrer dans la circulation par intravasation (Figure 3.2). On parle alors de cellules tumorales circulantes (CTC). Pour quitter le site primaire et survivre dans la circulation, les cellules tumorales subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Celle-ci se définit d'une part, par la perte de marqueurs épithélias tels que la E-cadhérine et la β -caténine, responsables des jonctions cellule-cellule, conduisant à une perte des propriétés adhésives, et d'autre part, par le gain de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine et la vimentine, responsables d'un réarrangement du cytosquelette et de la formation de lamellipodes, permettant ainsi aux cellules tumorales d'acquies des propriétés invasives (Kan *et al.*, 2016). Certaines CTC sont capables de survivre et de transiter dans la circulation, avant de quitter le réseau vasculaire par extravasation pour pénétrer le tissu cible. De manière intéressante, les CTC prostatiques adhèrent préférentiellement aux cellules endothéliales des vaisseaux de la moelle osseuse,

constituant un premier événement clé dans la colonisation du microenvironnement osseux (Lehr and Pienta, 1998).

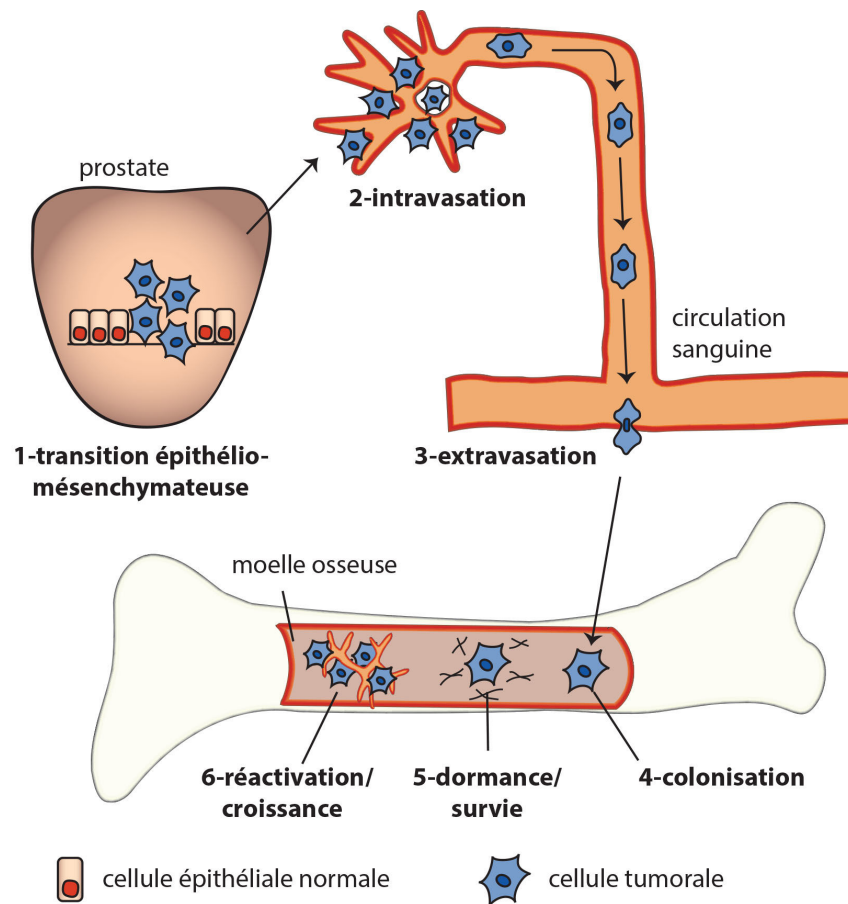


Figure 3.2 : Processus multi-étapes de développement des métastases osseuses

Une fois dans le squelette, les cellules tumorales doivent être capables d'interagir avec le microenvironnement. Ainsi, le processus de développement de métastases se poursuit par (1) la colonisation, lorsque les CTC pénètrent dans le compartiment de la moelle osseuse et s'engagent dans un microenvironnement spécifique. Elles deviennent ainsi des cellules tumorales disséminées (DTC). La deuxième étape implique (2) la dormance et la survie des DTC, s'adaptant à leur nouveau microenvironnement, évitant le système immunitaire, et résidant dans un état dormant pendant de longues périodes pouvant aller jusqu'à plus d'une dizaine d'années. La troisième et dernière étape de (3) réactivation et croissance nécessite une capacité à s'échapper de l'état dormant pour proliférer activement et former des lésions osseuses, obtenues par amplification paracrine réciproque et communication entre les cellules tumorales et les cellules osseuses, ostéoblastes et ostéoclastes (Figure 3.2) (Ibrahim *et al.*, 2010; Croucher *et al.*, 2016).

3.1.1 Colonisation de l'os par les cellules tumorales circulantes

Le succès de la colonisation des cellules tumorales lors de leur établissement dans l'os est probablement déterminé par leurs propriétés intrinsèques mais également par des caractéristiques acquises, régies respectivement par le microenvironnement des tumeurs primaires ou le microenvironnement osseux lointain (Croucher *et al.*, 2016). Les cellules tumorales migrent de la tumeur primaire vers l'os par chimiotactisme en réponse à différents stimuli, c'est l'ostéotropisme. Ainsi, la première étape d'engagement se produit lorsque les cellules tumorales utilisent un profil de récepteurs et de molécules d'adhésion pour localiser et adhérer aux cellules du microenvironnement osseux (Tableau 3.1) (Croucher *et al.*, 2016; Kan *et al.*, 2016). Ce mécanisme est semblable à celui utilisé par les cellules souches hématopoïétiques (HSC) pour migrer vers l'os.

Les principales molécules impliquées dans la migration des cellules tumorales sont les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CXCR6 (Chemokine C-X-C motif Receptor 4 et 6), et leurs ligands respectifs, les chimiokines CXCL12 et CXCL16 (Chemokine C-X-C motif Ligand 12 et 16). Dans les cellules épithéliales de la prostate, CXCR4 et CXCR6 ne sont pas exprimés, mais leurs taux d'expression sont significativement plus élevés dans les cellules cancéreuses invasives (Sun *et al.*, 2003; Ha *et al.*, 2011).

L'expression du récepteur CXCR4 facilite le chimiotactisme et l'invasion des cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques, le poumon et l'os, où son ligand, la chimiokine CXCL12, est produit en grande quantité (Taichman *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2010b). Dans l'os, CXCR4 se lie à CXCL12 qui est exprimée par les cellules mésenchymateuses adjacentes à la surface osseuse, ou par les péricytes (Loibl *et al.*, 2014; Correa *et al.*, 2016). L'utilisation d'un inhibiteur de CXCR4 dans les cellules tumorales prostatiques diminue leur dissémination dans le poumon et l'os, et, de manière intéressante, augmente leur sensibilité aux agents chimiothérapeutiques en les libérant du contrôle par le microenvironnement osseux (Sun *et al.*, 2005; Domanska *et al.*, 2012).

La chimiokine CXCL16 est exprimée *in vivo* dans le tissu osseux, notamment via les ostéocytes, et agit comme un agent chimiotactique *in vitro*, pour permettre la migration des cellules tumorales prostatiques exprimant CXCR6, favorisant ainsi la formation de métastases osseuses (Hu *et al.*, 2008a). De plus, lors des étapes initiales permettant aux cellules tumorales de quitter le site primaire et d'entrer dans la circulation, l'expression de CXCL16 par les cellules tumorales prostatiques favorise le recrutement de cellules souches

mésenchymateuses dans la tumeur primaire, contrôle leur différenciation en CAF (cancer associated fibroblast), induit l'EMT, et favorise la métastase osseuse (Jung *et al.*, 2013).

Cependant, l'inhibition des récepteurs de chimiokines *in vivo* ne bloque que partiellement la formation de métastases, suggérant que des facteurs supplémentaires sont impliqués dans le tropisme osseux des cellules tumorales (Cleardin and Teti, 2007).

Le ligand RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) est produit par les ostéoblastes dans l'os et interagit avec son récepteur spécifique RANK (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B) notamment présent à la surface des ostéoclastes. La voie RANK/RANKL joue un rôle clé dans la différenciation et la survie des ostéoclastes (Edwards and Mundy, 2011). Le récepteur RANK est exprimé dans plusieurs lignées de cellules tumorales prostatiques et le traitement de ces cellules tumorales avec un RANKL recombinant déclenche la migration vers l'os *in vitro*, alors que l'utilisation de l'OPG (osteoprotégerin), un inhibiteur naturel de l'interaction RANK/RANKL agissant comme un récepteur leurre en se liant au RANKL, bloque le tropisme osseux et l'établissement de métastases osseuses *in vivo* (Jones *et al.*, 2006; Boyce and Xing, 2008). Les ostéocytes sont également une source majeure de RANKL à l'âge adulte, contribuant ainsi également à la formation des métastases osseuses en favorisant la colonisation des cellules tumorales dans la moelle osseuse (Ikeda *et al.*, 2001; Nakashima *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2011).

Les intégrines, médiateurs importants de l'ancrage des HSC et des cellules tumorales, se lient à plusieurs facteurs de la matrice osseuse et sont impliquées dans l'adhésion, la migration et l'invasion de l'os. La colonisation osseuse par les cellules tumorales prostatiques impliquent actuellement deux intégrines : $\alpha 2\beta 1$, se liant au COL1 (Collagen Type 1), et $\alpha \nu\beta 3$, se liant à BSP (Bone Sialoprotein), OPN (Osteopontin) et VTN (Vitronectin) exprimées par les cellules de la lignée ostéoblastique (Cooper *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2006). De plus, l'interaction CXCR4/CXCR12 augmente l'expression de l'intégrine $\alpha \nu\beta 3$, suggérant que ces intégrines pourraient agir simultanément avec CXCR4, mais également RANKL, pour favoriser la colonisation osseuse par les cellules tumorales (Sun *et al.*, 2005; Cleardin and Teti, 2007; Sun *et al.*, 2007).

Les ostéoblastes et les cellules tumorales prostatiques expriment également ANXA2 (Annexin A2) et son récepteur ANXA2R (Annexin A2 Receptor), respectivement, ce qui

favorise le tropisme et l'adhésion des cellules tumorales aux ostéoblastes dans l'os. Ces effets sont limités par l'utilisation d'un anticorps bloquant ANXA2 (Shiozawa *et al.*, 2008).

La protéine CDH11 (Cadherin 11) est une cadhérine mésenchymateuse, principalement exprimée par les ostéoblastes, et surexprimée dans les métastases osseuses du cancer de la prostate, mais pas dans le tissu prostatique normal ou le cancer non métastatique (Chu *et al.*, 2008). L'appauvrissement en androgènes est un des mécanismes qui conduit à la surexpression de CDH11 dans le cancer de la prostate (Lee *et al.*, 2010). CDH11 favorise la formation de métastases osseuses du cancer de la prostate en augmentant la colonisation des cellules tumorales prostatiques dans l'os *in vivo*. Elle permet aux cellules tumorales de migrer, et d'envahir le microenvironnement osseux en fournissant une liaison physique entre les cellules tumorales et les ostéoblastes (Huang *et al.*, 2010).

En plus des interactions physiques entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement osseux ou la matrice osseuse elle-même comme précédemment décrites, il existe des échanges de facteurs de la matrice osseuse, libérés au cours du remodelage osseux normal, et affectant la localisation et la croissance tumorale (Weilbaecher *et al.*, 2011). Ainsi, le calcium, abondant dans la matrice osseuse, a un effet sur les cellules tumorales prostatiques. Celles-ci expriment CaSR (Calcium-Sensing Receptor) et répondent au calcium ionisé Ca^{++} , susceptible d'entraîner, comme dans le cas de l'ostéosarcome, une inhibition de l'apoptose et une stimulation de la prolifération (Yamaguchi *et al.*, 2001). D'ailleurs, une inactivation du récepteur CaSR dans les cellules tumorales prostatiques réduit la localisation tumorale à l'os (Liao *et al.*, 2006). De plus, comme cela a été décrit dans le cas du cancer du sein, le calcium ionisé peut également conduire à une augmentation de la sécrétion de la protéine PTHrP (Parathyroid-Hormone-related Protein) par les cellules tumorales et ainsi induire une nouvelle résorption osseuse et une libération de calcium, pouvant à nouveau agir via la fixation à son récepteur CaSR, créant ainsi un cercle vicieux (Mundy, 2002; Yano *et al.*, 2004; Mamillapalli *et al.*, 2008).

Tableau 3.1 : Liste des protéines clés impliquées dans la colonisation de l'os par les cellules tumorales prostatiques disséminées

Protéine	Description	Référence
CXCR4/CXCL12	La migration des cellules tumorales exprimant CXCR4 dans l'os est médiée par CXCL12 dérivé des ostéoblastes.	(Sun <i>et al.</i> , 2010b)
CXCR6/CXCL16	CXCL16 est exprimé dans le tissu osseux et favorise la migration <i>in vitro</i> des cellules tumorales exprimant CXCR6.	(Hu <i>et al.</i> , 2008a)
RANK/RANKL	L'axe RANK/RANKL favorise la migration des cellules tumorales en modulant un réarrangement du cytosquelette <i>in vitro</i> .	(Jones <i>et al.</i> , 2006)
Intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$	Les cellules tumorales exprimant les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ ont la capacité de se lier aux protéines extracellulaires osseuses COL1, BSP, OPN et VTN.	(Cooper <i>et al.</i> , 2002; Hall <i>et al.</i> , 2006)
ANXA2R/ANXA2	ANXA2 produite par les cellules ostéoblastiques et endothéliales favorise la migration et l'adhésion des cellules tumorales exprimant ANXA2R.	(Shiozawa <i>et al.</i> , 2008)
CDH11/CDH11	CDH11 exprimée par les cellules tumorales interagit avec CDH11 des ostéoblastes et favorise la migration et l'invasion des cellules tumorales.	(Huang <i>et al.</i> , 2010)
CaSR/Ca⁺⁺	Le Ca ⁺⁺ provenant du remodelage osseux stimule la migration des cellules cancéreuses exprimant CaSR.	(Liao <i>et al.</i> , 2008)

De manière intéressante, une nouvelle théorie émerge actuellement, selon laquelle les cellules tumorales, la graine ou « seed », pourraient influencer l'organe touché par la métastase, le sol ou « soil », bien avant leur arrivée, en envoyant des vésicules extracellulaires capables de préparer la voie à une métastase spécifique d'un organe. En effet, les exosomes tumoraux, de petites vésicules extracellulaires de 30 à 100nm exprimant des intégrines à leur surface, ont récemment été impliqués dans la détermination de l'organotropisme des métastases, c'est-à-dire le choix de l'organe où se développe la métastase (Hoshino *et al.*, 2015). Ils contiennent des biomolécules fonctionnelles, dont des protéines, des acides nucléiques et des lipides, pouvant être transférées d'une cellule à une autre, et parcourant des distances considérables via les fluides corporels ou sanguins (Colombo *et al.*, 2014). Ces dernières années, ils ont été décrits comme capables de favoriser la progression tumorale (Liu *et al.*, 2015). Plus précisément, cette étude montre que les intégrines présentes à la surface des exosomes tumoraux (mammaires ou pancréatiques) peuvent déterminer les métastases organotropes (pulmonaires ou hépatiques) en fusionnant avec des cellules résidentes spécifiques d'un organe, afin d'établir une niche pré-métastatique (Hoshino *et al.*, 2015). La niche pré-métastatique décrit le phénomène selon lequel la tumeur primaire pourrait promouvoir ses propres métastases en recrutant des cellules dérivées de la moelle osseuse dans l'organe lointain et en établissant des environnements métastatiques de soutien (Kaplan *et al.*, 2005). Ce terme sera repris dans la partie suivante.

3.1.2 Dormance et survie des cellules tumorales disséminées dans l'os

Les métastases osseuses peuvent se développer plusieurs années après l'ablation chirurgicale de la tumeur primaire, suggérant que les DTC peuvent avoir une longue période de quiescence avant de développer des lésions secondaires (Clezardin and Teti, 2007; Croucher *et al.*, 2016). Ces DTC ont été identifiées dans la moelle osseuse de patients atteints de cancer de la prostate dès les premiers stades de la maladie ainsi que dans 90% des stades avancés, et leur présence est associée à un mauvais pronostic (Croucher *et al.*, 2016; Kan *et al.*, 2016). Après avoir colonisé le squelette, la seconde étape se produit lorsque les cellules du microenvironnement osseux, appelé niche, régulent le phénotype des DTC pour induire la dormance, leur permettant ainsi de s'adapter et de survivre dans l'environnement osseux, et fournissent une protection contre le système immunitaire et les différentes thérapies (Croucher *et al.*, 2016; Kan *et al.*, 2016).

Dans le squelette, il existe deux niches distinctes, régulatrices du comportement des cellules souches dans la moelle osseuse. En effet, les HSC quiescentes sont enrichies dans la niche endostéale bordant la surface osseuse, tandis que la niche vasculaire oxygénée stimule leur prolifération et leur différenciation (Figure 3.3) (Ehninger and Trumpp, 2011). Dans la niche endostéale, la quiescence des HSC peut être régulée par certaines cellules de la lignée des ostéoblastes, comprenant les ostéoprogéniteurs, les pré-ostéoblastes, les ostéoblastes, mais également les ostéocytes et les cellules bordantes, dérivant toutes deux des ostéoblastes ayant remplis leur fonction de formation osseuse. Cependant, la nature exacte de ces cellules ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la niche restent encore à définir (Askmyr *et al.*, 2009; Bianco, 2011). La majorité de la région endostéale est recouverte de cellules bordantes. Abondantes et relativement quiescentes, ces cellules ont une longue durée de vie et sont ainsi de bonnes candidates pour maintenir les HSC et les cellules tumorales dormantes. Une population particulière d'ostéoblastes est également présente à la surface endostéale, les SNO (Spindle-shaped N-cadherin⁺ CD45⁻ osteoblast), pour lesquels les HSC ont un tropisme particulier (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Ces SNO ont la capacité de maintenir les HSC quiescentes, et pourraient donc également supporter la dormance des cellules tumorales. Ainsi, les cellules présentes à la surface endostéale osseuse peuvent fournir un microenvironnement ou niche spécifique, permettant d'induire la quiescence des HSC, et pouvant également potentiellement réguler la dormance des DTC.

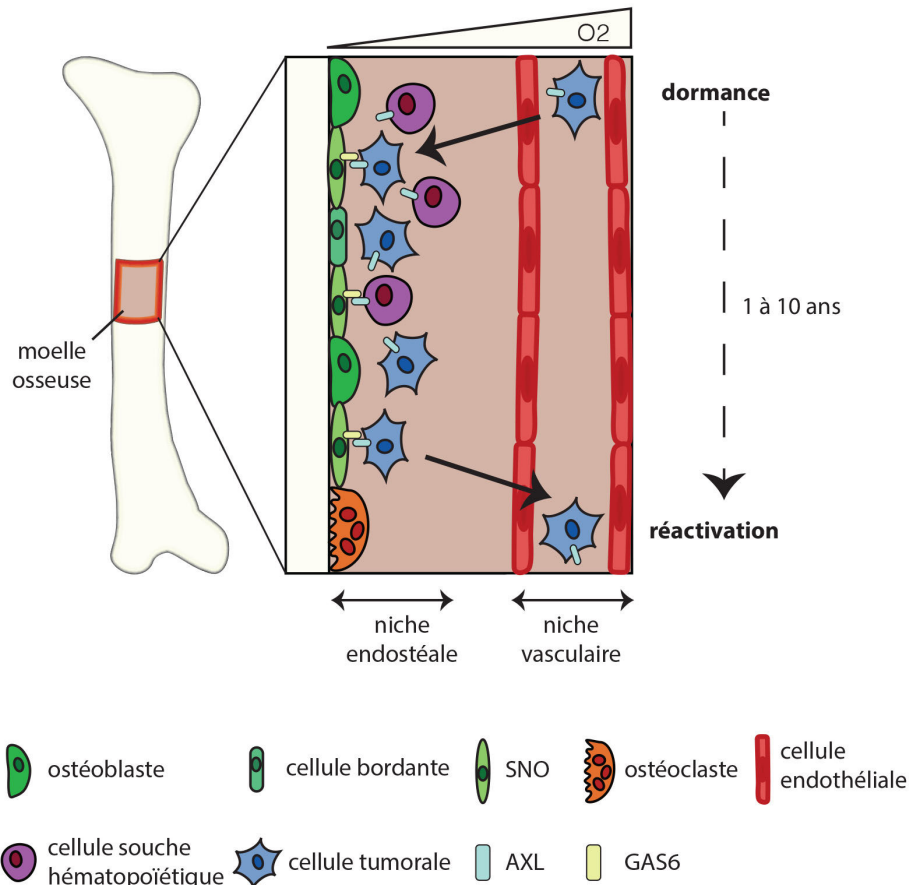


Figure 3.3 : Dormance et réactivation des cellules tumorales prostatiques disséminées dans l'os

Il n'est pas encore clair si les DTC maintiennent leur état dormant au sein d'une niche pré-métastatique qui leur est spécifique, ou si elles occupent une niche préexistante, notamment celle des HSC. Ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives. Des études montrent que les DTC dormantes se localisent dans des niches contenant des cellules de la lignée des ostéoblastes, qui favorisent la survie et contrôlent la dormance à long terme, et que ces niches seraient identiques à la niche endostéale occupée par les HSC quiescentes (Shiozawa *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015). En fait, les DTC exprimant CXCR4 entrent en compétition avec les HSC pour le maintien dans un état dormant au niveau de la niche endostéale (Figure 3.3) (Shiozawa *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014a). Ainsi, bien que les signaux qui favorisent la dormance restent à définir, les cellules de la lignée des ostéoblastes expriment des facteurs qui pourraient y contribuer.

Les ostéoblastes et les cellules tumorales prostatiques expriment respectivement ANXA2 et son récepteur ANXA2R, et l'interaction entre les deux contrôle la croissance tumorale (Shiozawa *et al.*, 2008). La liaison des cellules tumorales prostatiques à l'ANXA2

des ostéoblastes induit l'expression des récepteurs membranaires de la protéine GAS6 (Growth-Arrest Specific protein 6), AXL, SKY et MER qui, dans le système hématopoiétique, induisent la dormance (Shiozawa *et al.*, 2010). L'équilibre entre la production de GAS6 par les ostéoblastes, et l'expression de ces récepteurs par les cellules tumorales prostatiques, notamment une forte expression de AXL, est important pour empêcher la prolifération et contrôler la dormance des cellules tumorales, et protège également ces cellules de l'apoptose induite par la chimiothérapie (Shiozawa *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2012; Taichman *et al.*, 2013). Ce mécanisme est semblable à celui du maintien de la quiescence des HSC. De manière intéressante, le récepteur AXL est stabilisé par l'hypoxie, et les cellules tumorales se développent généralement dans la région métaphysaire de l'os long, normoxique, alors que la région diaphysaire, plus hypoxique, est moins susceptible de développer des métastases (Kusumbe *et al.*, 2014). D'ailleurs, dans un environnement hypoxique tel que le microenvironnement osseux, la masse tumorale semble limitée par l'absence de vascularisation suffisante (Sosa *et al.*, 2014).

Cependant, des DTC dormantes ont également été retrouvées à proximité de la niche périvasculaire (Ghajar, 2015). Ainsi, la surface endostéale et les cellules de la lignée ostéoblastique sont importantes pour la colonisation de l'os par les cellules tumorales et peuvent contrôler la dormance, mais l'identité spécifique des cellules constituant la niche des DTC reste à déterminer. Il pourrait s'agir de cellules de la lignée ostéoblastique comme précédemment décrites, mais également d'autres cellules présentes dans le microenvironnement osseux (Anthony and Link, 2014). La longue période de latence associée à la formation de métastases osseuses suggère que la niche maintenant la dormance est un microenvironnement stable, qui ne subit pas de changements à court terme (Croucher *et al.*, 2016). Cette hypothèse semble confirmée par le fait que, dans le cancer du sein, une microvasculature osseuse stable maintient une niche dormante en favorisant la quiescence des cellules tumorales, alors qu'une microvasculature germinative active les cellules dormantes (Ghajar *et al.*, 2013). Ainsi, les ostéoblastes différenciés et actifs, formant de l'os, semblent moins aptes à favoriser la dormance tumorale. En effet, la formation osseuse est un processus intervenant sur plusieurs mois, et non des années, et ces cellules subissent des changements durant cette courte période, elles perdent leur capacité à former de l'os, et deviennent des cellules bordantes, des ostéocytes, ou meurent par apoptose. Ces changements pourraient modifier la niche des DTC et réactiver les cellules dormantes. En revanche, les cellules en état

de quiescence à long-terme, telles que les cellules bordantes de la surface osseuse, semblent mieux placées pour supporter la dormance tumorale à long terme.

3.1.3 Croissance des cellules tumorales disséminées et formation de lésions osseuses

La dernière étape est la libération des DTC de la niche, suivie de leur prolifération active pour former une métastase. Cependant, la compréhension du phénomène de réactivation des DTC, échappant au contrôle de la niche, est limitée, et la libération sélective de certaines cellules dormantes suggèrent une régulation complexe (Figure 3.3) (Lawson *et al.*, 2015). Ce phénomène pourrait d'une part être contrôlé par les cellules tumorales elles mêmes, de manière intrinsèque (Giancotti, 2013). En effet, seule une faible proportion de cellules seront réactivées et échapperont à la dormance. Ces cellules, présentant de nombreuses caractéristiques de cellules souches cancéreuses, seront capables d'initier des métastases. Ceci suggère une hétérogénéité dans la population de cellules dormantes. D'autre part, il pourrait également être contrôlé par des cellules non tumorales, de manière extrinsèque. Cela nécessiterait des changements du microenvironnement local, entraînant l'élimination des signaux qui maintiennent les cellules dans un état dormant. Ces deux modèles pourraient fonctionner indépendamment ou simultanément, avec un nombre limité de cellules tumorales conservant la capacité à être réactivée, et des cellules non tumorales du microenvironnement osseux capable d'éliminer les signaux inhibiteurs.

Les cellules osseuses semblent réguler le comportement des cellules tumorales et possèdent ainsi la capacité de les libérer de leur état de dormance dans la niche. Plus précisément, les ostéoclastes pourraient jouer ce rôle. En effet, une inhibition de la résorption osseuse par l'OPG ou les bisphosphonates réduit la charge tumorale, suggérant un rôle des ostéoclastes dans la réactivation de la croissance tumorale dans l'os (Corey *et al.*, 2003a; Kiefer *et al.*, 2004; Corey *et al.*, 2005). De plus, une carence en vitamine D ou la castration chez la souris, connues pour augmenter le renouvellement osseux, accélèrent le développement tumoral dans le squelette (Zheng *et al.*, 2011; Ottewell *et al.*, 2014; Croucher *et al.*, 2015). Il existe d'autres preuves dans le cancer du sein et le myélome suggérant que les ostéoclastes, en remodelant la niche endostéale, peuvent libérer les cellules dormantes et les réactiver pour former des lésions osseuses (Croucher *et al.*, 2016). Ainsi, le remodelage osseux et la résorption ostéoclastique augmentent la croissance tumorale en libérant les DTC

de la dormance dans la niche, mais les mécanismes responsables ne sont pas encore clairement définis.

Une fois réactivées, les cellules tumorales vont influencer le microenvironnement osseux pour permettre la formation de métastases ostéocondensantes et établir un cercle vicieux avec les cellules osseuses et la matrice osseuse.

3.1.3.1 Influence des cellules tumorales disséminées sur le microenvironnement osseux

L'acquisition d'un phénotype semblable aux cellules osseuses et permettant aux cellules tumorales prostatiques de se propager, de survivre, puis de proliférer dans la moelle osseuse est appelée ostéomimétisme (Koeneman *et al.*, 1999; Clezardin and Teti, 2007). Par exemple, les protéines de la matrice osseuse telles que OPN, OCN (Osteocalcin), et BSP sont fréquemment très exprimées dans les cellules tumorales prostatiques (Huang *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2007). Plus particulièrement, ces cellules possèdent une signature moléculaire comprenant des gènes impliqués dans le développement et le remodelage osseux normaux (Tableau 3.2). Ces facteurs sont impliqués dans les lésions ostéocondensantes, soit en affectant directement la fonction des ostéoblastes, soit en influençant indirectement la formation osseuse par modification de la matrice osseuse ou du microenvironnement. Les cellules tumorales pourraient posséder ce phénotype ostéomimétique dès leur détachement du site primaire, ou alors acquérir certaines caractéristiques à leur arrivée dans la moelle osseuse.

Tableau 3.2 : Molécules produites par les cellules tumorales prostatiques impliquées dans la formation de la métastase osseuse

Facteur	Cible	Effet	Référence
BMP	Ostéoblaste	Stimule la prolifération, l'activité et la survie (via le facteur de transcription RUNX2)	Virk and Lieberman, Arth Res and Therapy, 2007
FGF	Ostéoblaste	Stimule la différenciation et la prolifération	Valta, Endocrinology, 2006
IGF	Ostéoblaste	Stimule la prolifération et la survie	Fizazi, Clin Cancer res, 2003
IL-6	Ostéoblaste	Régule la fonction	Shariat, Urology, 2001
MDA-BF-1	Ostéoblaste	Stimule la formation et l'activation	Vakar-Lopez, J Pathol, 2004
PSA	Ostéoblaste	Stimule la prolifération (via le clivage de PTHrP)	Cramer, J Urol, 1996
PTHrP	Ostéoblaste	Stimule la prolifération (via ETAR car homologie de séquence entre le peptide NH ₂ -terminal et ET-1)	Schluter, Br J Pharmacol, 2001
TGFβ	Ostéoblaste	Stimule la prolifération	Shariat, J Clin Oncol, 2001
uPA	Ostéoblaste	Stimule la prolifération (hydrolyse IGFBP et augmente l'IGF libre)	Rabbani, biochem biophys res commun, 1990 Koutsilieris. 1994
PDGF	Ostéoblaste Cellule endothéliale	Stimule l'activité Stimule l'angiogenèse	Yi, Cancer Res, 2002 REF
VEGF	Ostéoblaste Cellule endothéliale	Stimule la différenciation Stimule l'angiogenèse	Kitagawa, Cancer Res, 2005 ; Dai, Cancer Res, 2004 Street. PNAS USA. 2002
ET-1	Ostéoblaste Ostéoclaste	Stimule la prolifération (via ETAR, DKK1 et Wnt) Inhibe la motilité	Nelson, World J Urol, 2005
Wnt	Ostéoblaste Ostéoclaste	Stimule la différenciation, la survie et l'activité Inhibe l'activité	Hall, J Cell Biochem, 2006
OPG	Ostéoclaste	Inhibe la formation et l'activité (via RANKL)	Corey, cancer Res, 2005

3.1.3.2 Notion de cercle vicieux dans les métastases osseuses du cancer de la prostate

Au cours de la formation des métastases ostéocondensantes, les interactions entre les cellules tumorales, les cellules osseuses et la matrice osseuse constituent un cercle vicieux (Figure 3.4) (Mundy, 2002; Logothetis and Lin, 2005; Clezardin and Teti, 2007; Ibrahim *et al.*, 2010).

Dans les premiers stades, les cellules tumorales prostatiques produisent des facteurs ostéogéniques, précédemment décrits, qui activent les ostéoblastes (Tableau 3.2). En réponse à ces facteurs ostéogéniques, les ostéoprogéniteurs se différencient en ostéoblastes qui forment alors une nouvelle matrice osseuse. Les ostéoblastes produisent des facteurs, tels que

IL-6 (Interleukin-6), MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2), capables de promouvoir la colonisation de l'os par les cellules tumorales prostatiques, ainsi que leur développement dans l'environnement osseux (Ottewell, 2016). La nouvelle matrice osseuse non minéralisée fournit un sol plus fertile pour les cellules tumorales prostatiques. Elle est enrichie en facteurs de croissance capables d'attirer ces cellules et de favoriser leur survie et leur prolifération dans l'environnement osseux. A leur tour, les cellules tumorales prostatiques produisent à nouveau des facteurs ostéogéniques pouvant activer les ostéoblastes.

Par ailleurs, en particulier au début du processus, les cellules tumorales et les ostéoblastes sécrètent également du RANKL pouvant activer les ostéoclastes. Ceci conduit à un certain niveau de résorption osseuse et génère ainsi plus d'espaces pour les lésions ostéocondensantes dominantes. De plus, le calcium et les facteurs de croissance, tels que TGF β et IGF (Insulin-like Growth Factor), libérés de la matrice osseuse au cours de la résorption osseuse peuvent également renforcer ce cercle vicieux en favorisant la prolifération continue des cellules tumorales prostatiques et des ostéoblastes (Ottewell, 2016).

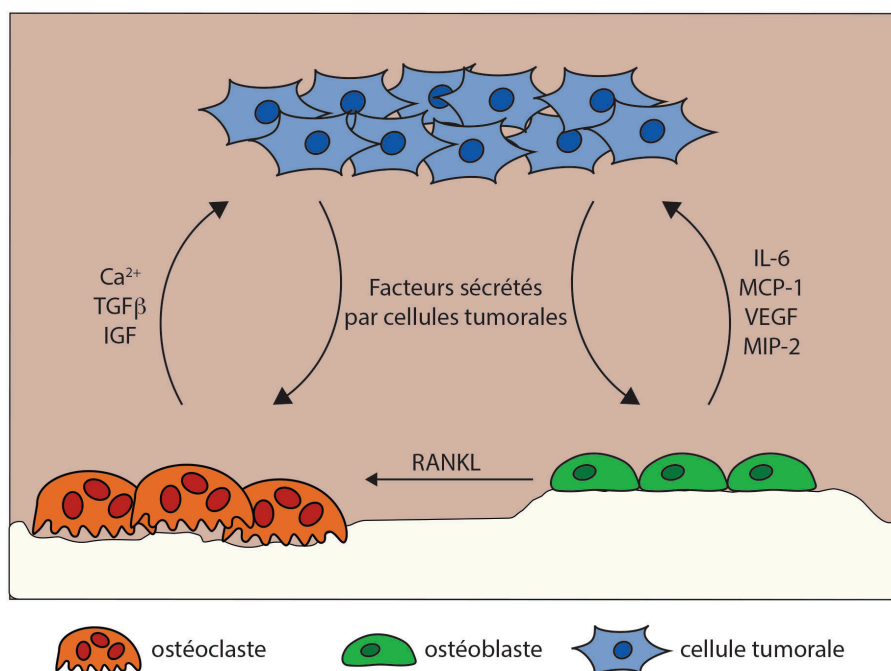


Figure 3.4 : Cercle vicieux dans les métastases osseuses du cancer de la prostate

3.2 Traitements des métastases osseuses

Les traitements efficaces contre les métastases osseuses ne sont pas encore disponibles. La chimiothérapie traditionnelle, comme le docétaxel, est moins efficace contre les métastases osseuses. Par ailleurs, la suppression androgénique peut bénéficier aux patients en réduisant leurs tumeurs primaires, mais ce traitement a été suggéré pour augmenter la fréquence des événements liés au squelette en favorisant l'ostéoclastogenèse, augmentant ainsi le remodelage osseux et la progression métastatique (Corey *et al.*, 2003b; Sternberg, 2008; Loria *et al.*, 2012). De plus, les thérapies à base d'ablation d'androgènes diminuent la densité globale de la masse osseuse, ce qui entraîne un risque accru de fracture, indépendamment de la métastase (Shahinian *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). Ainsi, les stratégies utilisées actuellement sont la stabilisation chirurgicale, la radiothérapie et les traitements anti-résorption osseuse.

Dans de nombreux cas de métastases osseuses, la chirurgie est utilisée pour stabiliser l'os et traiter les fractures pathologiques imminentes ou déplacées qui causent une morbidité importante et interrompent souvent les efforts de traitement en cours. Elle est efficace pour améliorer le contrôle de la douleur et la mobilité, et facilite les efforts consécutifs à l'emploi de radiothérapie et de chimiothérapie (Aboulafia *et al.*, 2007).

La radiothérapie est un traitement efficace de la métastase osseuse en terme de prévention des fractures imminentes, de maîtrise de la douleur, et de restauration de la fonction (Vakaet and Boterberg, 2004; Valkenburg and Williams, 2011). Dans de rares cas, elle peut avoir un effet curatif sur les lésions osseuses. Le radium 223, un isotope de radium à demi-vie courte de 11 jours et émetteur de particules alpha, est un nouveau radiopharmaceutique prometteur (Cheetham and Petrylak, 2012). Il est préférentiellement absorbé par l'os, en raison de sa ressemblance chimique avec le calcium, permettant de délivrer son rayonnement localement, et donc sans toxicité médullaire théorique. De plus, le rayonnement alpha a une portée très courte dans les tissus, autour de 2 à 10 cellules, par rapport aux rayonnements bêta ou gamma. Cela réduit les dommages aux tissus sains environnants, produisant un effet plus localisé que le strontium 89 par exemple, également utilisé pour traiter les métastases osseuses du cancer de la prostate (Henriksen *et al.*, 2003). Une amélioration de la survie est constatée pour les cancers prostatiques résistants au traitement par hormonothérapie, avec métastases osseuses (Parker *et al.*, 2013).

Actuellement, il existe deux traitements anti-résorption osseuse utilisés en clinique, les bisphosphonates et le denosumab. La théorie derrière cette stratégie de traitement est qu'en arrêtant la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes, le renouvellement osseux est arrêté, stoppant ainsi l'ostéolyse et diminuant la taille des métastases osseuses. En effet, comme décrit précédemment, la résorption osseuse ostéoclastique est impliquée dans la réactivation des DTC dormantes, mais elle participe également au cercle vicieux des métastases osseuses.

Les bisphosphonates sont largement utilisés comme traitement palliatif des métastases osseuses et d'autres maladies associées à la perte osseuse. Ils diminuent la morbidité squelettique, douleurs osseuses et fractures pathologiques, ce qui conduit à une amélioration de la qualité de vie mais, ils ne procurent pas un bénéfice prolongé aux patients atteints d'un cancer avancé (Dunstan *et al.*, 2007; Khosa *et al.*, 2007). Les bisphosphonates inhibent le renouvellement osseux en provoquant l'apoptose des ostéoclastes (Drake *et al.*, 2008). De plus, ils peuvent induire directement l'apoptose des cellules cancéreuses et inhiber l'expression génétique pro-ostéoclastique (Asahi *et al.*, 2006). Cependant, les bisphosphonates ont de lourds effets indésirables tels que l'insuffisance rénale et l'anaphylaxie pour les plus graves, ou encore l'ostéonécrose de la mâchoire et les fractures atypiques du fémur (Ibrahim *et al.*, 2003; Puhaindran *et al.*, 2011). L'acide zolédronique est le plus couramment utilisé et le plus puissant du marché (Li and Davis, 2003).

L'une des voies les plus étudiées ces dernières années, l'axe RANK/RANKL/OPG, a été préconisée comme cible thérapeutique potentielle car elle régit l'homéostasie osseuse, dans des conditions physiologiques normales et pendant la progression des métastases osseuses. Ainsi, la thérapie anti-RANKL ciblée évolue en tant que stratégie anti-résorption. Le denosumab est un anticorps monoclonal qui se lie compétitivement à RANKL, ce qui entraîne une inhibition puissante de la résorption osseuse. Bien que mécaniquement similaire aux bisphosphonates, le traitement par denosumab peut être plus puissant dans la prévention des événements squelettiques liés à l'établissement de métastases osseuses, et diminue le risque de toxicité rénale (Fizazi *et al.*, 2009; Fizazi *et al.*, 2011).

Le développement de nouveaux produits thérapeutiques est nécessaire. Bien que des progrès aient été réalisés pour comprendre le cercle vicieux des métastases osseuses, c'est-à-dire comment les cellules tumorales apportent des changements à la physiologie osseuse et comment le microenvironnement osseux peut influencer la croissance de la tumeur, les connaissances actuelles des événements primitifs de colonisation, survie, dormance et réactivation sont limitées. Pourtant, c'est probablement lors de ces étapes que les cellules

tumorales sont les plus vulnérables au ciblage thérapeutique et sont susceptibles de fournir la meilleure opportunité pour éradiquer la maladie.

3.3 Modèles d'étude *in vivo* des métastases osseuses

Les modèles animaux sont des outils importants pour étudier la pathogenèse et élaborer des stratégies de traitement des métastases osseuses chez l'homme. Ils comprennent notamment les tumeurs spontanées survenant chez les rongeurs ou les petits mammifères comme le chien ou le chat, les modèles de souris transgéniques, et les modèles de xénogreffes de cancers humains et/ou animaux (Simmons *et al.*, 2015). Chaque modèle présente des avantages et des inconvénients, et il n'existe actuellement aucun modèle idéal pour les métastases osseuses qui soit reproductible, progresse rapidement pour permettre d'être étudié, et qui récapitule toutes les étapes de la tumorigenèse et des métastases chez l'homme, c'est-à-dire les changements génétiques, le phénotype métastatique, et les modifications du microenvironnement osseux (Valkenburg *et al.*, 2013).

Les tentatives initiales de trouver des systèmes animaux pour étudier la métastase osseuse ont été entravées par le fait que le cancer spontané de la prostate est rare chez les rongeurs et les primates non humains. Seuls les rats et les chiens développent spontanément des cancers de la prostate, et seuls les chiens ont une propension vers des métastases osseuses mixtes ostéocondensantes/ostéolytiques au niveau du squelette axial et des os longs (Rosol *et al.*, 2003; Leroy and Northrup, 2009). Les modèles de souris génétiquement modifiées sont généralement considérés comme une manière précise de mimer le cancer humain mais, malgré de nombreuses tentatives, il n'existe actuellement aucun modèle qui récapitule précisément et systématiquement le processus de métastases osseuses (Kasper and Smith, 2004; Shappell *et al.*, 2004; Valkenburg and Williams, 2011). Par conséquent, le modèle expérimental actuellement utilisé pour modéliser la métastase osseuse est l'implantation de cellules néoplasiques, provenant de lignées cellulaires tumorales humaines ou de tumeurs primaires, chez les rongeurs immunodéprimés, souvent la souris (Singh and Figg, 2005). Les principales lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate et leurs caractéristiques sont présentées en Tableau 3.3. Plusieurs souris immunodéficientes sont disponibles pour de tels modèles, mais elles présentent cependant un inconvénient, le rôle du système immunitaire ne peut être étudié (Valkenburg and Williams, 2011; Cossigny and Quan, 2012). Les techniques d'injections les plus courantes pour étudier les métastases osseuses sont (1) les injections orthotopiques, dans la prostate, (2) les injections intravasculaires, dans la veine de la queue ou

dans le ventricule cardiaque gauche, (3) les injections intra-osseuses, dans le tibia ou le fémur et (4) les injections sous-cutanées, accompagnées de transplantations sous-cutanées de fragments d'os humains (Figure 3.5) (Simmons *et al.*, 2015).

Tableau 3.3 : Principales lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate et leurs caractéristiques

Nom	Source	Phénotype des métastases osseuses	Temps de doublement	Sensibilité aux androgènes	PSA	AR	Fusion ETS	Référence
DU145	Cerveau	Ostéolytiques	34h	Non	Non	Non	Non	(Stone <i>et al.</i> , 1978)
PC3	Vertèbre	Ostéolytiques	33h	Non	Non	Non	Non	(Kaighn <i>et al.</i> , 1979)
PC3M-Luc-C6	PC3	Ostéolytiques	Non renseigné	Non	Non	Non	Non	(Jenkins <i>et al.</i> , 2003)
PC3c	PC3	Mixtes	Non renseigné	Non	Non	Non	Non	(Fradet <i>et al.</i> , 2013)
VCaP	Vertèbre	Mixtes	120-144h	Oui	Oui	Oui	Fusion TMPRSS2:ERG	(Korenchuk <i>et al.</i> , 2001)
LNCaP	Ganglion	Mixtes	28-60h	Oui	Oui	Oui	Translocation ETV1	(Horoszewicz <i>et al.</i> , 1980)
C4-2	LNCaP	Ostéocondensantes	48h	Non	Oui	Oui	Translocation ETV1	(Wu <i>et al.</i> , 1994)
C4-2B	LNCaP	Ostéocondensantes	48h	Non	Oui	Oui	Translocation ETV1	(Thalmann <i>et al.</i> , 1994)
MDA-PCa-2a	Os	Ostéocondensantes	82-93h	Oui	Oui	Oui	Non	(Navone <i>et al.</i> , 1997)
MDA-PCa-2b	Os	Ostéocondensantes	42-73h	Oui	Oui	Oui	Translocation ETV1	(Navone <i>et al.</i> , 1997)

3.3.1 Injections orthotopiques

Il existe d'importantes différences anatomiques entre les glandes prostatiques des rongeurs et des humains. Brièvement, les humains ont une glande comprenant plusieurs zones et composée d'acini, comme décrit dans la partie précédente de l'introduction, alors que les rongeurs ont quatre lobes distincts et pas d'acini véritable. Les injections orthotopiques, directement dans la prostate, sont habituellement faites dans les lobes ventraux ou dorsaux de la prostate murine, car ils sont les plus facilement accessibles et les plus anatomiquement semblables à la prostate humaine (Park *et al.*, 2010). Elles ont l'avantage d'être un modèle complet du processus métastatique, de la croissance tumorale primaire à la formation et la prolifération d'une métastase au niveau d'un site distant. Cependant, dans ces modèles orthotopiques, les métastases osseuses sont relativement rares par rapport aux métastases des tissus mous, et sont dépendantes de la lignée cellulaire injectée.

Ces modèles sont plutôt utilisés pour étudier le développement et la croissance des tumeurs primaires, ou pour étudier l'effet de nouveaux médicaments sur le volume tumoral ou sur la capacité de la tumeur à envahir le stroma environnant ou à métastaser aux ganglions

lymphatiques. Lorsqu'une métastase osseuse est induite en utilisant ce type d'injection, elle fournit des informations précieuses sur la façon dont les cellules cancéreuses traversent le processus de la formation d'une tumeur primaire, à la croissance et au maintien d'une lésion métastatique. Les cellules cancéreuses injectées dans leur organe d'origine se comportent théoriquement comme elles le feraient dans le contexte initial, car le microenvironnement de l'organe de l'hôte principal de la tumeur est considéré comme important pour le développement des métastases (Chung *et al.*, 2003). Cependant, les microenvironnements de l'humain et de la souris diffèrent, ce qui peut expliquer pourquoi si peu de métastases osseuses se produisent dans ces modèles de souris. Une autre utilisation importante de ces modèles est la sélection de lignées cellulaires susceptibles de métastaser dans des organes particuliers, comme cela a par exemple été réalisé pour les lignées cellulaires C4-2 et C4-2B dérivées de la lignée cellulaire LNCaP, ou pour les PC3M-Luc-C6 et PC3c dérivées de PC3 (Tableau 3.3) (Pettaway *et al.*, 1996).

3.3.2 Injections intravasculaires

Les injections intravasculaires sont de deux types, intraveineuse dans la veine de la queue, ou intra-cardiaque dans le ventricule gauche. Ces types d'injection simulent l'apparition de métastases spontanées chez la souris, en évitant les étapes d'invasion et d'intravasation des cellules tumorales. Elles permettent d'étudier le tropisme des cellules tumorales et d'examiner les interactions de ces cellules avec le microenvironnement des tissus envahis.

Toutes les injections dans les veines sont relativement simples mais conduisent rarement aux métastases à l'os. Après l'injection dans la veine de la queue par exemple, le premier lit capillaire que rencontre les cellules tumorales est le système vasculaire pulmonaire (Elkin and Vlodavsky, 2001). Les injections de veine de queue sont mieux adaptées pour étudier les métastases pulmonaires et ne sont pas souvent utiles dans la recherche de métastases squelettiques par rapport à d'autres méthodes.

L'injection intra-cardiaque ventriculaire gauche est une technique courante pour étudier la circulation des cellules tumorales, l'extravasation vasculaire et les métastases à distance. Cela en fait une technique précieuse pour la recherche sur les métastases osseuses. Cependant, c'est une technique difficile à maîtriser et le pourcentage de souris qui développent des métastases, ainsi que l'emplacement et le nombre de métastases, peuvent être variables et dépendent des lignées cellulaires. L'utilisation d'imagerie bioluminescente

immédiatement après une injection intra-cardiaque est utile pour confirmer une injection réussie, car les cellules cancéreuses circuleront dans toutes les régions du corps. Ensuite, elle permet d'identifier rapidement les sites de métastases chez l'animal vivant. En effet, les lignées cellulaires sont typiquement transfectées ou infectées avec un vecteur d'expression contenant la luciférase, et les tumeurs sont imagées *in vivo* après injection de luciférine, substrat pour la luciférase.

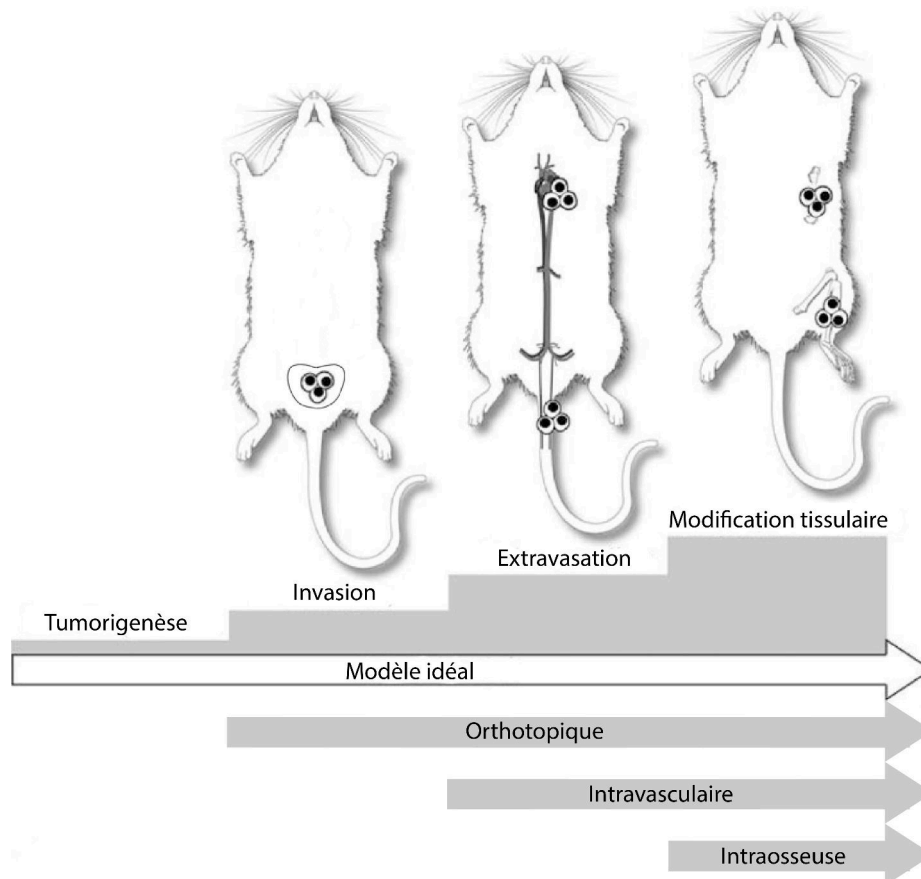


Figure 3.5 : Différents modèles d'injections utilisés pour étudier la progression du cancer de la prostate et les métastases osseuses

Des injections orthotopiques, dans la prostate, reproduisent l'invasion, l'extravasation et la formation de métastases. Des injections intravasculaires, dans la veine de la queue ou le ventricule cardiaque gauche, reproduisent l'extravasation et la formation de métastases. Cependant, les injections dans la veine de la queue tendent à favoriser les métastases pulmonaires, tandis que les injections intra-cardiaques dans le ventricule gauche permettent aux cellules néoplasiques de se localiser à n'importe quel tissu du corps en fonction de son phénotype métastatique inhérent. Enfin, des injections intra-osseuses (ou sous-cutanées accompagnées de la transplantation de fragments d'os humain) reproduisent la capacité à se développer et à modifier le microenvironnement osseux. Adapté d'après (Werbeck *et al.*, 2014).

3.3.3 Injections intra-osseuses

Les injections intra-osseuses sont généralement effectuées dans le tibia ou le fémur de la souris. C'est une méthode reproductible et causant une morbidité limitée des animaux, mais ce n'est pas un modèle métastatique littéral car les cellules n'ont pas besoin de métastaser de la tumeur primaire au site distant. Cependant, ce modèle peut fournir des informations sur la façon dont les cellules cancéreuses prolifèrent et se maintiennent dans l'os, ainsi que sur les interactions des cellules cancéreuses avec l'os et le microenvironnement osseux (Tannehill-Gregg *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2015). Il est plus facile d'induire la croissance tumorale dans l'os en utilisant des injections intra-osseuses que tout autre type d'injection.

Des analyses peuvent être effectuées pour déterminer la nature ostéocondensante ou ostéolytique des os et des lésions qui s'y trouvent. L'imagerie radiographique est couramment utilisée pour évaluer la densité minérale osseuse locale ou les changements morphologiques osseux (Dai *et al.*, 2008). La tomodensitométrie (μ CT) permet l'acquisition et l'analyse de la structure tridimensionnelle de l'os, à la fois *in vivo* et *ex vivo*, et fournit des données qualitatives et quantitatives (Mizutani and Suzuki, 2012). La coloration histologique de la phosphatase acide résistant au tartrate (TRAP) est utilisée pour étudier l'ostéoclastogénèse *in vivo* induite par les cellules cancéreuses, et elle peut également être utilisée pour des essais de co-culture *in vitro*. La coloration de la phosphatase alcaline est utilisée pour tester l'activité des ostéoblastes et la coloration Von Kossa pour évaluer la minéralisation osseuse (Hall *et al.*, 2005).

3.3.4 Injections sous-cutanées et transplantations sous-cutanées de fragments d'os humains

L'implantation d'os humain adulte ou fœtal ainsi que l'injection sous-cutanée de cellules tumorales chez la souris immunodéprimée est un modèle fournissant un microenvironnement osseux humain sur lequel les cellules tumorales peuvent se loger, constituant ainsi une représentation plus précise des métastases osseuses humaines (Shtivelman and Namikawa, 1995; Nemeth *et al.*, 1999; Yonou *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2008). D'ailleurs, les cellules cancéreuses humaines préfèrent se loger dans l'os humain plutôt que dans l'os murin (Tsingotjidou *et al.*, 2001). Cependant, l'os fœtal et l'os adulte n'ont pas la même structure, et il existe de nombreuses variables biologiques provenant de la source de l'os qui pourraient compliquer l'interprétation des résultats. Un autre inconvénient, comme les

injections intra-osseuses, est qu'il ne s'agit pas techniquement d'un modèle de métastase car il ne permet qu'une étude ciblée de l'étape finale de la cascade métastatique, c'est-à-dire des interactions des cellules cancéreuses humaines avec l'os humain.

Il est peu probable que ce modèle d'implantation de cellules néoplasiques chez les rongeurs immunodéprimés soit un jour un modèle parfait pour étudier les métastases osseuses, en raison de la nature hétérogène du cancer et des métastases, des facteurs environnementaux qui ne peuvent être imités, et du fait que la génétique et la physiologie de l'homme et de la souris ne sont pas identiques. Cependant, il permet de reproduire fidèlement certaines étapes de la métastase, et les chercheurs peuvent choisir entre différentes techniques d'injections ayant des caractéristiques spécifiques par rapport aux systèmes qu'ils étudient et aux questions posées.

Récemment, des modèles de xénogreffes dérivées de patients (PDX) ont été utilisés pour la recherche clinique, dans le but de surmonter les limites des modèles traditionnels en obtenant une plus grande fidélité à la pathologie humaine (Tentler *et al.*, 2012; Siolas and Hannon, 2013). Ces modèles PDX sont générés en utilisant des tissus tumoraux chirurgicalement prélevés d'un patient, et implantés directement dans des souris immunodéprimées, sans aucune manipulation *in vitro*. Les tumeurs sont ensuite maintenues *in vivo* par des passages de souris à souris. Ces modèles de tumeurs PDX présentent de nombreux avantages puisqu'ils sont biologiquement stables, et conservent une grande partie des caractéristiques moléculaires, génétiques et histologiques, ainsi que l'hétérogénéité de la tumeur originale et la réponse au traitement. Cependant, leur utilisation dans la recherche sur le cancer est encore limitée, en partie à cause des coûts élevés d'entretien des animaux, de la longue période de latence après la greffe, des taux variables de réussite des greffes, et de l'accès restreint aux échantillons de patients.

4. GENE DE FUSION *TMPRSS2:ERG*

Afin de mieux comprendre le rôle du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate, nous allons d'abord présenter, dans cette partie, les connaissances acquises sur la famille des facteurs de transcription ETS, puis celles acquises sur le facteur de transcription ERG appartenant à cette famille, et enfin les études réalisées sur le gène de fusion impliquant ce facteur dans le cancer de la prostate.

4.1 Famille des facteurs de transcription ETS

Le fondateur de cette famille est l'oncogène viral *v-ets*, isolé à partir du génome du rétrovirus aviaire E26, d'où le nom ETS (E-Twenty-Six ou E-26 Transformation-Specific) (Leprince *et al.*, 1983; Nunn *et al.*, 1983). Les gènes homologues de *v-ets* ont ensuite été identifiés dans le génome de l'homme et du poulet, les gènes *ETS* étant conservés au cours de l'évolution chez les métazoaires (de Taisne *et al.*, 1984; Gegonne *et al.*, 1987; Laudet *et al.*, 1999). A ce jour, trente gènes de la famille ETS ont été identifiés, dont vingt-huit dans le génome humain (Hollenhorst *et al.*, 2011). Ces facteurs de transcription sont classés en plusieurs sous-familles en fonction de leur composition structurale et leur degré de similarité au niveau du domaine ETS de liaison à l'ADN, par l'algorithme « neighbor-joining method » (Figure 4.1) (Saitou and Nei, 1987; Thompson *et al.*, 1994).

Les vingt-huit facteurs de transcription ETS partagent un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé, le domaine ETS, conditionnant l'appartenance à cette famille (Figure 4.1). Ce domaine de 85 acides aminés se compose de trois hélices α soutenues par quatre feuillets β , formant un motif hélice-tour-hélice de type « ailé » (wHTH, winged helix-turn-helix) (Graves and Petersen, 1998; Hollenhorst *et al.*, 2011). Il se lie directement à l'ADN par l'intermédiaire de la troisième hélice α , au niveau d'une région s'étendant sur 12 à 15 paires de bases, avec une préférence pour une séquence riche en purine, de plus ou moins 9 paires de bases, et contenant un motif consensus 5'-GGA(A/T)-3' central (Karim *et al.*, 1990; Graves and Petersen, 1998; Oikawa and Yamada, 2003). La spécificité de liaison des différentes protéines ETS est définie par les bases flanquant ce motif (Wei *et al.*, 2010). Par ailleurs, les facteurs de transcription ETS sont capables d'agir en coopération avec d'autres facteurs de transcription, comme le démontre la présence de site de fixation à l'ADN dit composite au niveau des gènes cibles, c'est-à-dire incluant des sites ETS/FOXC (Forkhead box C) ou ETS/AP1 (Activated Protein 1) par exemple (Moulton *et al.*, 1994; De Val *et al.*, 2008).

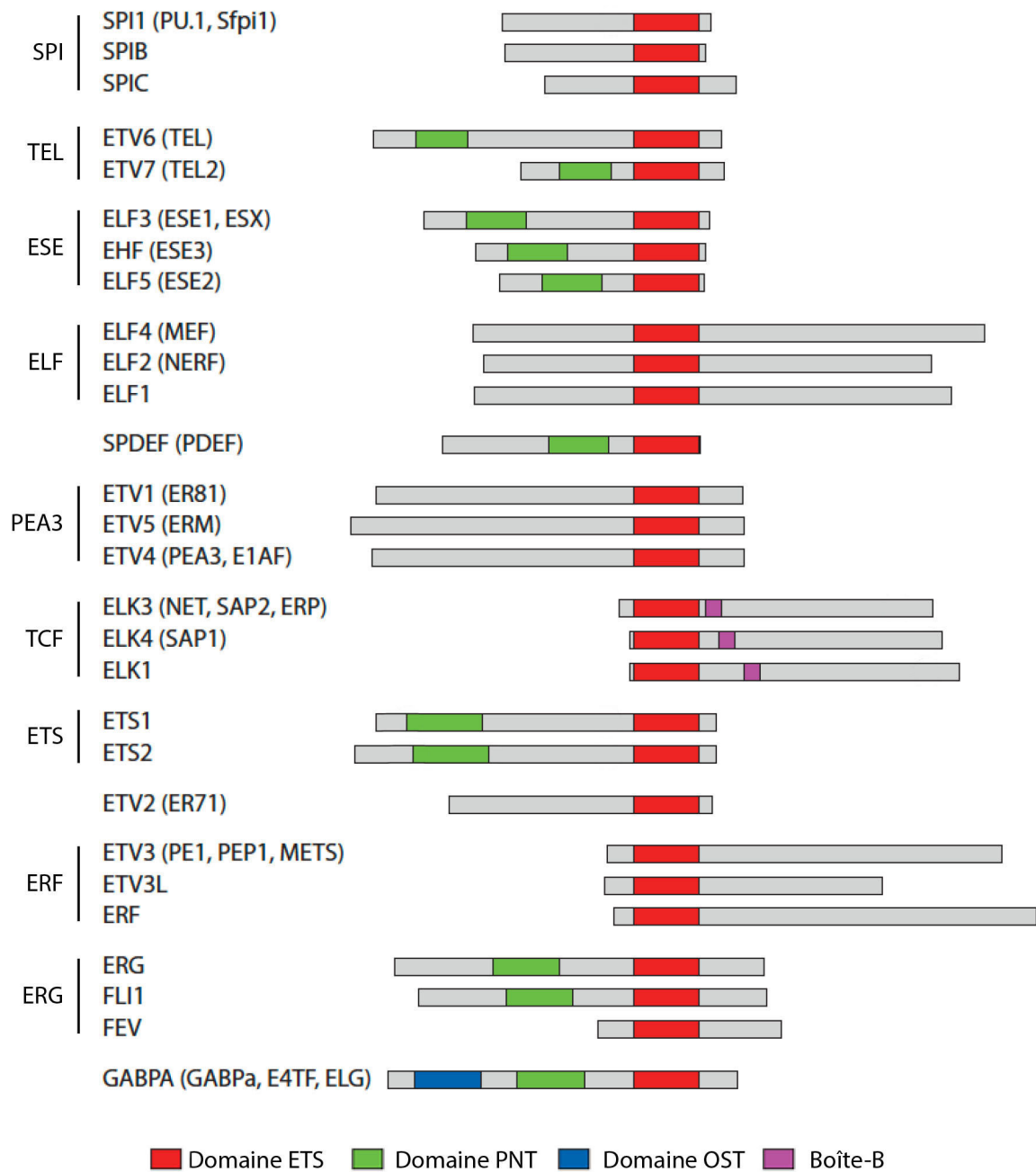


Figure 4.1 : Famille des facteurs de transcription ETS humains, alignés sur le domaine ETS, signature de la famille ETS
 Adapté d'après (Hollenhorst *et al.*, 2011).

Un autre domaine conservé, partagé par un tiers des protéines de la famille ETS, est le domaine PNT (Pointed) situé en amont du domaine ETS, dans la partie N-terminale de la protéine (Figure 4.1). Ce domaine de 65 acides aminés est formé par cinq hélices α (Mackereth *et al.*, 2004; Hollenhorst *et al.*, 2011). Ses fonctions ne sont pas encore tout à fait élucidées, mais il semble notamment impliqué dans la modulation des propriétés transcriptionnelles des protéines ETS (Gegonne *et al.*, 1987; Schneikert *et al.*, 1992; Rao *et*

al., 1993; Carrere *et al.*, 1998). En effet, il fonctionne comme un site d'interaction avec des kinases ou des co-régulateurs transcriptionnels, et est impliqué dans l'hétérodimérisation avec des partenaires protéiques, pouvant notamment être d'autres facteurs de transcription de la famille ETS (Basuyaux *et al.*, 1997; Lacronique *et al.*, 1997; Sharrocks, 2001; Seidel and Graves, 2002). De plus, le domaine PNT est très similaire au domaine SAM (Sterile Alpha Module), plus répandu, impliqué dans des interactions protéine-ARN et protéine-protéine, y compris la formation d'homodimère (Graves and Petersen, 1998; Kim and Bowie, 2003; Mackereth *et al.*, 2004).

En plus des domaines ETS et PNT, il existe aussi la boîte-B dans les facteurs de transcription TCF (ELK3, ELK4 et ELK1 ; ELK, ETS domain-containing protein Elk) (Figure 4.1). Ce domaine forme des éléments structuraux qui peuvent interagir avec le SRF (Serum Response Factor) (Ling *et al.*, 1997). Le domaine OST (On-SighT) présent uniquement dans le facteur de transcription GABPA (GA-Binding Protein transcription factor, Alpha subunit) pourrait participer au recrutement de cofacteurs (Figure 4.1) (Kang *et al.*, 2008).

4.2 Facteur de transcription ERG

Le gène *ERG* (*ETS-Related Gene*), membre de la famille des facteurs de transcription ETS, a été décrit en 1987 dans des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (Rao *et al.*, 1987; Reddy *et al.*, 1987).

4.2.1 Structure génomique et isoformes

Le gène *ERG* se situe sur le brin inverse du chromosome 21 (21q22.2) et s'étend sur 282 kb (Rao *et al.*, 1988; Hattori *et al.*, 2000). Il possède jusqu'à 12 exons potentiels, et au moins 3 promoteurs proximaux différents mutuellement exclusifs (Figure 4.2) (Rao *et al.*, 1987; Reddy *et al.*, 1987; Duterque-Coquillaud *et al.*, 1993; Prasad *et al.*, 1994). De plus, une région de 85 kb en aval du site d'initiation de la transcription a également été identifiée comme un enhancer de *ERG*, actif pendant l'hématopoïèse normale et dans les cellules de leucémie lymphoblastique aigüe à cellules T. Dans ces cellules, ERG régule positivement sa propre expression via cet enhancer (Thoms *et al.*, 2011).

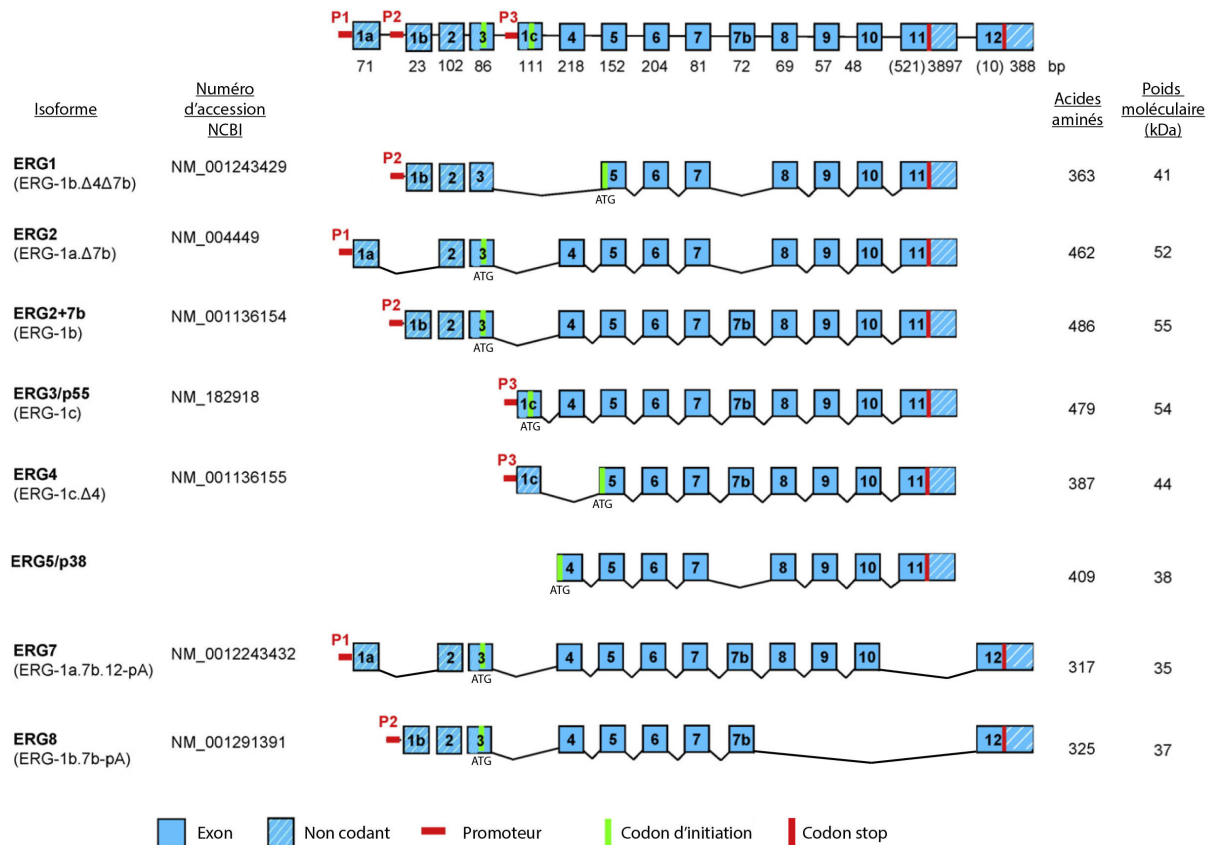


Figure 4.2 : Structure du gène *ERG* humain et de ses isoformes

Adapté d'après (Shah *et al.*, 2016).

Une étude a identifié plus de 30 isoformes différentes de ERG, conduisant à la production d'au moins 15 polypeptides (Zammarchi *et al.*, 2013). L'expression de ces isoformes de ERG dépend de l'épissage d'exons alternatifs et de l'utilisation de sites d'initiation de la traduction et de polyadénylation alternatifs (Figure 4.2) (Rao *et al.*, 1987; Duterque-Coquillaud *et al.*, 1993; Prasad *et al.*, 1994). Parmi les transcrits alternatifs, ERG1, ERG2, ERG3 (p55), ERG4 (p49), et ERG5 (p38) codent pour des protéines fonctionnelles qui se lient à l'ADN et sont considérées comme des transactivateurs transcriptionnels (Rao *et al.*, 1987; Reddy *et al.*, 1987; Reddy and Rao, 1991; Duterque-Coquillaud *et al.*, 1993; Prasad *et al.*, 1994). ERG2 et ERG3 (p55) sont les isoformes principales, les plus représentées chez l'homme (Rainis *et al.*, 2005). ERG7 et ERG8 sont prédits pour former des protéines fonctionnelles car elles ont des cadres de lecture ouverts, mais ces deux isoformes n'ont pas de domaine ETS de liaison à l'ADN (Owczarek *et al.*, 2004).

Récemment, une étude a identifié une séquence de localisation nucléaire nettement conservé dans le domaine ETS ; l'isoforme ERG8, ne possédant pas ce domaine de liaison à

l'ADN situé dans l'exon 11, est incapable de lier l'ADN et se localise principalement dans le cytoplasme (Hoesel *et al.*, 2016). L'inhibition de l'expression de ERG8 dans les cellules endothéliales entraîne une régulation positive de l'activité transcriptionnelle des isoformes de ERG endogènes, suggérant que ERG8 fonctionne comme un inhibiteur des isoformes actives de ERG. Dans les cellules endothéliales quiescentes, les isoformes ERG3 et ERG5 sont constitutivement exprimées (Hewett *et al.*, 2001), alors que les isoformes ERG1 et ERG8 sont exprimées à des niveaux beaucoup plus bas (Hoesel *et al.*, 2016).

4.2.2 Domaines fonctionnels

L'isoforme la plus longue code une protéine de 486 acides aminés avec une masse moléculaire de 54,6 kDa (Rao *et al.*, 1987; Reddy *et al.*, 1987). Grâce à l'analyse de mutants de délétion, plusieurs domaines fonctionnels ont été identifiés dans cette protéine ERG de pleine longueur (Figure 4.3) (Siddique *et al.*, 1993) :

- le domaine ETS, caractéristique des facteurs de transcription de la famille ETS, essentiel pour la liaison à l'ADN, et précédemment décrit.
- le domaine PNT, caractéristique d'un tiers des facteurs de transcription de la famille ETS, jouant un rôle dans la médiation des interactions protéine-protéine ainsi que dans les phénomènes d'homodimérisation et d'hétérodimérisation, et précédemment décrit.
- deux domaines transactivateurs NTAD et CTAD (N-terminal et C-terminal Transcriptional Activation Domain), impliqués dans l'activité transactivatrice (Carrere *et al.*, 1998).
- deux domaines inhibiteurs NID et CID (N-terminal et C-terminal Inhibitory Domain), situés de part et d'autre du domaine ETS de liaison à l'ADN, impliqués dans les mécanismes d'auto-inhibition (Regan *et al.*, 2013).
- deux sites de phosphorylation par les kinases I κ B (Inhibitory of Kappa B) et AKT (S81 et S125), pouvant améliorer les interactions avec d'autres facteurs de transcription, la liaison à l'ADN, ainsi que l'activité transactivatrice (Hollenhorst *et al.*, 2011; Singareddy *et al.*, 2013). Le domaine PNT pourrait servir de plateforme d'amarrage aux protéines kinases, conduisant à la phosphorylation des résidus adjacents, comme cela a été montré pour d'autres facteurs de transcription de la famille ETS, tels que GABPA, ETS1 et ETS2 (Slupsky *et al.*, 1998; Seidel and Graves, 2002; Lau *et al.*, 2012; Shwartz *et al.*, 2013).

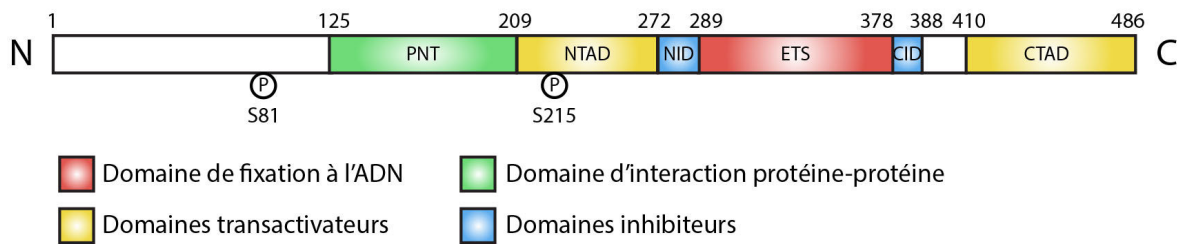


Figure 4.3 : Domaines fonctionnels du facteur de transcription ERG

Adapté d'après (Adamo and Ladomery, 2016).

4.2.3 Partenaires de liaison et partenaires fonctionnels

Le facteur de transcription ERG semble interagir de manière fonctionnelle et/ou physique avec plusieurs facteurs de transcription, et peut notamment former des complexes homodimériques ou hétérodimériques *in vitro* (Tableau 4.1) (Vergier and Duterque-Coquillaud, 2002).

Deux domaines sont impliqués dans ces phénomènes de dimérisation : le domaine ETS et le domaine PNT. Ainsi, ERG peut notamment former des hétérodimères avec des partenaires protéiques pouvant être d'autres membres de la famille ETS, notamment ETS1, ETS2, ETV1, ETV6, FLI1, ELK3 et SPI1 (Basuyaux *et al.*, 1997; Carrere *et al.*, 1998), mais également d'autres facteurs associés, tels que les récepteurs nucléaires, notamment les récepteurs aux estrogènes ER α ou aux androgènes AR (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2010), ou le complexe AP1, composé des protéines FOS (FBJ (finkel-biskis-jenkins) murine osteosarcoma viral oncogene homolog) et JUN (JU-Nana) (Basuyaux *et al.*, 1997; Carrere *et al.*, 1998; Vergier *et al.*, 2001; Camuzeaux *et al.*, 2005). Le facteur de transcription ERG est également capable de former des homodimères via le domaine PNT et le domaine ETS (Carrere *et al.*, 1998; Vergier *et al.*, 2001).

Il interagit également avec UBC9 (Ubiquitin Conjugating enzyme 9), une ubiquitine-ligase, et avec ESET (ERG associated protein with a Suppressor of variegation, Enhancer of zest and Trithorax domain), une méthyltransférase spécifique de l'histone H3 (Yang *et al.*, 2002). Cette protéine ESET est capable de s'associer aux corépresseurs transcriptionnels HDAC1 et HDAC2 (Histone Deacetylase 1 et 2), ainsi que mSin3A et mSin3B (mammalian Switch independant) (Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). Ainsi, le facteur de transcription ERG pourrait être impliqué dans un mécanisme de répression transcriptionnelle.

Tableau 4.1 : Partenaires de liaison et partenaires fonctionnels du facteur de transcription ERG

Adapté d'après (Shah *et al.*, 2016).

Partenaire de liaison	Nom de la protéine	Référence
	ERG	
	ETS2	
Facteurs de transcription de la famille ETS	FLI1	(Carrere <i>et al.</i> , 1998)
	ETV1	
	SPI1	
	API1	(Carrere <i>et al.</i> , 1998; Verger <i>et al.</i> , 2001; Camuzeaux <i>et al.</i> , 2005)
Autres facteurs de transcription	KLF2	(Meadows <i>et al.</i> , 2009)
	RUNX1	(Wilson <i>et al.</i> , 2010)
	Xvent2	(Deramaudt <i>et al.</i> , 1999)
	Xvent2B	
Récepteurs nucléaires	AR	(Yu <i>et al.</i> , 2010)
	DNA-PK	
Co-facteurs ou protéines de réparation des dommages à l'ADN	Ku70	(Brenner <i>et al.</i> , 2011)
	Ku80	
	PARP1	
Méthyltransférase d'histone	ESET	(Yang <i>et al.</i> , 2002)
Ubiquitine-ligases	UBC9	(Yang <i>et al.</i> , 2002)
	SPOP	(An <i>et al.</i> , 2015; Gan <i>et al.</i> , 2015)
Enzyme dé-ubiquitinase	USP9X	(Wang <i>et al.</i> , 2014b)
MAP Kinase	ERK2	(Selvaraj <i>et al.</i> , 2015)
Facteur d'épissage	RNP-C	(Deramaudt <i>et al.</i> , 1999)
Partenaire fonctionnel	Nom de la protéine	Référence
	P65	(Dryden <i>et al.</i> , 2012)
	SCL	(Wilson <i>et al.</i> , 2010)
Facteurs de transcription	LYL1	
	LMO2	
	GATA2	
Co-activateur transcriptionnel	P300	(Jayaraman <i>et al.</i> , 1999)
Récepteurs nucléaires	ERα	(Vlaeminck-Guillem <i>et al.</i> , 2003)

4.2.4 Fonctions physiologiques

Les facteurs de transcription ETS peuvent agir comme activateurs et/ou répresseurs transcriptionnels, en fonction du gène cible, des modifications post-traductionnelles (Lelievre *et al.*, 2001; Sharrocks, 2001; Charlot *et al.*, 2010), et des interactions avec des partenaires

protéiques (cofacteurs) (Verger and Duterque-Coquillaud, 2002), régulant ainsi de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Figure 4.4).

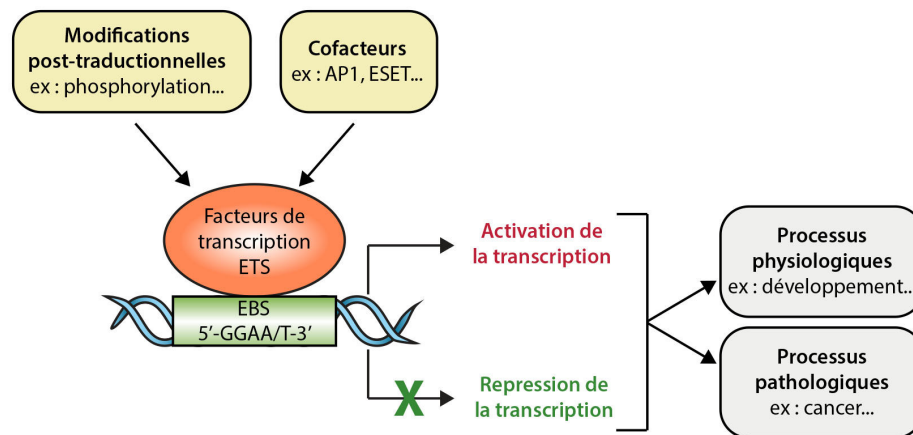


Figure 4.4 : Mode d'action des facteurs de transcription ETS

Des invalidations de gènes par l'utilisation de modèle de souris KO (knock-out) ont été effectuées pour un grand nombre de membre de la famille ETS, permettant de comprendre leurs rôles au cours du développement embryonnaire, mais également dans le fonctionnement physiologique. Ainsi, ces facteurs sont nécessaires pour le développement et la différenciation de nombreux tissus et types cellulaires, avec notamment des rôles dans l'embryogenèse (Nikolova-Krstevski *et al.*, 2009), la vasculogenèse (Yuan *et al.*, 2011), l'angiogenèse (McLaughlin *et al.*, 2001; Birdsey *et al.*, 2008), l'hématopoïèse (Loughran *et al.*, 2008), le développement neuronal (Bosco *et al.*, 2013), la régulation de l'architecture cellulaire (Birdsey *et al.*, 2012), la migration (Carver *et al.*, 2009), l'invasion (Klezovitch *et al.*, 2008) et la perméabilité cellulaire (Sperone *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012).

Enfin, la compréhension de la relation globale entre les membres de la famille ETS est essentielle pour étudier la spécificité fonctionnelle. En effet, les domaines structuraux ou fonctionnels, ainsi que les modifications post-traductionnelles, se trouvant en dehors du domaine ETS hautement conservé, suggèrent des propriétés uniques pour chaque sous-famille ou chaque protéine ETS (Figure 4.1). Plus précisément, les membres d'une même sous-famille peuvent avoir des fonctions redondantes, alors que ceux de différentes sous-familles peuvent avoir des propriétés biochimiques uniques pouvant être utilisées dans des fonctions biologiques distinctes. Ces différents rôles biologiques des membres de la famille ETS sont également suggérés par la large gamme de phénotypes obtenus suite à l'invalidation de

chacun des gènes de cette famille chez la souris. Cependant, des phénotypes similaires ont également été observés. Ainsi, des preuves biologiques et biochimiques suggèrent une coexistence de la spécificité et de la redondance de fonctions entre les facteurs de transcription de cette famille ETS.

4.2.4.1 Expression et localisation

Afin de comprendre le rôle du gène *Erg*, son profil d'expression a été étudié au cours du développement embryonnaire du poulet (Dhordain *et al.*, 1995; Iwamoto *et al.*, 2000; Iwamoto *et al.*, 2001) et de la souris (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2000; Iwamoto *et al.*, 2007).

Au cours de l'embryogenèse, chez le poulet, le gène *Erg* est exprimé dès le 1^{er} jour du développement dans les dérivés mésodermiques et les crêtes neurales, puis, dans les vaisseaux et le tissu pré-cartilagineux à partir du 6^{ème} jour du développement (Dhordain *et al.*, 1995; Iwamoto *et al.*, 2000; Iwamoto *et al.*, 2001). Son expression persiste ensuite au 11^{ème} jour du développement dans le cartilage formé, en particulier dans les chondrocytes articulaires et pré-hypertrophiques. Chez les souris adultes, *Erg* est exprimé de manière constitutive dans les chondrocytes articulaires du cartilage transitoire afin d'empêcher leur différenciation en cellules hypertrophiques (Iwamoto *et al.*, 2013; Cox *et al.*, 2014). La mise en place du cartilage est une étape cruciale de la squelettogenèse des os longs.

Des observations similaires ont été effectuées chez la souris, c'est-à-dire une expression à partir du 8^{ème} jour de développement embryonnaire dans les tissus mésodermiques, tels que l'endothélium, le myocarde, le pré-cartilage et les tissus hématopoïétiques, mais pas dans l'épithélium ou les lymphocytes (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2000; Iwamoto *et al.*, 2007; Birdsey *et al.*, 2008; Nikolova-Krstevski *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2010; Schachterle *et al.*, 2012; Vijayaraj *et al.*, 2012). Le gène *Erg* est également exprimé à des niveaux élevés dans les cellules des crêtes neurales embryonnaires durant leur phase migratoire (Maroulakou and Bowe, 2000). Ensuite, au cours du développement vasculaire, l'expression du gène *ERG* diminue progressivement, mais persiste cependant de manière importante dans les cellules endothéliales de la plupart des tissus adultes chez la souris et chez l'homme (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2000; Hewett *et al.*, 2001; Ellett *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2010).

Ainsi, le profil d'expression du gène *Erg* au cours de l'embryogenèse suggère son implication dans (1) la mise en place du système vasculaire, (2) l'hématopoïèse et (3) la mise en place du cartilage.

4.2.4.2 Rôle dans la mise en place du système vasculaire

Au moins 19 facteurs de transcription ETS sont exprimés dans les cellules endothéliales humaines au cours du développement (Randi *et al.*, 2009). En effet, ces facteurs sont essentiels pour contrôler la transcription et stimuler l'expression de nombreux gènes spécifiques des cellules endothéliales, tels que *VEGFR1*, *VEGFR2* (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), *TIE1*, *TIE2* (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin like and EGF like domains*), *eNOS* (*endothelial Nitric Oxide Synthase 3*) ou encore *VE-Cadhérine* (*Vascular Endothelial-Cadherin*). De plus, tous les promoteurs et enhancers endothéliaux caractérisés contiennent des motifs ETS pouvant être liés par plusieurs membres de la famille ETS (De Val and Black, 2009).

Le gène *ERG* est essentiel pour maintenir l'intégrité vasculaire et la viabilité des embryons. En effet, il maintient la stabilité vasculaire en régulant la voie de signalisation WNT/ β -caténine (Wingless-type MMTV integration site family) (Cattelino *et al.*, 2003; Birdsey *et al.*, 2015) et en contrôlant la transcription de certains gènes spécifiques des cellules endothéliales tels que l'*angiopoïétine 2* (Hasegawa *et al.*, 2004), l'*endogline* (Pimanda *et al.*, 2006), le *VWF* (*Von Willebrand Factor*) (Schwachtgen *et al.*, 1997; McLaughlin *et al.*, 2001), et la *VE-cadhérine* (Gory *et al.*, 1998; Birdsey *et al.*, 2008). En accord avec ces observations, des modèles murins d'inactivation par recombinaison homologue d'un sous-ensemble d'isoformes du gène *Erg* les plus abondants dans les cellules endothéliales murines (**homozygotes *Erg* ^{Δ Ex4/ Δ Ex4}**) ou d'inactivation constitutive endothéliale du gène *Erg* (***Erg*^{EC-KO}**) conduisent toutes deux à une létalité embryonnaire entre E10,5 et E12,5 associée à une perturbation sévère du système cardiovasculaire, associée à un remodelage vasculaire défectueux et une hémorragie (Vijayaraj *et al.*, 2012; Birdsey *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2015). Cependant, un autre modèle murin d'inactivation totale du gène *Erg* dans l'ensemble de l'organisme (**homozygotes *Erg*^{-/-}**) a montré un phénotype différent (Lathen *et al.*, 2014). En effet, cette inactivation totale provoque une létalité embryonnaire retardée, entre E16,5 et 3 mois. Les anomalies vasculaires apparaissent après E14,5 chez certains mutants, ainsi qu'un œdème et une hémorragie. Ces souris semblent également développer une hypertension

artérielle pulmonaire, due à l'apparition de la maladie veino-occlusive pulmonaire. Les divergences entre les phénotypes de ces modèles murins peuvent certes être dues à des variations techniques, mais l'invalidation du gène *Erg* globale, par rapport aux invalidations du gène *Erg* spécifique des cellules endothéliales, pourrait également entraîner des mécanismes de compensation, réduisant la gravité des défauts vasculaires observés au cours du développement précoce (Shah *et al.*, 2016). Enfin, un autre modèle murin d'invalidation endothéliale du gène *Erg* de manière inductible, post-natale (**Erg**^{IEC-KO}), entraîne une angiogenèse rétinienne défectueuse (Birdsey *et al.*, 2015). L'absence du gène *Erg* dans les cellules endothéliales rétiniennes conduit à une réduction de la VE-cadhérine, une régression de la croissance vasculaire, et un recrutement réduit de péricytes, confirmant un rôle de *Erg* dans le contrôle de la stabilité vasculaire pendant l'angiogenèse physiologique.

Le gène *ERG* joue également un rôle majeur dans la réponse cellulaire à l'inflammation vasculaire où il maintient la formation de tubes et la fonction de barrière des cellules endothéliales (Yuan *et al.*, 2009; Sperone *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012). L'inhibition de *ERG* dans les cellules endothéliales HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), un modèle cellulaire largement utilisé dans les études de l'angiogenèse, conduit à une perte de contact cellule-cellule, à une inhibition de la formation de tube, et à une augmentation de la perméabilité endothéliale (McLaughlin *et al.*, 2001; Birdsey *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012). En effet, *ERG* favorise la stabilité des jonctions endothéliales cellule-cellule par l'activation transcriptionnelle de gènes tels que *VE-cadhérine*, *CLDN5* (*Claudin-5*), ou encore *ICAM2* (*Intercellular Adhesion Molecule 2*) qui sont impliqués dans la formation de jonctions serrées (Gory *et al.*, 1998; McLaughlin *et al.*, 2001; Birdsey *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012). Le gène *ERG* peut également inhiber l'inflammation vasculaire par la répression de gènes pro-inflammatoires tels que *IL-8* (*Interleukin-8*), *ICAM1* (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), ou encore *VCAM1* (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) qui assurent le recrutement des neutrophiles (Yuan *et al.*, 2009; Sperone *et al.*, 2011; Dryden *et al.*, 2012). Ce mécanisme de répression est dû à l'inhibition de la liaison à l'ADN de la sous-unité p65 du complexe NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa-B) au niveau du promoteur de ses gènes cibles pro-inflammatoires, et suggère donc un mécanisme direct d'interférence (Dryden *et al.*, 2012). Il existe en fait un site de fixation à l'ADN dit composite au niveau de ces gènes pro-inflammatoires, c'est-à-dire incluant des sites *ERG/P65*, ce dernier étant un partenaire fonctionnel de *ERG* (Tableau 4.1).

4.2.4.3 Rôle dans l'hématopoïèse

Le gène *ERG* est nécessaire pour l'hématopoïèse définitive, la fonction des cellules souches hématopoïétiques adultes, la mégacaryopoïèse normale et le maintien du nombre de plaquettes sanguines périphériques (Loughran *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2011; Taoudi *et al.*, 2011). En effet, l'équipe du professeur D. Hilton cherchait à identifier de nouveaux régulateurs de la fonction des cellules souches hématopoïétiques. Ainsi, suite à l'utilisation d'un traitement entraînant des mutations ponctuelles dans les cellules germinales, cette équipe a obtenu un modèle murin (**homozygotes *ERG*^{Mld2/Mld2}**) possédant une mutation faux-sens substituant une proline en sérine (S329P) dans le domaine ETS de liaison à l'ADN du facteur de transcription Erg, appelée Mld2 (Multilineage defect 2). Ce modèle ne modifie pas la stabilité de la protéine Erg, n'altère pas sa capacité de liaison à l'ADN, mais conduit à une incapacité de transactivation des gènes cibles. Dans le contexte des cellules hématopoïétiques, il en résulte une thrombopénie, une leucopénie, et une érythropénie, ainsi qu'une létalité embryonnaire à E13,5, sans défauts cardiovasculaires apparents, suggérant que les fonctions de ERG dans le système vasculaire ne sont pas exclusivement liées à son activité de liaison à l'ADN.

4.2.4.4 Rôle dans la mise en place du cartilage

Pour comprendre le rôle du facteur de transcription ERG dans la mise en place du cartilage, des études fonctionnelles ont été effectuées. Chez le poulet, l'expression de Erg dans les chondrocytes a été étudiée en clonant deux variants d'épissage de Erg : l'isoforme ch-Erg dite de pleine longueur (ERG3/p55 sur la Figure 4.2), et l'isoforme C-1-1 qui, par rapport à l'isoforme ch-Erg de pleine longueur, ne possède pas les 27 acides aminés codés par l'exon alternatif 7 situé en amont du domaine ETS de liaison à l'ADN (Iwamoto *et al.*, 2000). Cependant, bien que l'isoforme C-1-1 soit exprimé dans le développement des chondrocytes articulaires, l'isoforme ch-Erg est plus exprimé dans les chondrocytes pré-hypertrophiques au niveau de la plaque de croissance. En accord avec cette observation, l'expression de l'isoforme ch-Erg dans l'embryon de poulet entraîne la maturation des chondrocytes précédant la formation osseuse, alors que celle de l'isoforme C-1-1 maintient les chondrocytes dans un état immature, empêchant ainsi le remplacement du cartilage par l'os. Le rôle de C-1-1 a également été confirmé par l'établissement de souris transgéniques surexprimant l'homologue humain de l'isoforme C-1-1, sous le contrôle du promoteur du

gène murin *Col2a1* (*Collagen type 2 alpha 1 chain*), activé dans les chondrocytes embryonnaires et largement utilisé dans la littérature (Iwamoto *et al.*, 2007). En effet, les embryons murins transgéniques sont de taille plus petite, la minéralisation de leur squelette est réduite, et les chondrocytes hypertrophiques sont quasiment absents de la plaque de croissance, étant remplacés par des chondrocytes immatures.

Par ailleurs, dans notre laboratoire, afin de mieux comprendre le rôle du facteur de transcription ERG dans le processus de chondrogenèse ou dans la maturation chondrogénique, un modèle de souris transgéniques a été établi (Holder-Espinasse, 2006). Ces souris surexpriment un fragment trans-dominant négatif de la protéine Erg (**homozygotes DN-Erg**), spécifiquement restreint au domaine ETS de liaison à l'ADN, spécifiquement dans les chondrocytes embryonnaires au cours de la mise en place du cartilage, grâce à l'utilisation du promoteur du gène murin *Col2a1*. La protéine Erg tronquée entre alors en compétition avec les fonctions de la protéine Erg endogène de type sauvage. Les embryons et les nouveau-nés de souris transgéniques ne présentent aucune malformation évidente, mais des signes cliniques de vieillissement précoces apparaissent au cours des six premiers mois, notamment une hyperlordose, c'est-à-dire une accentuation de la courbure dorsale, et une mobilité réduite (résultats non publiés). Une destruction du cartilage articulaire a également été observée sur les coupes histologiques chez la souris transgénique DN-Erg. Le facteur de transcription ERG semble donc impliqué dans la régulation de divers gènes affectant la formation du cartilage et la squelettogenèse.

Des chondrocytes embryonnaires ont été isolés des cages thoraciques de souris sauvages et transgéniques DN-Erg, puis cultivés en monocouche afin d'étudier le rôle physiologique de ERG dans le maintien du phénotype chondrocytaire (Flajollet *et al.*, 2012). L'expression du transgène est corrélée à une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les chondrocytes embryonnaires, suggérant une émergence d'adipocytes. Une étude transcriptomique a ensuite permis de déterminer le profil des gènes exprimés de manière différentielle au cours de la dédifférenciation des chondrocytes embryonnaires de souris transgéniques DN-Erg cultivés en monocouche. Ainsi, il y a une diminution des marqueurs liés à la chondrogenèse, et une augmentation de l'expression des gènes liés à l'adipogenèse dans ces chondrocytes embryonnaires transgéniques cultivés en monocouche. Le gène *ERG* semble donc impliqué dans le maintien du phénotype chondrogénique *in vitro*, ou dans l'orientation du devenir cellulaire. Le vieillissement du squelette est classiquement associé à

une diminution de la cellularité et une augmentation de la graisse dans la moelle osseuse. De manière intéressante, une comparaison histologique des caractéristiques morphologiques de moelle osseuse, prélevée dans le fémur des souris sauvages ou transgéniques DN-Erg adultes, a révélé une augmentation du nombre d'adipocytes dans les souris transgéniques, présentant un phénotype de vieillissement précoce du squelette (Flajollet *et al.*, 2012). Ainsi, le gène *ERG* peut contribuer à l'équilibre homéostatique dans la plasticité cellulaire du squelette.

4.2.5 Fonctions pathologiques

Les facteurs de transcription de la famille ETS ont été impliqués dans des pathologies humaines. En particulier, plusieurs d'entre eux peuvent agir comme des proto-oncogènes, et voient leur expression altérée dans différentes tumeurs d'origine non épithéliale, telles que les leucémies, les lymphomes, ou les sarcomes d'Ewing, mais également dans plusieurs tumeurs d'origine épithéliale, telles que le cancer du sein, de l'ovaire, de la prostate, ou encore du côlon (Seth and Watson, 2005). Plusieurs types d'altération de ces facteurs peuvent être associées à ces cancers, notamment un patron d'expression altéré, des duplications ou des délétions dans le génome, des translocations chromosomiques, etc.

Comme discuté précédemment, *ERG* est un facteur de transcription impliqué dans l'orientation du devenir cellulaire. Par conséquent, son expression ectopique peut être préjudiciable et a été associée à la pathogenèse de plusieurs cancers, dont les leucémies, le sarcome d'Ewing et le cancer de la prostate, qui sera détaillé dans la partie suivante.

4.2.5.1 Implications dans les leucémies

L'importance du facteur de transcription *ERG* dans l'hématopoïèse normale a suggéré que sa dérégulation pourrait également être impliquée dans le développement des leucémies, cancers prenant naissance dans les cellules souches de la moelle osseuse, notamment les cellules souches lymphoïdes ou myéloïdes.

En effet, la plupart des patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique (LAM) expriment fortement le facteur de transcription *ERG* (Valk *et al.*, 2004). Cette surexpression est associée à un mauvais pronostic (Marcucci *et al.*, 2005; Metzeler *et al.*, 2009). L'inhibition de *ERG* dans les lignées cellulaires humaines de LAM atténue la prolifération cellulaire, suggérant que *ERG* est crucial pour l'entretien de la leucémie (Salek-Ardakani *et al.*, 2009; Tsuzuki *et al.*, 2011).

Dans un certain nombre de cas de LAM, le gène *ERG* est associé à une translocation chromosomique. Notamment, la translocation t(X;21) aboutit à des transcrits de fusion entre deux gènes de la famille des facteurs de transcription ETS, *ELF4* (*E74-Like Factor 4*) et *ERG* (Figure 4.5) (Moore *et al.*, 2006). La protéine de fusion contient alors les 25 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la protéine *ELF4*, et les 470 acides aminés restants de l'extrémité C-terminale de la protéine *ERG*, entraînant une expression aberrante du facteur de transcription *ERG* fonctionnel, sous le contrôle du promoteur de *ELF4*. Une autre translocation t(16 ; 21) entraîne l'expression du gène de fusion *FUS/TLS:ERG* (Figure 4.5) (Shimizu *et al.*, 1993; Ichikawa *et al.*, 1994; Panagopoulos *et al.*, 1994). Cette fusion est relativement rare et aboutit à une protéine chimère englobant le domaine N-terminal de liaison à l'ARN de la protéine *FUS/TLS* (Fused in Sarcoma/Translocated in Sarcoma), et le domaine C-terminal de liaison à l'ADN du facteur de transcription *ERG*. La protéine de fusion *FUS/TLS:ERG* est capable de transformer les cellules NIH3T3, de bloquer la différenciation myéloïde, et d'améliorer la prolifération cellulaire (Pan *et al.*, 2008), bien que d'autres altérations moléculaires soient probablement nécessaires pour initier la leucémie (Warner *et al.*, 2005).

D'un point de vue moléculaire, les altérations d'expression du facteur de transcription *ERG* pourraient affecter de nombreux gènes impliqués dans l'hématopoïèse. D'une part, une analyse de ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing) dans des cellules souches hématopoïétiques murines a identifié de nombreuses régions cibles de *ERG*, suggérant un large programme transcriptionnel régulé par ce facteur de transcription (Wilson *et al.*, 2010). D'autre part, *ERG* participe à la formation d'un complexe avec d'autres facteurs de transcription associés à l'hématopoïèse normale, tels que *SCL* (Stem Cell Leukemia), *LYL1* (Lymphoblastic Leukemia derived sequence 1), *LMO2* (LIM domain only 2), *GATA2* (GATA binding protein 2), *RUNX1* (Runt related transcription factor 1) et *FLI1* (Friend Leukemia virus Integration 1) (Wilson *et al.*, 2010). Ainsi, une régulation aberrante de l'expression du gène *ERG* interfère directement avec le fonctionnement normal de ces facteurs de transcription, et par conséquent, dérégule l'expression de leurs gènes cibles.

Enfin, le facteur de transcription *ERG*, situé sur le chromosome 21, est causalement lié au développement d'une forme particulière de LAM, la leucémie aiguë mégacaryocytaire, associée au syndrome de Down (trisomie 21) pendant l'enfance (Rainis *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2011).

Par ailleurs, des délétions de facteur de transcription ERG ont été observées dans des cas de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) (Mullighan *et al.*, 2007), alors que des niveaux d'expression élevés de ce facteur ont été associés à un mauvais pronostic et un risque accru de rechute dans la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T) (Baldus *et al.*, 2006). Les lymphocytes T et B proviennent tous deux des cellules souches hématopoïétiques. Le gène *ERG* est exprimé en continu dans les lymphocytes B, des cellules précoces immatures jusqu'aux cellules B matures (Rivera *et al.*, 1993), alors qu'il est exprimé de manière transitoire au cours de la maturation des lymphocytes T, puis n'est plus exprimé dans les cellules T matures (Anderson *et al.*, 1999). L'expression aberrante du gène *ERG* dans les lymphocytes T favorise la LAL-T, entraînant ainsi une accumulation de lymphocytes T immatures (Thoms *et al.*, 2011).

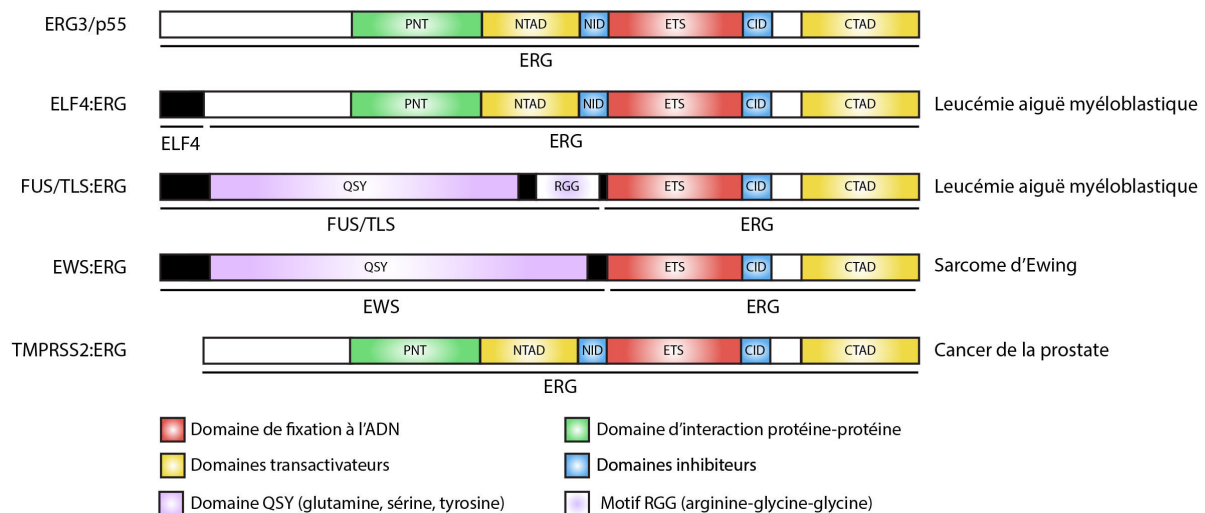


Figure 4.5 : Comparaison des structures de la protéine ERG pleine longueur et des protéines de fusion ELF4:ERG, FUS/TLS:ERG, EWS:ERG et TMPRSS2:ERG

4.2.5.2 Implications dans le sarcome d'Ewing

Le sarcome d'Ewing est une tumeur osseuse relativement rare qui s'observe chez des personnes jeunes, âgées de 5 à 25 ans, plus fréquemment chez les garçons et chez les sujets blancs. Le plus souvent, la tumeur se développe initialement au niveau de l'os, en particulier les os du pelvis, du thorax, le fémur, le tibia, les vertèbres et l'humérus, et a un fort potentiel métastatique. L'origine de ces tumeurs n'est pas encore clairement établie, elles pourraient être issues de cellules primaires provenant de crête neurale (Lipinski *et al.*, 1987; Cavazzana

et al., 1988; Staeger *et al.*, 2004), ou de cellules souches mésenchymateuses (Riggi *et al.*, 2005; Riggi and Stamenkovic, 2007; Tirode *et al.*, 2007; Miyagawa *et al.*, 2008).

Le sarcome d'Ewing est généralement associé à des translocations chromosomiques entre le gène *EWS* (*Ewing Sarcoma breakpoint region 1 protein*) et des gènes appartenant à la famille des facteurs de transcription de la famille ETS, en particulier *FLI1* dans 90% des cas (Delattre *et al.*, 1992; Dunn *et al.*, 1994; Sorensen *et al.*, 1994), *ERG* dans 5 à 10% des cas (Zucman *et al.*, 1993), et *ETV4* (Urano *et al.*, 1998), *ETV1* (Jeon *et al.*, 1995), ou *FEV* (*Fifth Ewing sarcoma Variant*) (Peter *et al.*, 1997) beaucoup plus rarement (Sandberg and Bridge, 2000) (Figure 4.5). Ces réarrangements conduisent à la formation de protéines chimères, EWS:FLI1 ou EWS:ERG généralement, dans lesquelles l'extrémité C-terminale de la protéine EWS est remplacée par le domaine ETS de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription de la famille ETS (Zucman *et al.*, 1993; Zoubek *et al.*, 1994). Ceci entraîne une perte de l'activité endogène du promoteur du gène *ERG*, provoquant ainsi une dérégulation du facteur de transcription ERG et de ses gènes cibles. Par ailleurs, tout comme la protéine FUS/TLS, fusionnée au facteur de transcription ERG dans les LAM, la protéine EWS appartient à la famille des protéines TET (TLS/EWS/TAF15), caractérisée par la présence d'un domaine de liaison à l'ARN (Sankar and Lessnick, 2011). Au niveau de leur extrémité N-terminale, ces protéines TET possèdent également un domaine QSY (Q, Glutamine ; S, Sérine ; Y, Tyrosine), régulant la fixation à l'ARN, et interagissant avec l'ARN polymérase II et le protéine CBP/p300 (CREB-Binding Protein), deux composants du complexe d'initiation de la transcription (Ohno *et al.*, 1994; Petermann *et al.*, 1998; Araya *et al.*, 2003). Ainsi, les protéines chimères EWS:FLI1 et EWS:ERG ont une composition particulière, suggérant leur implication dans la régulation de la transcription.

4.3 Gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans le cancer de la prostate

Pendant longtemps, les aberrations chromosomiques récurrentes étaient principalement caractéristiques des leucémies, des lymphomes, et des sarcomes. Les réarrangements chromosomiques produisant des gènes de fusion étaient rares dans les adénocarcinomes, tumeurs d'origine épithéliale les plus fréquentes et contribuant à un pourcentage élevé de morbidité et mortalité par cancer.

4.3.1 Découverte des gènes de fusion

Le développement d'une approche statistique spécifique (COPA, Cancer Outlier Profile Analysis) a permis d'identifier des profils d'oncogènes en analysant des ensembles de données transcriptomiques publiées, et a mené à la découverte des gènes de fusion associés au cancer de la prostate. En effet, en 2005, une étude transversale a montré une surexpression mutuellement exclusive de deux membres de la famille des facteurs de transcription ETS, *ERG* (Ets related gene) et *ETV1* (ETS variant 1), dans 50 à 70% des cas de cancer de la prostate (Petrovics *et al.*, 2005; Tomlins *et al.*, 2005). Des expériences complémentaires ont ensuite révélé des fusions à l'origine de cette surexpression, entre la région 5' non traduite du gène *TMPRSS2* (*Transmembrane Protease, Serine 2*) (21q22.3) et la partie codante des deux gènes *ERG* (21q22.2) ou *ETV1* (7p21.1), suggérant un nouveau mécanisme de surexpression de ces gènes de la famille des facteurs de transcription ETS dans le cancer de la prostate (Tomlins *et al.*, 2005). Les gènes de fusion *TMPRSS2:ERG* et *TMPRSS2:ETV1* sont ainsi les premiers gènes de fusion, issus de remaniements chromosomiques, mis en évidence dans un cancer d'origine épithéliale.

Après la découverte initiale de ces deux gènes de fusion, d'autres études ont identifié de plus en plus de fusions dans le cancer de la prostate, impliquant d'autres gènes en 3', et d'autres partenaires en 5' (Figure 4.6). L'ensemble de ces gènes de fusion peut être classé en deux catégories, en fonction de la nature du gène en 3' (Rubin *et al.*, 2011) :

- les fusions associées aux gènes de la famille ETS, impliquant les gènes *ERG* (Tomlins *et al.*, 2005), *ETV1* (Tomlins *et al.*, 2005), *ETV4* (*ETS variant 4*) (Tomlins *et al.*, 2006), *ETV5* (*ETS variant 5*) (Helgeson *et al.*, 2008) ; *ELK4* (*ETS domain-containing protein Elk-4*) (Rickman *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012) ou *FLII* (*Friend leukemia virus integration 1*) (Paulo *et al.*, 2012)
- les fusions non associées aux gènes de la famille ETS, impliquant les gènes *CRAF* (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*) ou *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) (Palanisamy *et al.*, 2010)

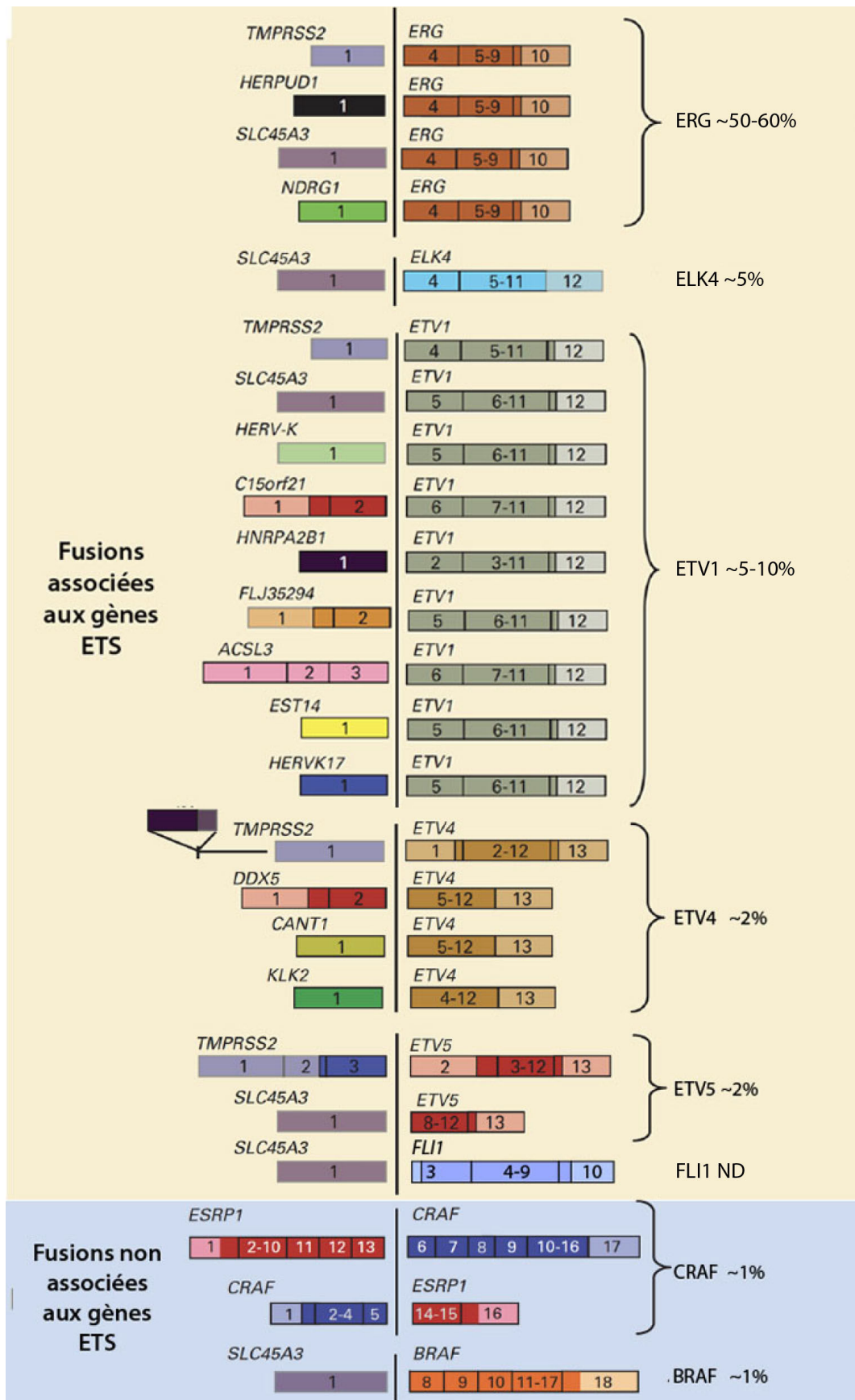


Figure 4.6 : Gènes de fusion identifiés dans le cancer de la prostate

Adapté d'après (Rubin *et al.*, 2011).

Dans la première catégorie, les six gènes de la famille ETS peuvent être fusionnés à la région 5' non traduite de différents gènes. Par exemple, pour le gène *ERG*, il peut être associé à la région 5' non traduite hormono-dépendante des gènes *TMPRSS2* (Tomlins *et al.*, 2005), *SLC45A3* (*Solut carrier family 45, member 3*) (Tomlins *et al.*, 2007a; Esgueva *et al.*, 2010), *HERPUD1* (*Homocysteine- and Endoplasmic Reticulum stress-inducible Protein, Ubiquitin-like Domain-containing 1*) (Maher *et al.*, 2009), ou encore *NDRG1* (*N-myc Downstream Regulated 1*) (Pflueger *et al.*, 2009).

Les tumeurs prostatiques sont hétérogènes. En effet, au sein du même organe, il est possible de trouver des foyers tumoraux exprimant ou non un gène de fusion. De plus, bien que les gènes de fusion soient nombreux dans les cancers de la prostate, leur présence semble être mutuellement exclusive dans une même cellule, ou un même foyer tumoral prostatique (Tomlins *et al.*, 2005; Tomlins *et al.*, 2006; Attard *et al.*, 2009).

Dans la suite de l'exposé, seul le gène de fusion *TMPRSS2:ERG* sera décrit. Ainsi, dans le cancer de la prostate, la région promotrice de *TMPRSS2* est fusionnée à la région codante du gène *ERG*. Le promoteur *TMPRSS2* contient des éléments sensibles aux androgènes, et l'expression de ce gène est hormono-dépendante (Lin *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006). Grâce à cette caractéristique, l'expression du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* conduit à la surexpression du facteur de transcription ERG en présence d'androgènes (Tomlins *et al.*, 2005) (Figure 4.7).

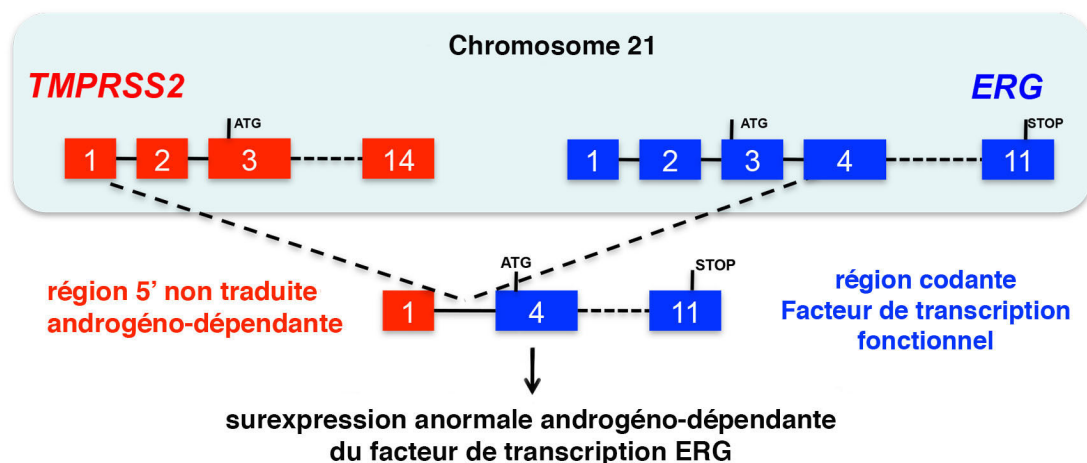


Figure 4.7 : Gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans le cancer de la prostate

Un remaniement du chromosome 21 entraîne la fusion entre la région 5' non traduite du gène *TMPRSS2* et la partie codante du gène *ERG*.

4.3.2 Mécanismes de remaniements chromosomiques

Les deux gènes *TMPRSS2* et *ERG* se situent sur le chromosome 21, à environ 3 mégabases d'intervalle. La technique de FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) a permis de déterminer que deux mécanismes contribuent de manière équivalente à la formation du gène de fusion : la translocation chromosomique, c'est-à-dire l'insertion de la région chromosomique intergénique dans un autre chromosome, ou la délétion interstitielle de la région intergénique (Hermans *et al.*, 2006; Iljin *et al.*, 2006; Perner *et al.*, 2006; Rubin and Chinnaiyan, 2006; Mehra *et al.*, 2007b; Attard *et al.*, 2008; FitzGerald *et al.*, 2008). Ces deux mécanismes de remaniement chromosomique peuvent coexister au sein d'une même tumeur prostatique (Barry *et al.*, 2007; Mehra *et al.*, 2007a).

4.3.3 Origine de la fusion TMPRSS2:ERG

Les origines de la formation des fusions chromosomiques dans la prostate ne sont pas encore bien établies. Des délétions peuvent se produire en raison de la présence de sites fragiles et de points de cassures dans l'intron 2 de *ERG*, et dans les introns 1 et 2 de *TMPRSS2* (Hermans *et al.*, 2006). De plus, elles pourraient résulter d'une exposition à long terme aux androgènes, d'une augmentation de l'activité des récepteurs aux androgènes, et d'une inhibition de la protéine PIWIL1 (Piwi-Like protein 1), prévenant les cassures double brin d'ADN (Bastus *et al.*, 2010). En effet, la signalisation des androgènes conduit au recrutement d'AR et de TOP2B (Topoisomerase (DNA) 2 Beta), une enzyme contrôlant la structure topologique de l'ADN, et capable de générer des cassures double brin transitoires. Ce recrutement s'effectue notamment au niveau des régions régulatrices des gènes *TMPRSS2* et *ERG*, génère des boucles de chromatine rassemblant les loci des deux gènes, puis induit des cassures double brin suivies d'événements de recombinaison de gènes, pouvant conduire à la suppression des 2,8 mégabases interstitielles et être à l'origine des fusions chromosomiques (Mani *et al.*, 2009; Haffner *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Par ailleurs, la formation de la translocation TMPRSS2:ERG représente un sous-ensemble distinct de cancers de la prostate, et la surexpression de ERG qui en résulte peut provoquer des changements structurels dans la topologie de la chromatine et la réparation des dommages à l'ADN (Berger *et al.*, 2011; Brenner *et al.*, 2011; Rubin *et al.*, 2011; Rickman *et al.*, 2012). De manière intéressante, les fusions générées par délétion interstitielle plutôt que par translocation sont plus répandues dans les cas de cancer de la prostate résistant à la castration (Mehra *et al.*, 2008).

4.3.4 Multiples isoformes de transcrits de fusion TMPRSS2:ERG

Grâce aux techniques de RT-PCR et 3'RACE (3' Rapid Amplification of cDNA Ends), de nombreux transcrits de fusion TMPRSS2:ERG ont été identifiés, pouvant être générés par différentes combinaisons d'exons des gènes *TMPRSS2* et *ERG* (Figure 4.8) (Tomlins *et al.*, 2005; Soller *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2007; Lapointe *et al.*, 2007; Tomlins *et al.*, 2007b; Winnes *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008b). De plus, comme présenté précédemment, il existe de multiples exons alternatifs au sein du gène *ERG* (Figure 4.2), pouvant contribuer à la complexité des transcrits issus du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* (Figure 4.8).

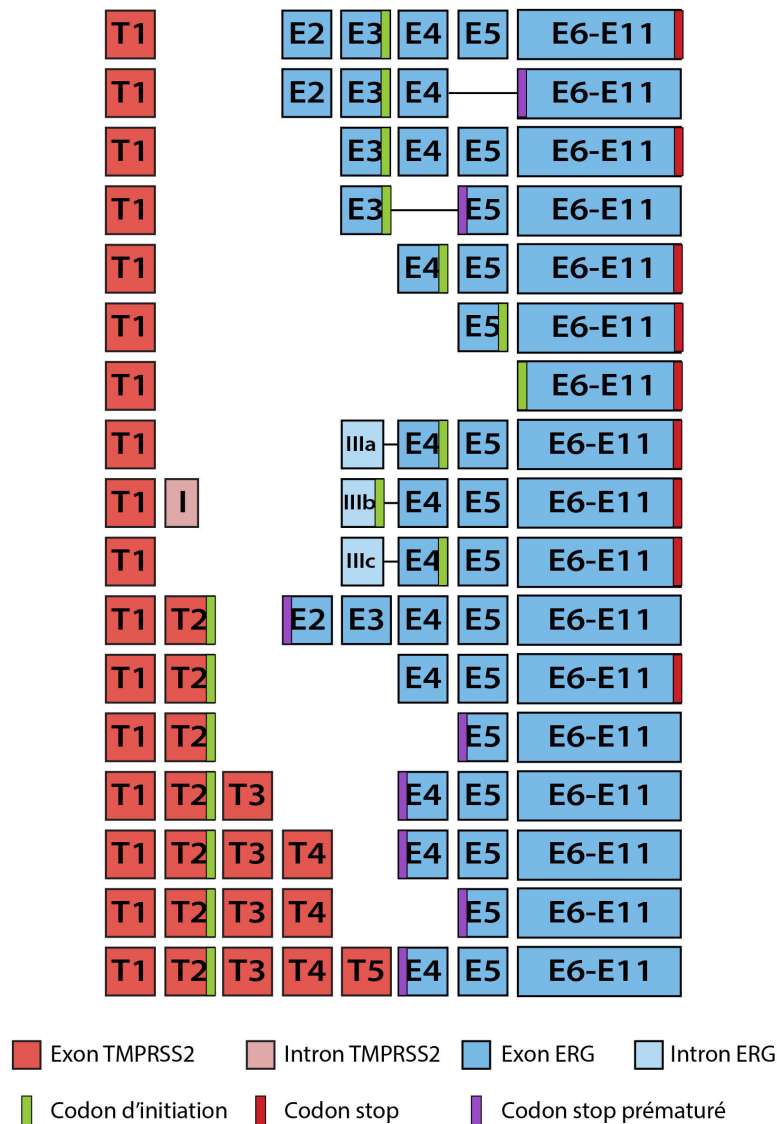


Figure 4.8 : Multiples isoformes de transcrits de fusion TMPRSS2:ERG

Adapté d'après (Adamo and Ladomery, 2016)

L'isoforme la plus fréquente du gène de fusion, appelée T1E4, contient l'exon 1 du gène *TMPRSS2*, fusionné avec l'exon 4 du gène *ERG* (Figure 4.7) (Clark *et al.*, 2007). Ainsi, les nombreux transcrits de fusion sont à l'origine de protéines ERG pouvant être soit de pleine longueur, soit tronquées au niveau de la partie N-terminale. Il est également possible que les protéines ERG résultantes possèdent des codons stop prématurés.

En comparant les produits protéiques issus des transcrits de fusion T1E4 et des transcrits du gène *ERG* pleine longueur, nous constatons que la protéine T1E4 a perdu les 32 premiers acides aminés, au niveau de la partie N-terminale, mais conserve les domaines fonctionnels identifiés sur la protéine ERG pleine longueur, en particulier les domaines PNT et ETS, ainsi que les deux domaines transactivateurs et les deux domaines inhibiteurs (Figure 4.9).

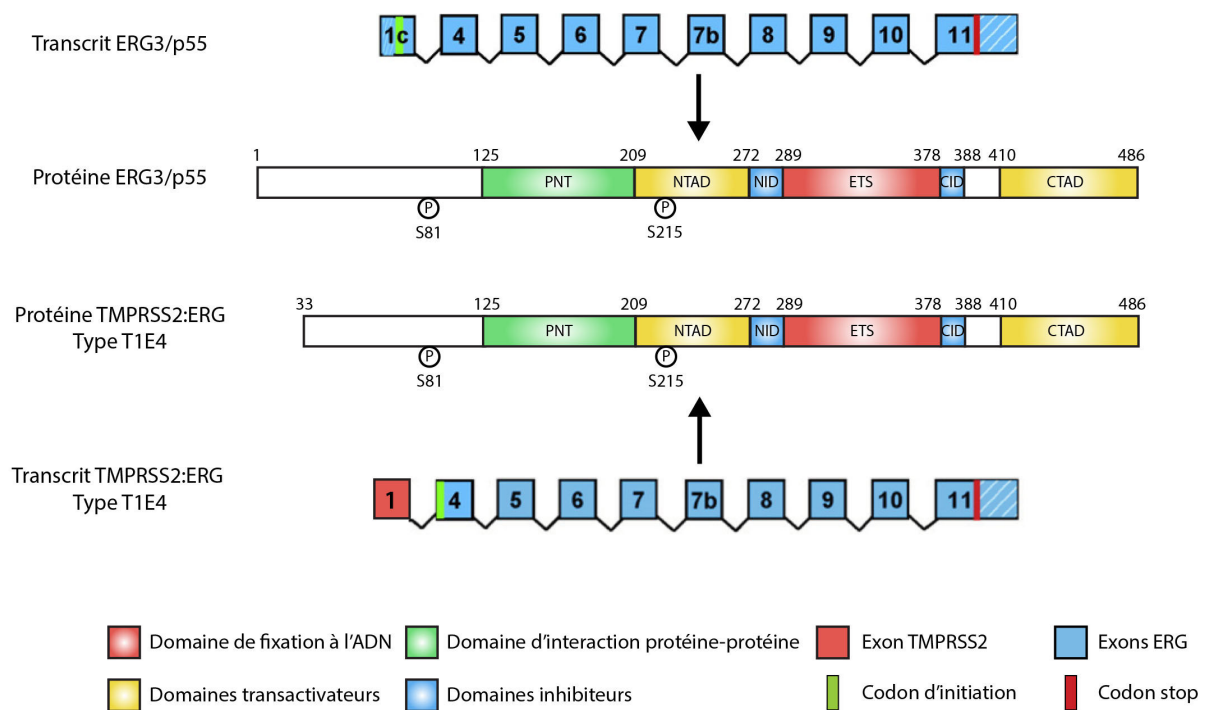


Figure 4.9 : Comparaison des produits protéiques issus du gène *ERG* pleine longueur, et du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* de type T1E4

4.3.4 Prévalence du gène de fusion *TMPRSS2:ERG*

La détection du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* par RT-PCR et FISH montre qu'il s'agit d'un événement commun, retrouvé dans environ 50% des cas de cancer de la prostate selon une méta-analyse effectuée sur plus de 2000 cas issus d'une vingtaine d'études indépendantes (Tableau 4.2) (Kumar-Sinha *et al.*, 2008). Notons que l'étude de Demichelis *et al.*, identifiant la fusion *TMPRSS2:ERG* dans seulement 16% des cas, est effectuée sur des cancers de la prostate de stades T1a-b, alors que par exemple, l'étude de Cerveira *et al.*, identifiant cette fusion dans 50% des cas, est effectuée sur des cancers de stades plus avancés T1c-T2. De plus, l'apparition de la fusion augmente en fréquence à partir des lésions PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia) de haut grade (19-21%) jusqu'au carcinome (48-50%) (Cerveira *et al.*, 2006; Perner *et al.*, 2007). De manière intéressante, les lésions PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia) de haut grade contenant la fusion se retrouvent adjacentes à des zones de cancer agressif, associé à la fusion, et les deux partagent le même type de fusion (Perner *et al.*, 2006). Le tissu prostatique normal ne présente pas de fusion *TMPRSS2:ERG* (Cerveira *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2007; Perner *et al.*, 2007) ; cependant, le tissu normal adjacent à un site de cancer de la prostate contient parfois la fusion (15,6%) (Clark *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2013). Par ailleurs, des fusions ont également été détectées à basse fréquence dans l'hyperplasie bénigne de la prostate (6-8,3%) (Clark *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2013; Velaeti *et al.*, 2014). Cela pourrait indiquer que la présence de la fusion dans une hyperplasie bénigne de la prostate augmente le risque de développer un carcinome.

Tableau 4.2 : Etudes cliniques de l'incidence du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans les cancers de la prostate

Adapté d'après (Kumar-Sinha *et al.*, 2008).

Référence de l'étude	Nombre d'échantillons	Incidence
(Demichelis <i>et al.</i> , 2007)	111	17 (16%)
(Attard <i>et al.</i> , 2008)	445	134 (30%)
(Mosquera <i>et al.</i> , 2009)	100	34%
(Rajput <i>et al.</i> , 2007)	101	36 (36%)
(Winnes <i>et al.</i> , 2007)	50	18 (36%)
(Iljin <i>et al.</i> , 2006)	19	7 (37%)
(Yoshimoto <i>et al.</i> , 2006)	15	6 (40%)
(Nam <i>et al.</i> , 2007a)	26	11 (43%)
(Hermans <i>et al.</i> , 2006)	11	5 (46%)
(Mosquera <i>et al.</i> , 2007)	253	120 (48%)
(Perner <i>et al.</i> , 2006)	136	65 (48%)
(Perner <i>et al.</i> , 2007)	237	115 (48%)
(Tu <i>et al.</i> , 2007)	52	25 (48%)
(Nam <i>et al.</i> , 2007b)	165	81 (49%)
(Cerveira <i>et al.</i> , 2006)	34	17 (50%)
(Barry <i>et al.</i> , 2007)	32	17 (53%)
(Tomlins <i>et al.</i> , 2005)	29	16 (55%)
(Hessels <i>et al.</i> , 2007)	29	17 (59%)
(Wang <i>et al.</i> , 2006)	59	35 (60%)
(Mehra <i>et al.</i> , 2007b)	96	62 (65%)
(Lapointe <i>et al.</i> , 2007)	63	44 (70%)
(Clark <i>et al.</i> , 2007)	26	19 (73%)
(Soller <i>et al.</i> , 2006)	18	14 (78%)

4.3.4 Rôle du gène de fusion *TMPRSS2:ERG*

4.3.4.1 Etudes fonctionnelles *in vivo*

Pour étudier le rôle du gène de fusion *TMPRSS2:ERG in vivo*, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été établis (Tableau 4.3). L'expression d'une protéine ERG tronquée ou pleine longueur, l'expression de la protéine de fusion *TMPRSS2:ERG*, ou l'induction d'une recombinaison produisant la fusion *Tmprss2/Erg* chez la souris donne des résultats contradictoires, et semble capable, ou non, d'induire des lésions PIN chez la souris (Klezovitch *et al.*, 2008; Tomlins *et al.*, 2008; Carver *et al.*, 2009; King *et al.*, 2009; Zong *et al.*, 2009; Casey *et al.*, 2012; Baena *et al.*, 2013). Ces lésions PIN, considérées comme des lésions précancéreuses chez l'homme précédant de 5 à 10 ans le développement d'un cancer invasif (Montironi *et al.*, 2011; Merrimen *et al.*, 2013), ne sont pas capables d'induire la formation d'adénocarcinomes prostatiques chez ces souris. Ainsi, la surexpression du gène *ERG* ou du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* ne semble pas suffisante pour initier le développement d'un adénocarcinome de la prostate chez la souris.

Par ailleurs, étant donné que le gène de fusion *TMPRSS2:ERG*, ou le gène *ERG*, seul n'a que de faibles effets de transformation, plusieurs équipes ont étudié le rôle de cette fusion, en combinaison avec d'autres altérations génomiques fréquentes dans les cancers de la prostate, telles que la perte des gènes suppresseurs de tumeur *P53* et *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10) et la surexpression d'*AR* (présenté précédemment dans le Tableau 2.7) (Carver *et al.*, 2009; King *et al.*, 2009; Zong *et al.*, 2009). Bien que la surexpression de *ERG* associée à la perte de *P53* induise le développement de lésions PIN, ces deux altérations génomiques ensemble ne sont pas capables de former un adénocarcinome prostatique. En revanche, la surexpression de *ERG* agit en synergie avec des altérations dans la voie de signalisation *PI3K/AKT*, notamment la perte de *PTEN* ou la surexpression d'une forme *AKT* constitutivement active, pour former un adénocarcinome bien différencié. Par ailleurs, la surexpression de *ERG* et *AR* favorise le développement d'un adénocarcinome invasif plus faiblement différencié et plus agressif. Ainsi, ces résultats suggèrent que le gène de fusion *TMPRSS2:ERG*, plus particulièrement la surexpression du proto-oncogène *ERG* qui en résulte, coopère avec d'autres altérations génomiques pour initier le développement d'un adénocarcinome prostatique plus ou moins agressif.

**Tableau 4.3 : Modèles de souris transgéniques pour l'étude du rôle de la fusion
TMPRSS2:ERG et leurs phénotypes**

Référence de l'étude	Type de souris transgéniques	Phénotypes
(Klezovitch <i>et al.</i> , 2008; Tomlins <i>et al.</i> , 2008)	Protéines ERG humaines tronquées en N-terminale et spécifiquement exprimées dans la prostate grâce au promoteur du gène <i>Probasine</i> de rat	Développement de lésions PIN Rupture de la couche de cellules basales Aucun adénocarcinome prostatique
(Carver <i>et al.</i> , 2009; King <i>et al.</i> , 2009)	Protéines ERG humaines tronquées ou pleine longueur et spécifiquement exprimées dans la prostate grâce au promoteur du gène <i>Probasine</i> de rat	Pas de lésions PIN Aucun adénocarcinome prostatique
	Croisement des souris surexprimant le gène <i>ERG</i> pleine longueur avec des souris <i>Pten</i> ^{+/-}	Développement de lésions PIN invasives Adénocarcinomes multifocaux
(Zong <i>et al.</i> , 2009)	Injection orthotopique de cellules épithéliales prostatiques murines primaires (avec surexpression du gène <i>ERG</i> pleine longueur)	Développement de lésions PIN Aucun adénocarcinome prostatique
	Injection orthotopique de cellules épithéliales prostatiques murines primaires (avec surexpression du gène <i>ERG</i> pleine longueur, et perte de P53)	Développement de lésions PIN Aucun adénocarcinome prostatique (P53 seul développe des lésions PIN)
	Injection orthotopique de cellules épithéliales prostatiques murines primaires (avec surexpression du gène <i>ERG</i> pleine longueur, et altérations de la signalisation PI3K/AKT)	Développement de lésions PIN Adénocarcinomes bien différenciés (AKT seul développe des lésions PIN) (PTEN seul développe des lésions PIN, un adénocarcinome, et parfois des métastases)
	Injection orthotopique de cellules épithéliales prostatiques murines primaires (avec surexpression du gène <i>ERG</i> pleine longueur, et surexpression de AR)	Développement de lésions PIN Adénocarcinomes invasifs faiblement différenciés (AR seul ne forme pas de lésions hyperplasiques)
(Casey <i>et al.</i> , 2012)	Chromosome artificiel bactérien contenant le fragment génomique de TMPRSS2:ERG et la région promotrice du gène <i>TMPRSS2</i>	Pas de lésions PIN Aucun adénocarcinome prostatique
(Baena <i>et al.</i> , 2013)	Introduction de deux sites loxP dans les introns des gènes <i>Tmprss2</i> et <i>Erg</i> murin (chromosome 16), puis croisement de ces souris avec celles exprimant la Cre recombinase, entraînant la délétion de la région chromosomique entre les deux sites loxP (3Mb) et la formation du gène de fusion <i>Tmprss2:Erg</i> .	Pas de lésions PIN Aucun adénocarcinome prostatique

4.3.4.2 Coopération avec d'autres altérations génomiques

Un événement précoce dans les cancers de la prostate est l'altération génétique de la voie de signalisation PI3K/AKT, le plus souvent via la perte de fonction de *PTEN*, un gène suppresseur de tumeur qui régule négativement cette voie de signalisation (Li *et al.*, 1997). Les altérations génomiques concomitantes menant à la surexpression de ERG et à la perte de *PTEN* augmente la migration et l'invasion cellulaire, et favorise rapidement la progression de lésions PIN en cancer invasif (Carver *et al.*, 2009; King *et al.*, 2009; Zong *et al.*, 2009). La perte de fonction de la protéine MAG1 (Metastasis-Associated Gene 1) a également été observée dans le cancer de la prostate (Mahdian *et al.*, 2014). Cette protéine augmente la capacité de *PTEN* à réguler négativement la voie de signalisation PI3K/AKT. Ainsi, la perte de fonction de MAG1 réplique le phénotype observé lors de la perte de fonction de *PTEN*. L'association de ces deux altérations génomiques, le réarrangement *TMPRSS2:ERG* et la perte de *PTEN*, a été démontrée dans des cohortes de cancers de la prostate humains, et peut être associée à un mauvais pronostic (Yoshimoto *et al.*, 2008; Carver *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2010; Bismar *et al.*, 2011), plus particulièrement lorsque la perte de fonction de *PTEN* s'effectue par un mécanisme de délétion chromosomique (Leinonen *et al.*, 2013; Nagle *et al.*, 2013).

Par ailleurs, grâce à la technique de ChIP-seq, un réseau complexe d'interactions transcriptionnelles a été révélé entre le facteur de transcription ERG et le récepteur aux androgènes AR (Wei *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Chng *et al.*, 2012). En outre, la signalisation AR est cruciale pour la différenciation spécifique de l'épithélium prostatique, et ERG est capable de perturber cette différenciation et de maintenir les cellules dans un état dédifférencié (Sun *et al.*, 2008). Cette perturbation peut s'effectuer par différents mécanismes, incluant une interaction physique avec la protéine AR ou une fixation directe sur l'ADN via le domaine ETS, soit au niveau du promoteur d'AR, soit au niveau des promoteurs de ses gènes cibles (Yu *et al.*, 2010; Chng *et al.*, 2012). Lorsque ERG se fixe sur l'ADN au niveau des promoteurs des gènes cibles d'AR, il peut recruter des corépresseurs transcriptionnels, tels que HDAC1-3 et EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), pour former un complexe répressif, et atténuer la transcription régulée par les androgènes et notamment impliquée dans la différenciation épithéliale (Yu *et al.*, 2010; Chng *et al.*, 2012). De plus, l'inhibition de ERG dans des cellules tumorales prostatiques conduit à l'induction de AR, et à l'inversion du programme transcriptionnel induit par ERG. Par exemple, ERG et AR sont capables de se lier

aux promoteurs de *PSA*, *SLC45A3*, *TFF3* (Trefoil Factor 3) et *Prostéine*, et de respectivement réprimer ou induire leur transcription (Wright *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2008; Rickman *et al.*, 2010). Un autre exemple est celui du facteur de transcription et oncogène MYC (Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog), dérégulé dans de nombreux cas de cancers de la prostate. Une activation de ce facteur MYC par le facteur de transcription ERG a été observée grâce à l'utilisation de siRNA, et est liée à une augmentation de la survie cellulaire, de l'invasion, de l'indépendance aux androgènes et de la récurrence biochimique (Sun *et al.*, 2008). L'inhibition de ERG est capable d'induire le recrutement d'AR au niveau du promoteur de MYC, et bloque son activité transcriptionnelle (Bernard *et al.*, 2003; Hawksworth *et al.*, 2010).

Par ailleurs, deux autres altérations génomiques ont été rapportées dans des cas de cancers de la prostate. D'une part, la perte de fonction du facteur de transcription NKX3.1 (NK3 homeobox 1), un autre gène suppresseur de tumeur connu dans la prostate, conduit à une prolifération accrue des cellules épithéliales (Chen *et al.*, 2002). NKX3.1 régule négativement la fusion TMPRSS2:ERG (Sreenath *et al.*, 2011), et est essentiel pour la différenciation précoce de la prostate (Abate-Shen *et al.*, 2008). Ainsi, la perte de fonction de ce facteur coopère avec le réarrangement TMPRSS2:ERG dans la tumorigenèse prostatique (Chen *et al.*, 2002; Thangapazham *et al.*, 2014). D'autre part, l'expression de la protéine CRISP3 (Cysteine Rich Secretory Protein 3) est nettement augmentée dans un sous-groupe de cancers de la prostate possédant le réarrangement TMPRSS2:ERG et la perte de PTEN, et ces trois altérations génomiques ensemble peuvent indiquer un plus mauvais pronostic du cancer de la prostate (Ribeiro *et al.*, 2011; Grupp *et al.*, 2013; Al Bashir *et al.*, 2014).

4.3.4.3 Recherche de gènes cibles et de signatures génétiques associées *in vitro*

Des expériences de modulations d'expression du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* ont été effectuées dans différents types de lignées cellulaires prostatiques. L'inhibition de l'expression de ERG diminue la prolifération, la migration, et l'invasion dans les cellules VCaP, la seule lignée tumorale prostatique exprimant la fusion de manière endogène (Sun *et al.*, 2008; Tomlins *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). De plus, des expériences d'implantations orthotopiques de ces cellules réprimant le facteur de transcription ERG montrent un retard de croissance tumorale par rapport aux témoins (Wang *et al.*, 2008). Cependant, en accord avec les modèles de souris transgéniques précédemment présentés, l'expression ectopique du gène de fusion dans des cellules prostatiques normales immortalisées n'est pas en mesure d'induire

une transformation tumorale de ces cellules (Tomlins *et al.*, 2008), mais elle est suffisante pour favoriser la prolifération, la migration, et l'invasion *in vitro* (Klezovitch *et al.*, 2008; Tomlins *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Carver *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010).

Ainsi, afin de comprendre le rôle du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans le cancer de la prostate, des études s'intéressent désormais à identifier les gènes cibles du facteur de transcription ERG dans ce cancer. Ainsi, la surexpression de ERG dans des lignées cellulaires prostatiques augmente les capacités invasives via l'activation de deux gènes cibles directs de ERG, *PLAU* (*Plasminogen Activator, Urokinase*) et *PLAT* (*Plasminogen Activator, Tissue*), deux activateurs du plasminogène (Tomlins *et al.*, 2008). De plus, ce facteur de transcription régule également directement l'expression de plusieurs métalloprotéases matricielles, notamment MMP2, MMP3, MMP9 (Matrix Metallopeptidase) et ADAMTS1 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif 1) (Attiga *et al.*, 2000; Tomlins *et al.*, 2008; Carver *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2014), ainsi que de deux molécules impliquées dans le guidage axonal, PLXNA2 et PLXNB1 (Plexin A2 and B1) (Tian *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). L'expression de MMP9, PLXNB1 et PLXNA2 est significativement plus élevée dans les cancers de la prostate métastatiques, et est corrélée au groupe de patients exprimant la fusion, mais de manière intéressante, seules les protéines de guidage axonal, PLXNA2 et PLXNB1, semblent impliquées dans l'augmentation de la migration et de l'invasion des cellules tumorales prostatiques observée *in vitro* (Tian *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). Par ailleurs, la protéine de fusion *TMPRSS2:ERG* est également capable de réguler l'expression de IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor), un récepteur de facteur de croissance jouant un rôle clé dans la prolifération cellulaire et la tumorigenèse de la plupart des tumeurs malignes, via le recrutement de co-activateurs, et notamment le facteur de transcription Sp1 (Specific protein 1) (Meisel Sharon *et al.*, 2016). La surexpression de la protéine formant les microtubules, la tubuline β -III, a été associée à la fusion *TMPRSS2:ERG* et à la délétion de PTEN, particulièrement dans les tumeurs avec un haut score de Gleason (Tsourlakis *et al.*, 2014). *TMPRSS2:ERG* a également été montrée interagissant physiquement avec PARP1 (Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1) et avec la sous-unité catalytique de la DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase). Ils agissent comme des cofacteurs de ERG, impliqués dans l'invasion des cellules tumorales, et contribuent à endommager davantage l'ADN en induisant des cassures double brin (Brenner *et al.*, 2011). Une autre étude a montré que le facteur de transcription ERG module la signalisation de la prostaglandine PGE2 (Prostaglandin E2) dans les cellules tumorales prostatiques (Mohamed *et al.*, 2011), et notre équipe a identifié *COX2*

(*Cyclooxygenase 2*), pouvant inhiber la production de PGE₂, comme un gène cible direct de ERG (résultats non publiés). L'OPN, une glycoposphoprotéine de la matrice extracellulaire jouant un rôle clé dans la métastase de nombreux cancers, est également un gène cible direct du facteur de transcription ERG (Flajollet *et al.*, 2011). De manière intéressante, le récepteur de chimiokines CXCR4, impliqué dans les phénomènes de chimiotactisme, d'invasion des cellules tumorales prostatiques dans l'os et décrit dans la section 3.1.1 de l'introduction, est également un gène cible direct des protéines TMPRSS2:ERG, surexprimé dans 80% des cancers de la prostate primaires (Cai *et al.*, 2010; Singareddy *et al.*, 2013).

De récentes études ont identifié des signatures de gènes liés au facteur de transcription ERG dans des cohortes de patients atteints de cancers de la prostate, c'est-à-dire des gènes ou des voies de signalisation en aval de la surexpression de ERG potentiellement régulés par ce facteur, et qui pourraient expliquer comment ERG fonctionne pour promouvoir la progression de ce cancer (Setlur *et al.*, 2008; Gasi Tandefelt *et al.*, 2013; Barfeld *et al.*, 2014; Bismar *et al.*, 2014; Mochmann *et al.*, 2014; Rajan *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2016). Par exemple, une signature génétique de 36 gènes a été identifiée dans un sous-ensemble de cancers de la prostate primaires exprimant le gène de fusion *TMPPRSS2:ERG* et ayant un pronostic clinique particulièrement mauvais (Gasi Tandefelt *et al.*, 2013). Le *TGFβ* et d'autres gènes dépendant de cette signalisation font partie de cette signature et pourrait jouer un rôle dans le phénotype agressif de ces tumeurs.

4.3.5 Marqueur diagnostique et/ou pronostique

Le gène de fusion *TMPPRSS2:ERG* a une forte prévalence, principalement dans les cellules prostatiques tumorales. Ainsi, il est un bon candidat pour diagnostiquer le cancer de la prostate, mais également pour établir un pronostic d'évolution de ce cancer, compte tenu de sa présence à différents stades de la pathologie comme présenté dans la section 4.3.4. Cependant, l'utilisation de ERG en tant que marqueur diagnostique et/ou pronostique est encore largement débattu, compte tenu de la complexité de ses gènes cibles et des processus biologiques associés. En effet, des données contradictoires suggèrent une corrélation significative entre la présence du gène de fusion et des caractéristiques agressives de la maladie, associées à un mauvais pronostic (score de Gleason haut, stade clinique avancé, rechute biochimique...) (Perner *et al.*, 2006; Demichelis *et al.*, 2007; Mehra *et al.*, 2007b; Nam *et al.*, 2007a; Nam *et al.*, 2007b; Rajput *et al.*, 2007; Attard *et al.*, 2008; Spencer *et al.*,

2013; Teng *et al.*, 2013; Berg *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014), ou des caractéristiques associées plutôt à un bon pronostic (score de Gleason bas, survie sans progression...) (Petrovics *et al.*, 2005; Winnes *et al.*, 2007; Saramaki *et al.*, 2008; Darnel *et al.*, 2009b; Bismar *et al.*, 2012) (Tableau 4.4). En revanche, d'autres études suggèrent également qu'il n'existe aucune association significative avec des caractéristiques de bon ou mauvais pronostic (rechute biochimique, survie...) (Yoshimoto *et al.*, 2006; Lapointe *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2007; Rouzier *et al.*, 2008; Gopalan *et al.*, 2009; Falzarano *et al.*, 2010; Minner *et al.*, 2011; Toubaji *et al.*, 2011; Hoogland *et al.*, 2012) (Tableau 4.4). La divergence entre ces études pourrait être due à plusieurs facteurs, notamment la taille des cohortes (de 15 à 3261 cas), l'hétérogénéité des méthodes de collectes (prostatectomie radicale, résection transurétrale de la prostate ou biopsie diagnostique) ou de détection (RT-PCR, FISH ou séquençage), la conservation des tissus (paraffine ou congélation), ou encore les éventuels traitements reçus par les patients. Par ailleurs, la surexpression de ERG seule n'est pas suffisante pour induire un cancer de la prostate (voir sections 4.3.4.1 et 4.3.4.2 de l'introduction). Ainsi, le statut de ERG peut servir de marqueur pronostic, mais seul, il n'est pas nécessairement lié à une récurrence biochimique ou une diminution de la survie, il faudrait également évaluer le statut d'autres altérations génomiques, par exemple PTEN.

Les gènes de fusion *TMPRSS2:ERG* peuvent être détectés par qPCR dans les prélèvements urinaires de 42% des patients présentant un cancer de la prostate (Laxman *et al.*, 2006). Les résultats obtenus sont en corrélation avec les expériences de FISH sur les biopsies tissulaires de ces patients. Cependant, ERG n'est présent que dans la moitié des cas de cancers de la prostate, alors que d'autres marqueurs, et notamment AMACR (Alpha-Methylacyl-CoA Racemase) est présent dans environ 90% des cas (Yaskiv *et al.*, 2011). De plus, la détection des fusions ERG est très spécifique mais peu sensible pour le diagnostic, tant dans les prélèvements urinaires que dans les biopsies tissulaires (Hessels *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2015). Par ailleurs, le gène *PCA3* (*Prostate Cancer Gene 3*), produisant un ARN non-codant dont les fonctions sont encore largement inconnues, pourrait également constituer un marqueur prédictif du cancer de la prostate, détectable dans les prélèvements urinaires (Tallon *et al.*, 2014; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2015). Ainsi, l'utilisation d'une combinaison de ces marqueurs, détectables de manière non invasive dans l'urine des patients, pourrait constituer un bon complément au dosage sérique de PSA, et permettre le diagnostic précoce des cancers de la prostate (Lamy *et al.*, 2016).

Tableau 4.4 : Association pronostique du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans les cancers de la prostate

Adapté d'après (Kumar-Sinha *et al.*, 2008; Abou-Ouf *et al.*, 2016).

Référence de l'étude	Statut ERG	Nombre d'échantillons	Association pronostique
(Perner <i>et al.</i> , 2006)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	136	Tumeurs de haut grade Métastases aux ganglions lymphatiques
(Demichelis <i>et al.</i> , 2007)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	111	Métastases Mortalité
(Mehra <i>et al.</i> , 2007b)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	96	Stade clinique avancé
(Nam <i>et al.</i> , 2007a)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	26	Rechute après prostatectomie
(Nam <i>et al.</i> , 2007b)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	165	Rechute après prostatectomie
(Rajput <i>et al.</i> , 2007)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	196	Tumeurs moyennement à faiblement différenciées
(Attard <i>et al.</i> , 2008)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	445	Survie réduite
(Spencer <i>et al.</i> , 2013)	Expression de ERG	100	Rechute biochimique Métastases et Mortalité
(Teng <i>et al.</i> , 2013)	Expression de ERG	198	Stade clinique avancé Extension extra-prostatique
(Berg <i>et al.</i> , 2014)	Expression de ERG	265	Progression tumorale
(Huang <i>et al.</i> , 2014)	Expression de ERG	121	Score de Gleason haut Rechute biochimique
(Yoshimoto <i>et al.</i> , 2006)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	15	Aucune de manière significative
(Lapointe <i>et al.</i> , 2007)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	63	Aucune de manière significative
(Tu <i>et al.</i> , 2007)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	82	Aucune de manière significative
(Rouzier <i>et al.</i> , 2008)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	55	Aucune de manière significative
(Gopalan <i>et al.</i> , 2009)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	521	Aucune de manière significative
(Falzarano <i>et al.</i> , 2010)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	62	Aucune de manière significative
(Minner <i>et al.</i> , 2011)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	3261	Aucune de manière significative
(Toubaji <i>et al.</i> , 2011)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	344	Aucune de manière significative
(Hoogland <i>et al.</i> , 2012)	Expression de ERG	481	Aucune de manière significative
(Petrovics <i>et al.</i> , 2005)	Expression de ERG	114	Survie sans progression et Stade clinique bas Tumeurs bien à moyennement différenciées
(Winnes <i>et al.</i> , 2007)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	50	Score de Gleason bas Survie
(Saramaki <i>et al.</i> , 2008)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	253	Survie sans progression
(Darnel <i>et al.</i> , 2009b)	Fusion <i>TMPRSS2:ERG</i>	196	Score de Gleason bas
(Bismar <i>et al.</i> , 2012)	Expression de ERG	312	Survie sans progression et Score de Gleason bas Meilleure réponse aux hormonothérapies

4.3.6 Nouvelles thérapies potentielles ciblant ERG ou ses cofacteurs

Le facteur de transcription ERG résultant de la fusion joue un rôle dans plusieurs aspects de la biologie du cancer de la prostate, notamment dans l'agressivité de la maladie, et dérégule de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la différenciation, la croissance, la motilité, l'invasion, la formation de métastases, le contrôle épigénétique et l'inflammation. Etant donné la prévalence de la fusion TMPRSS2:ERG dans le cancer de la prostate, les protéines ERG et leurs cofacteurs offrent des cibles potentielles intéressantes pour de nouvelles thérapies.

Concernant le ciblage des cofacteurs, l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme PARP1 (Olaparib) réduit considérablement les capacités invasives des cellules exprimant la fusion (Brenner *et al.*, 2011). De plus, un autre inhibiteur de PARP1 (Rucaparib) sensibilise les cellules possédant à la fois le réarrangement chromosomique TMPRSS2:ERG et la perte de fonction de PTEN aux radiations à faible dose, produisant des dommages de l'ADN, une activation de la sénescence, et une réduction de la survie clonogénique (Chatterjee *et al.*, 2013). De même, l'inhibition d'autres partenaires de ERG, les HDAC, pourrait empêcher la progression du cancer de la prostate. En effet, des lignées cellulaires prostatiques exprimant ERG traitées avec des inhibiteurs de HDAC, notamment la Trichostatine A, montrent une inhibition de la prolifération et une induction de la mort cellulaire (Bjorkman *et al.*, 2008). En outre, l'inhibition de HDAC par l'utilisation d'un siRNA a empêché le transport nucléaire d'AR en le séquestrant dans le cytoplasme (Bjorkman *et al.*, 2008). L'utilisation d'un inhibiteur de HDAC diminue significativement l'expression de la fusion TMPRSS2:ERG, et augmente l'acétylation de P53, l'apoptose, et l'expression du gène de contrôle du cycle cellulaire *CDKN1A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*), induisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire et la sénescence (Fortson *et al.*, 2011).

D'autres inhibiteurs fonctionnent en ciblant directement le facteur de transcription ERG. La petite molécule inhibitrice YK-4-279 peut se lier directement à ERG, et inhiber son activité transcriptionnelle en interférant avec les interactions protéine-protéine plutôt qu'avec la liaison à l'ADN (Rahim *et al.*, 2011). Cette molécule a initialement été utilisée dans le sarcome d'Ewing dans lequel elle bloque l'interaction entre la protéine de fusion EWS:FLI1 et l'ARN hélicase A, inhibant ainsi la croissance tumorale (Erkizan *et al.*, 2009). Dans des lignées cellulaires tumorales prostatiques positives pour ERG, son inhibition diminue la motilité et l'invasion (Rahim *et al.*, 2011). Un autre inhibiteur DB1255 (di-thiophene-phenyl-

amidine) cible le site consensus 5'-GGAA/T-3' au niveau des promoteurs des gènes cibles de ERG, empêchant ainsi le domaine ETS de se lier à l'ADN (Nhili *et al.*, 2013).

La stabilité de la protéine ERG est un médiateur important de son activité oncogénique. En effet, l'enzyme dé-ubiquitinase USP9X (Ubiquitin Specific Peptidase 9, X-linked) est capable de dé-ubiquitiner et stabiliser la protéine ERG *in vitro*, jouant ainsi un rôle dans la progression du cancer de la prostate (Wang *et al.*, 2014b). Une inhibition de USP9X, par l'utilisation d'un siRNA ou d'un inhibiteur direct (WP1130), entraîne une ubiquitination et une dégradation accrue de la protéine ERG (Wang *et al.*, 2014b). Ainsi, cibler la protéine ERG pour diminuer sa stabilité et entraîner sa dégradation semble être un bon moyen de traitement potentiel. De plus, deux études récentes ont montré que l'ubiquitine ligase SPOP (Speckle-type POZ protein), mutée dans des cancers de la prostate n'exprimant pas de facteurs de transcription de la famille ETS (Barbieri *et al.*, 2012), se lie à ERG et entraîne sa dégradation protéosomique (An *et al.*, 2015; Gan *et al.*, 2015). La majorité des cancers de la prostate possédant les fusions TMPRSS2:ERG exprime une version tronquée de la protéine ERG, affectant sa capacité à se lier à SPOP, empêchant ainsi sa dégradation (An *et al.*, 2015; Gan *et al.*, 2015). Par ailleurs, de manière intéressante, de nouveaux peptides inhibiteurs de ERG (EIP, ERG inhibitory peptides) ont été développés et sont capables d'interagir spécifiquement avec le domaine ETS de liaison à l'ADN, de bloquer les interactions protéine-protéine et l'activation de la transcription, et d'entraîner une dégradation protéolytique de la protéine ERG dans les cellules tumorales prostatiques VCaP exprimant la fusion TMPRSS2:ERG de manière endogène (Wang *et al.*, 2017). Ils suppriment également la croissance tumorale, l'intravasation, et la formation de métastases *in vivo*. Ces EIP présentent également l'avantage de se lier préférentiellement à la version oncogénique tronquée du facteur de transcription ERG dans les cellules VCaP, contrairement à SPOP, alors qu'ils ne se lient pas au facteur ERG pleine longueur dans les cellules HUVEC.

Ainsi, cibler le facteur de transcription ERG ou ses cofacteurs dans le cancer de la prostate présente un potentiel thérapeutique important, mais d'autres études seront nécessaires afin d'améliorer leur faisabilité clinique, notamment en terme de spécificité.

5. PROJET DE THESE

Avec environ 71000 nouveaux cas en 2011, le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme en France métropolitaine. Une tumeur locale de la prostate est associée à une évolution lente de la maladie et une très bonne survie des patients. En revanche, les stades plus avancés de cancer de la prostate révèlent, dans environ 80% des cas, la présence de métastases osseuses caractéristiques, phase incurable et dévastatrice qui conduit à une morbidité et une mortalité élevées des patients (Rubin *et al.*, 2000; Logothetis and Lin, 2005).

La découverte de gènes de fusion, issus de remaniements chromosomiques, a ouvert une nouvelle voie dans la compréhension du processus de cancérisation de la prostate (Tomlins *et al.*, 2005; Rubin *et al.*, 2011). Ces gènes de fusion impliquent d'une part la partie promotrice non codante du gène *TMPRSS2* (*Transmembrane Protease Serine 2*), dont l'expression est hormono-dépendante (Lin *et al.*, 1999), et d'autre part la partie codante des gènes de la famille des facteurs de transcription ETS (E Twenty-Six), *ERG* (*ETS-Related Gene*) dans plus de 50% des cas (Kumar-Sinha *et al.*, 2008; Tomlins *et al.*, 2009). La présence de ce gène de fusion peut être associée à un mauvais pronostic (Perner *et al.*, 2006; Attard *et al.*, 2008; Tomlins *et al.*, 2009). Cependant, son rôle précis au cours de la cancérisation et de la progression du cancer de la prostate reste à déterminer. L'équipe d'accueil travaille, depuis longtemps, sur le rôle physiologique et pathologique des protéines ETS et a montré, ainsi que d'autres équipes, que le gène *Erg* est associé à la mise en place du cartilage et plus largement du squelette chez la souris (Dhordain *et al.*, 1995; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2000; Iwamoto *et al.*, 2007). Sachant que la fusion *TMPRSS2:ERG* existe dans plus de 50% des cas de cancer de la prostate, il est intéressant d'essayer de comprendre si ce gène de fusion, et ses gènes cibles, jouent un rôle important dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate.

L'équipe a ainsi mis en place plusieurs approches *in vitro* et *in vivo* pour comprendre le rôle des fusions dans l'évolution des cancers vers la formation des métastases osseuses. Parmi les lignées disponibles, les cellules PC3 sont des cellules épithéliales hormono-indépendantes isolées à partir d'une métastase osseuse vertébrale d'un patient souffrant de cancer de la prostate. Les PC3c dérivent des cellules PC3 et ont été obtenues par l'équipe du

docteur Philippe Clézardin avec qui nous collaborons (INSERM U1033 Lyon) (Fradet *et al.*, 2013). Contrairement aux cellules PC3, qui induisent des métastases purement ostéolytiques lors d'implantation intra-tibiale chez les souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency), les cellules PC3c provoquent efficacement des métastases osseuses de type mixte, ostéolytiques et ostéoblastiques. Elles reflètent ainsi mieux le phénotype des métastases osseuses observées chez les patients. Ces deux lignées de cellules cancéreuses prostatiques sont fusion-négatives et n'expriment pas le gène *ERG* endogène. Parmi les ARN messagers issus de la fusion, la forme T1E4 est la plus fréquente. Il s'agit d'une fusion de l'exon 1 du gène *TMPRSS2* (non codant) et l'exon 4 du gène *ERG* (codant) (Clark *et al.*, 2007; Tomlins *et al.*, 2009), correspondant à une protéine ERG tronquée des 32 premiers acides aminés. Cette construction a été choisie pour réaliser des clones stables de surexpression variable à partir de la lignée PC3c. Trois types de clones ont été retenus en fonction du niveau d'expression de la fusion : les PC3c-T1E4-L (Low), -T1E4-M (Medium) et -T1E4-H (High).

Leur caractérisation phénotypique et transcriptomique a permis de montrer que l'expression de la fusion augmente leurs capacités d'invasion et de migration cellulaires et modifie l'expression de nombreuses catégories de gènes (Tian *et al.*, 2014). Pour aller plus loin, en collaboration avec le docteur Edith Bonnelye, ces clones cellulaires ont été utilisés dans un modèle d'induction de métastases osseuses par injection intra-tibiale chez les souris SCID. Cette expérience a montré que l'expression de la fusion est associée à une augmentation du phénotype ostéocondensant des métastases induites, phénotype majoritairement observé chez l'homme (Delliaux *et al.*, Soumis).

L'objectif de ma thèse était d'identifier, dans l'étude transcriptomique précédemment publiée par l'équipe (Tian *et al.*, 2014), des gènes exprimés par les cellules tumorales fusion-positives et qui participent au tropisme et/ou au phénotype des métastases ostéocondensantes du cancer de la prostate.

Plusieurs gènes ont ainsi été étudiés afin de répondre aux questions suivantes :

- 1- L'expression de ces gènes est-elle pertinente dans la pathologie humaine ?
- 2- Existe-t-il une régulation transcriptionnelle par le facteur de transcription ERG ?
- 3- Quel est le rôle de ces gènes dans le tropisme et/ou le phénotype des métastases ostéocondensantes du cancer de la prostate ?

Dans les parties suivantes, nous aborderons d'abord la caractérisation des métastases osseuses induites par les cellules PC3-TMPRSS2:ERG et PC3c-TMPRSS2:ERG lors de l'implantation intra-tibiale chez la souris. Trois nouveaux gènes cibles directs des protéines TMPRSS2:ERG ont été mis en évidence : *ET-1* (*Endothelin-1*), *ALPL* (*Alkaline Phosphatase Liver/Bone/Kidney*) et *COL1A1* (*Collagen Type 1 Alpha 1*). Ensuite, nous aborderons l'étude de deux autres gènes, *FSCN1* (*Fascin 1*) et *HCAR1* (*Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1*) modulés par la fusion TMPRSS2:ERG dans les cellules PC3c.

II. RESULTATS

**6. CARACTERISATION DES METASTASES OSSEUSES
INDUITES PAR LES CELLULES PC3-TMPRSS2:ERG ET
PC3c-TMPRSS2:ERG LORS DE L'IMPLANTATION
INTRA-TIBIALE CHEZ LA SOURIS.**

Publication N°1 (en annexe)

***TMPPSS2:ERG* gene fusion expression enhances
the osteoblastic phenotype of prostate cancer bone metastases.**

**DELLIAUX C.*, TIAN V.T.*, BOUCHET M., FRADET A., VANPOUILLE N.,
FLOURENS A., DEPLUS R., VILLERS A., LEROY X., CLEZARDIN P.,
DE LAUNOIT Y., BONNELYE E., DUTERQUE-COQUILLAUD M.**

*Co-first authors

Submitted for publication in *Cancer Research* on 24th February 2017

7. ETUDE DE GENES MODULES PAR LA FUSION

TMPRSS2:ERG DANS LES CLONES PC3c

Le point de départ de cette étude est la publication par l'équipe d'une étude transcriptomique réalisée sur les clones PC3c-T1E4-L (Low), -M (Medium) et -H (High) (Tian *et al.*, 2014). Celle-ci a en effet permis l'obtention de listes de gènes dont l'expression est modulée en fonction de l'expression de la fusion T1E4 et donc, en fonction de l'expression du facteur de transcription ERG. Ces listes contiennent environ 2000 gènes, mais, dans un premier temps, nous les avons restreintes à une liste d'environ 120 gènes modulés faiblement dans le clone -L, moyennement dans le clone -M et fortement dans le clone -H. Ces 120 gènes ont une expression « dose-dépendante » par rapport à l'expression de la fusion T1E4 et donc du facteur de transcription ERG, ce qui en fait des gènes cibles potentiels directs du facteur de transcription ERG.

Au début de la thèse, le choix des gènes à étudier parmi la liste restreinte de 120 gènes s'est fait sur deux critères : (1) leur régulation transcriptionnelle potentielle par le facteur de transcription ERG et (2) leur pertinence dans le cancer de la prostate et les métastases osseuses associées. Ainsi, afin d'étudier le rôle de la fusion dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate, deux gènes ont été choisis et seront décrits dans les deux parties suivantes : *FSCN1* (*Fascin 1*) et *HCAR1* (*Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1*).

7.1 Etude de FSCN1 (Fascin 1)

Lors de l'étude transcriptomique publiée par l'équipe (Tian *et al.*, 2014), le gène *FSCN1* est surexprimé dans les clones PC3c-T1E4-L, -M, et -H par rapport au clone contrôle -pcDNA, et de manière dépendante de la quantité de ERG surexprimée dans ces clones. Ce gène répond donc à notre premier critère de sélection, nous avons alors effectué une revue bibliographique de la littérature afin d'évaluer la pertinence de ce gène dans le sujet de cette thèse, c'est-à-dire la recherche de gènes cibles des protéines de fusion TMPRSS2:ERG, et leur rôle dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate.

7.1.1 Revue bibliographique

Les fascines sont des protéines globulaires de liaison et de regroupement d'actine d'approximativement 55 kDa, identifiées à partir d'extraits cytoplasmiques d'ovocytes et de coelomocytes d'oursins marins dans les années 1970 (Bryan and Kane, 1978; Otto *et al.*, 1979). Elles sont hautement conservées tout au long de l'évolution. Les génomes des vertébrés en codent trois formes : la fascine 1 (FSCN1 ou fascine, la plus étudiée) largement exprimée dans les tissus mésenchymateux et nerveux, la fascine 2 (FSCN2) et la fascine 3 (FSCN3) spécifiquement exprimées dans la rétine et les testicules, respectivement (Jayo and Parsons, 2010). Seule la première forme, la fascine 1, sera décrite ci-après.

7.1.1.1 Structure et expression

Chez l'homme, le gène *FSCN1* se situe sur le chromosome 7p22, et code un polypeptide de 493 acides aminés dont la séquence est différente des autres protéines de regroupement d'actine (Adams, 2004). La protéine FSCN1 s'organise en quatre domaines en feuillet bêta plissé et contient deux sites de liaison à l'actine, localisés en N- et C-terminal de la protéine, facilitant ainsi l'efficacité de regroupement entre les filaments d'actine adjacents.

Au cours du développement embryonnaire chez la souris, l'expression de FSCN1 est principalement retrouvée au niveau de régions de différenciation et de migration cellulaire très actives telles que le système nerveux, les somites en développement, ou encore le mésenchyme (De Arcangelis *et al.*, 2004). Chez l'homme, l'expression de FSCN1 au cours du développement embryonnaire est similaire à celle décrite chez la souris ; dans les tissus adultes, on la retrouve dans les cellules endothéliales vasculaires, les cellules neuronales, les fibroblastes et les cellules dendritiques (Zhang *et al.*, 2008). En fait, l'expression de cette

protéine est décrite comme hautement tissu-spécifique, cellule-spécifique, et temps-spécifique au cours du développement et de la croissance chez l'homme. En revanche, dans les cellules épithéliales normales, FSCN1 est absente, comme dans l'épithélium du canal biliaire, du sein, du côlon, de l'ovaire, du pancréas et de l'estomac, ou présente à très faible niveau, comme dans celui de la peau et de l'œsophage (Hashimoto *et al.*, 2005).

7.1.1.2 Implications physiologiques

FSCN1 agit en coordination avec la polymérisation de l'actine. Elle est un régulateur clé du cytosquelette qui, en se liant à deux molécules d'actine, permet le regroupement parallèle des filaments d'actine (notés F-actine), de manière très ordonnée et étroitement serrée. Ce regroupement est nécessaire à la formation d'une large gamme de structures transitoires et dynamiques à base d'actine de deux formes principales : les protrusions cellulaires corticales et les faisceaux de microfilaments cytoplasmiques. Les structures corticales, incluant les filopodes, les lamellipodes, les microvillosités et les dendrites, ont des fonctions d'adhésion matricielle, d'interactions cellulaires et de motilité, de migration et d'invasion cellulaire, alors que les faisceaux d'actine cytoplasmiques semblent participer à l'architecture cellulaire (Kureishy *et al.*, 2002). Cette protéine est donc impliquée dans le remodelage du cytosquelette, les adhésions cellule-matrice, les interactions cellulaires, la migration cellulaire ainsi que l'invasion, et contribuent à l'architecture cellulaire et aux mouvements intracellulaires.

Dans les cellules dendritiques, par exemple, FSCN1 est absente des cellules immatures, mais est très hautement régulée dans les cellules matures (Mosialos *et al.*, 1996). Les cellules dendritiques sont des cellules sentinelles du système immunitaire, largement distribuées dans le sang périphérique, la circulation lymphatique et les tissus solides. Après le contact avec l'antigène, les cellules dendritiques immatures migrent vers les ganglions lymphatiques drainants où elles deviennent des cellules dendritiques matures capables de présenter l'antigène traité aux lymphocytes T lors de la réponse immunitaire primaire (Kureishy *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2011). Les cellules dendritiques matures sont caractérisées par de nombreuses projections dynamiques longues appelées dendrites, qui contiennent à la fois F-actine et FSCN1. L'expression de FSCN1 est nécessaire pour la formation des dendrites au cours de la maturation cellulaire, la migration des cellules dendritiques et l'activité présentatrice d'antigène des cellules dendritiques, c'est-à-dire l'activation des cellules T (Ross *et al.*, 1998). D'ailleurs, l'expression de FSCN1 est utilisée

comme un marqueur de maturation fiable des cellules dendritiques, facilitant ainsi l'identification et la quantification de ces cellules dans des échantillons de tissus.

Chez la souris, l'inactivation du gène *Fscn1* donne des embryons viables et une létalité néonatale de 48% ; les souris survivantes ont un poids corporel réduit (Yamakita *et al.*, 2009). À ce jour, les phénotypes majeurs détectés chez ces souris sont des altérations spécifiques du système nerveux central mais les conséquences pathologiques ou comportementales de ces défauts sont encore inconnues.

7.1.1.3 Implications pathologiques dans les cancers

La métastase est la principale cause de mortalité liée au cancer et, au niveau cellulaire, FSCN1 a pour effet majeur de promouvoir la migration et l'invasion des cellules de carcinome en culture. Ceci est associé à un potentiel invasif et métastatique plus élevé dans plusieurs modèles de xénogreffes tumorales chez la souris (Tan *et al.*, 2013).

Au cours des 10 dernières années, des études *in vitro*, *in vivo* et cliniques ont impliqué FSCN1 comme nouveau biomarqueur candidat pour l'identification précoce des carcinomes les plus agressifs avec un potentiel métastatique, et ceci pour les carcinomes du canal biliaire, de la vessie, du cerveau, du sein, du colorectum, de l'endomètre, du rein, du foie, du poumon, du cou, de l'œsophage, du pharynx, de l'ovaire, du pancréas, de l'estomac et de la prostate (Tan *et al.*, 2013). En effet, ces études montrent que l'absence ou la faible expression de FSCN1 dans les épithéliums normaux est radicalement altérée dans de nombreux carcinomes humains et est corrélée à un mauvais pronostic. De plus, FSCN1 a été associée à un risque accru de mortalité, de progression de la maladie, et de métastases ganglionnaires et à distance dans certains de ces cancers (Kulasingam and Diamandis, 2013; Tan *et al.*, 2013).

Ainsi, FSCN1 est un élément clé dans la motilité cellulaire et l'invasion, un marqueur pronostique potentiel mais également une cible potentielle pour le développement d'inhibiteurs spécifiques pour le traitement de la maladie métastatique. D'ailleurs, récemment, une petite molécule, la migrastatine, a été identifiée pour cibler FSCN1 (Chen *et al.*, 2010). La migrastatine et ses analogues étaient déjà connus pour inhiber la croissance et la migration des cellules tumorales mammaires chez la souris, mais le mécanisme d'action était inconnu. Désormais, les données montrent que la migrastatine se lie à FSCN1, au niveau du site de liaison à l'actine situé en C-terminal, et inhibe ainsi le regroupement des filaments d'actine *in vitro*, et l'invasion *in vivo*. Ceci a particulièrement augmenté l'intérêt de FSCN1 comme cible thérapeutique potentielle (Jayo and Parsons, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013).

L'invasion des cellules tumorales à travers les différents tissus dépend de la capacité de ces cellules à franchir la membrane basale et à dégrader la matrice extracellulaire. Ce processus de dégradation s'effectue au niveau de structures particulières, de podosomes spécialisés, appelés les invadopodes (Figure 7.1). Ce sont des régions de réorganisation du cytosquelette d'actine au niveau desquelles s'accumulent également diverses métalloprotéases, telles que MMP2, MMP9 ou encore MT1-MMP (Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase 1), capables de dégrader la matrice extracellulaire (Murphy and Courtneidge, 2011). Plusieurs autres protéines ont déjà été décrites pour jouer un rôle lors de l'initiation, de l'assemblage, puis de la maturation de ces structures. En particulier, FSCN1 est d'ores et déjà connu pour être une protéine de regroupement de F-actine, impliquée dans le but de stabiliser la structure lors de l'étape d'assemblage.

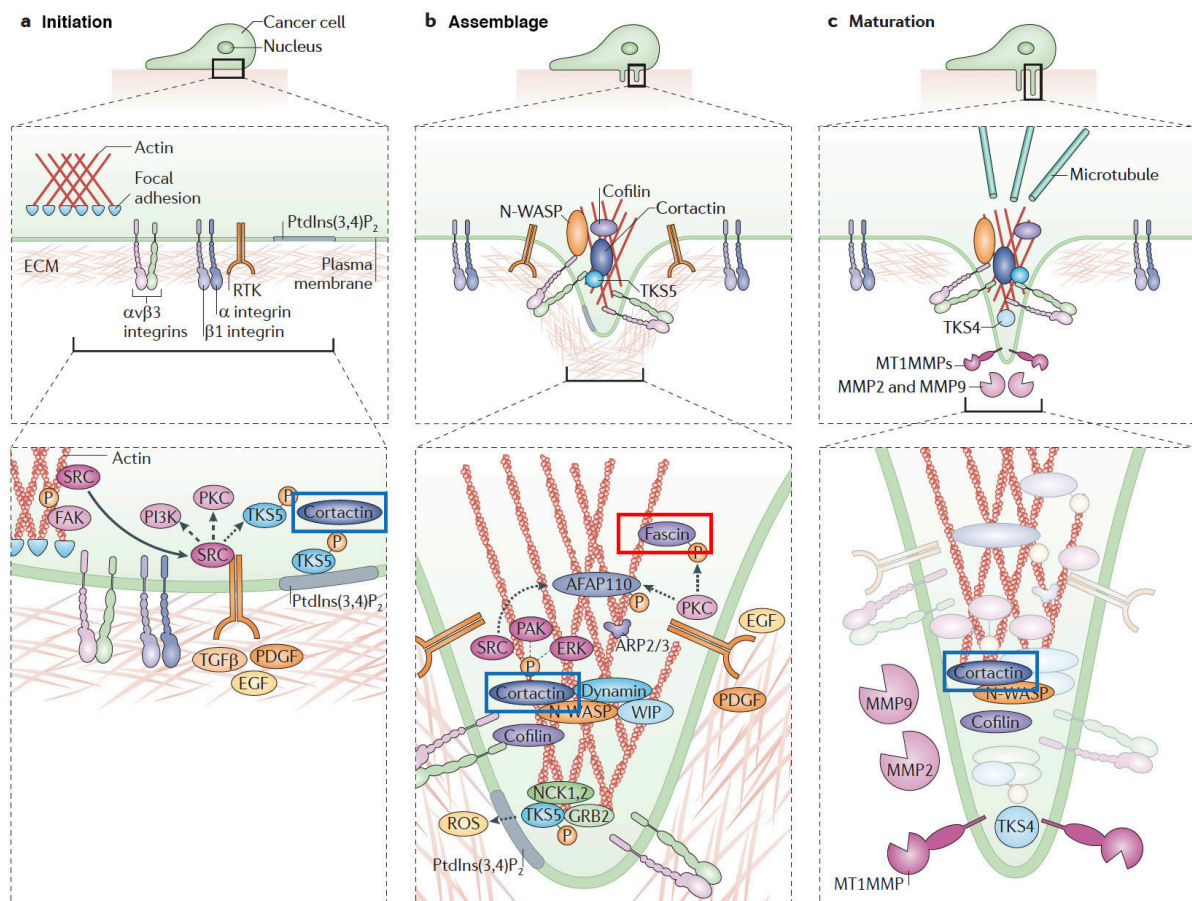


Figure 7.1 : Les étapes de formation des invadopodes

Ces étapes sont représentées sur trois niveaux : la forme de base de la structure par rapport à la cellule (en haut), une représentation simple des protéines clés par rapport à la membrane cellulaire (au milieu), et un aperçu moléculaire plus détaillé (en bas). Adapté d'après (Murphy and Courtneidge, 2011).

7.1.1.4 Implications pathologiques dans le cancer de la prostate et ses métastases osseuses

Les études de FSCN1 dans le cancer de la prostate et ses métastases osseuses associées restent peu nombreuses. En 2009, une première étude a montré que cette protéine est exprimée dans les cellules épithéliales tumorales de cancers de la prostate primaires et, de manière plus intense, dans les cancers de la prostate résistants à la castration, par rapport au tissu sain (Darnel *et al.*, 2009a). Cette expression est associée à une rechute biochimique du taux de PSA après une prostatectomie radicale, ce qui signifie une évolution clinique plus agressive de la maladie. FSCN1 est ainsi impliquée dans la progression du cancer de la prostate et pourrait constituer un marqueur pronostique ou une cible thérapeutique pour les cancers de la prostate agressifs résistants à la castration.

D'une part, *in vitro*, une inhibition de l'expression de FSCN1, par l'utilisation d'un siRNA spécifique (Darnel *et al.*, 2009a), ou par la restauration du miR-145 (Fuse *et al.*, 2011), diminue la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire et augmente les propriétés adhésives des cellules tumorales prostatiques. Le miR-145 est un microARN, petit ARN non codant, régulant l'expression de FSCN1 au niveau post-transcriptionnel. Il est régulé négativement dans de nombreux carcinomes, dont le cancer de la prostate, et fonctionne comme un suppresseur de tumeur. De manière intéressante, l'implication de FSCN1 dans les propriétés invasives des cellules tumorales prostatiques peut s'expliquer par son rôle, avec la cortactine, une autre protéine impliquée dans les trois étapes d'initiation, d'assemblage et de maturation, dans la formation d'invadopodes, de petites protrusions riches en actine (Figure 7.1) (Van Audenhove *et al.*, 2014). En effet, en perturbant le regroupement de F-actine par FSCN1, les auteurs ont démontré l'importance de la stabilisation des faisceaux d'actine dans l'organisation et le renouvellement des invadopodes, la dégradation de la matrice extracellulaire, et l'invasion des cellules tumorales. D'autre part, *in vivo*, l'implantation orthotopique chez la souris de cellules dépourvues de FSCN1, directement dans la prostate, a montré une diminution significative de la croissance et de la formation des métastases ganglionnaires par rapport aux cellules contrôles (Darnel *et al.*, 2009a).

Récemment, en utilisant des modèles de xénogreffes de cellules humaines ostéoinductives de cancer de la prostate provenant d'une métastase osseuse, une signature moléculaire a été mise en évidence dans le stroma des métastases osseuses ostéocondensantes ainsi induites (Ozdemir *et al.*, 2014). En effet, les cellules cancéreuses de la prostate colonisent préférentiellement l'os (ostéotropisme), où elles altèrent l'équilibre physiologique

entre la formation osseuse médiée par les ostéoblastes et la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes, et provoquent une réponse ostéoblastique (ostéoinduction). Cependant, les signaux moléculaires fournis par les ostéoblastes pour la survie et la croissance des cellules métastatiques osseuses du cancer de la prostate sont largement inconnus. De manière intéressante, le gène le plus surexprimé dans cette signature moléculaire est *FSCN1*. Or dans les cancers solides, *FSCN1* a été principalement associée aux cellules cancéreuses et son expression stromale a été négligée. Pour la première fois, l'expression de *FSCN1* n'est retrouvée ni dans les cellules tumorales du cancer de la prostate primaire, ni dans les cellules tumorales de la métastase osseuse, ce qui est en contradiction avec la littérature (Darnel *et al.*, 2009a). De manière remarquable, dans la métastase osseuse, elle est induite *de novo* dans les ostéoblastes, les ostéocytes, ainsi que les CAF (Cancer Associated Fibroblast). *FSCN1* pourrait ainsi constituer un biomarqueur candidat pour la métastase osseuse ostéoblastique.

7.1.2 Résultats

Nous avons ainsi choisi d'étudier *FSCN1* dans la formation des métastases osseuses associées au cancer de la prostate en raison (1) de sa régulation transcriptionnelle potentielle par le facteur de transcription ERG, et (2) de la revue bibliographique présentée ci-avant. En effet, *FSCN1* est impliquée dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaire dans de nombreux carcinomes, dont le cancer de la prostate, ainsi que dans l'agressivité de la maladie et les métastases.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression et la régulation transcriptionnelle de *FSCN1* dans des lignées cellulaires tumorales prostatiques, puis son rôle dans la migration et l'invasion *in vitro*, et enfin, nous nous sommes intéressés à son expression dans la pathologie humaine du cancer de la prostate et ses métastases.

7.1.2.1 Expression et régulation transcriptionnelle de *FSCN1* dans des lignées cellulaires tumorales prostatiques

Nous avons débuté cette étude *in vitro*, dans les clones cellulaires PC3c. L'expression de *FSCN1* a d'abord été mesurée par RT-qPCR permettant ainsi d'observer une surexpression, dose-dépendante par rapport à la quantité de *ERG* (Figure 9.1A en annexe), dans les clones PC3c-T1E4-L (7,6 fois), -M (17 fois) et -H (67,7 fois) par rapport au clone contrôle -pcDNA (Figure 7.2A). Ces résultats confirment ceux de notre étude transcriptomique dans les clones PC3c-T1E4-L (2,1 fois), -M (3,1 fois) et -H (5,7 fois) par

rapport au clone contrôle -pcDNA, bien que le différentiel soit plus grand lorsqu'il est mesuré par RT-qPCR. Un western blot réalisé à partir d'extraits protéiques cellulaires a ensuite permis d'observer le même profil d'expression (Figure 9.1B en annexe ; Figure 7.2B). Enfin, dans le clone PC3c-T1E4-H, l'utilisation d'un siRNA inhibant l'expression de *ERG* de 80% (Figure 9.1C en annexe) diminue l'expression de *FSCN1* de plus de 50% au niveau ARN (Figure 7.2C). Ainsi, il semble exister un lien direct entre l'expression de *ERG* et l'expression de *FSCN1* dans les clones PC3c. En effet, en présence de T1E4, *FSCN1* est surexprimée de manière dépendante de la quantité de *ERG*, alors qu'en absence de *ERG*, suite à l'utilisation d'un siRNA, *FSCN1* est inhibée.

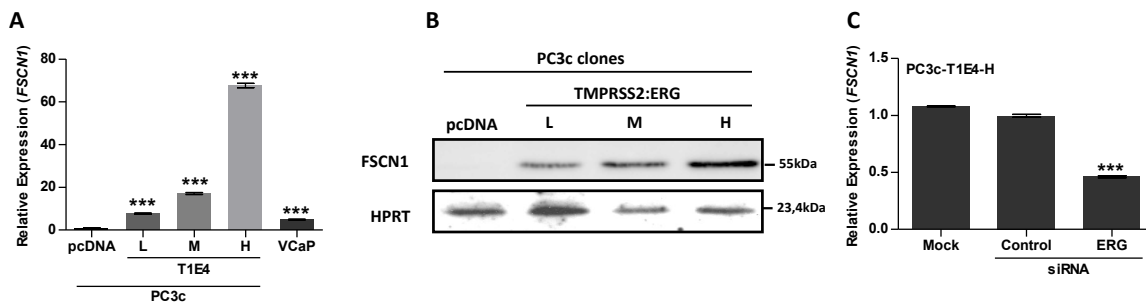


Figure 7.2 : Expression de *FSCN1* dans les clones PC3c androgéno-indépendants surexprimant la fusion de manière ectopique

A, Expression de *FSCN1* analysée par RT-qPCR dans les clones PC3c-pcDNA contrôle, PC3c-T1E4-L, -M et -H exprimant différents niveaux de la fusion T1E4 (L : Low, M : Medium, H : High). *** $P < 0,001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test. **B**, Expression de *FSCN1* analysée par WB dans les clones PC3c-pcDNA contrôle, PC3c-T1E4-L, -M et -H. L'anticorps spécifique de HPRT a été utilisé comme contrôle d'équilibrage. **C**, Expression de *FSCN1* analysée par RT-qPCR dans les cellules PC3c-T1E4-H traitée avec un siRNA contrôle ou spécifique de *ERG*. Le niveau d'expression des cellules traitées avec le siRNA contrôle a été normalisé à 1. *** $P < 0,001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test.

Les observations précédentes nous confortent dans l'hypothèse d'une régulation directe de *FSCN1* par le facteur de transcription *ERG* dans ce modèle d'étude PC3c. Une étude *in silico* de la partie promotrice de ce gène, utilisant les logiciels ECRBrowser et Mulan, a permis d'identifier quatre sites de fixation de *ERG* (EBS, ETS Binding Site) potentiels conservés entre l'homme, le singe et la souris. Nous avons ensuite choisi deux paires d'oligonucléotides, ciblant respectivement trois des sites de fixation en raison de leur proximité (*FSCN1*-1 ; -2620 pb du TSS), ou un seul site (*FSCN1*-2 ; -2445 pb du TSS) (Figure 7.3A). Pour tester l'hypothèse d'une régulation directe de *FSCN1* par le facteur de transcription *ERG*, nous avons réalisé des expériences de ChIP. Lorsque nous avons utilisé

l'anticorps spécifique de ERG pour l'immunoprécipitation dans le clone PC3c-T1E4-H, nous avons pu mettre en évidence par PCR une fixation de ERG sur l'un des sites de fixation FSCN1-1, contenant trois EBS potentiels (Figure 7.3B). En revanche, le site de fixation potentiel FSCN1-2 ne semble pas permettre la fixation de ERG. Nos résultats suggèrent que le facteur de transcription ERG est capable de se fixer sur la partie promotrice de *FSCN1*, sur un ou plusieurs EBS à -2620 pb du TSS. Une expérience de qChIP devra confirmer et compléter de manière plus quantitative cette observation.

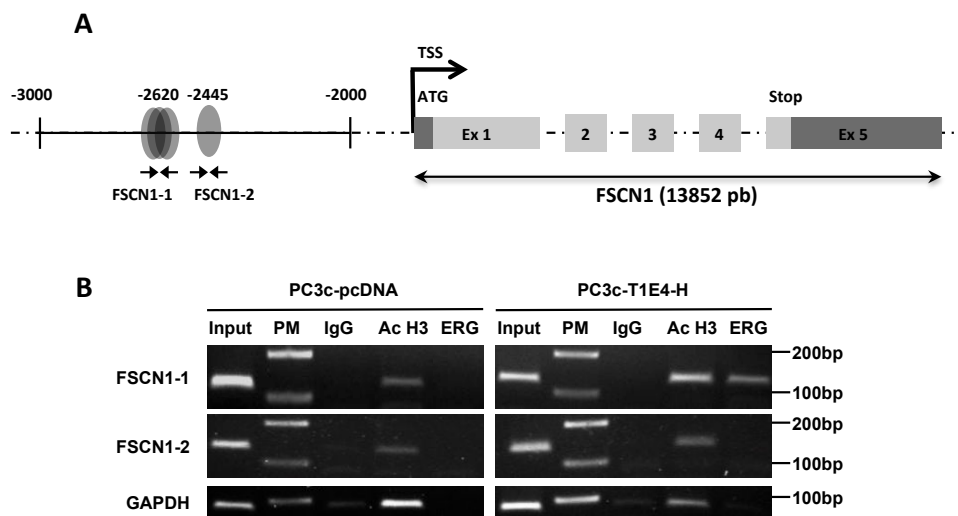


Figure 7.3 : Fixation de ERG sur le locus *FSCN1* dans les cellules PC3c-T1E4-H

A, Schéma du gène *FSCN1* et sa partie promotrice. Quatre sites potentiels de fixation de ERG (EBS) (ovales gris) ont été identifiés sur la région promotrice du gène et deux couples d'oligonucléotides ont été choisis pour le ChIP (flèches noires). Les séquences codant le 5'UTR (gris foncé), la séquence codante (gris clair) et le 3'UTR (gris foncé) de l'ARNm sont représentées, ainsi que les 5 exons et 4 introns présents sur la séquence génique. **B**, ChIP-PCR réalisé pour tester la fixation de ERG dans les clones PC3c-T1E4-H et PC3c-pcDNA contrôle avec les anticorps ERG, AcH3 et IgG. PM : Poids Moléculaire.

Un deuxième modèle cellulaire a ensuite été utilisé. Les cellules VCaP, isolées d'une métastase osseuse d'un patient atteint de cancer de la prostate, constituent la seule lignée cellulaire possédant la fusion *TMPRSS2:ERG* de manière endogène. Elles expriment également un AR fonctionnel, leur conférant des caractéristiques d'hormono-dépendances (Korenchuk *et al.*, 2001). Le gène codant la protéine FSCN1 est exprimé dans les cellules VCaP (4,9 fois plus par rapport au clone contrôle PC3c-pcDNA) (Figure 7.2A). Dans ces cellules, l'expression du gène de fusion, sous contrôle de la région promotrice du gène *TMPRSS2* contenant des éléments de réponse aux androgènes, est androgéno-dépendante et peut être augmentée avec un traitement par les androgènes (Tomlins *et al.*, 2005). Ainsi, afin

d'évaluer si l'expression de *FSCN1* est modulée suite à une augmentation de l'expression de la fusion, nous avons traité les cellules VCaP avec des androgènes, en particulier de la 5 α -dihydrotestostérone (DHT) à 10nM pendant 16 heures. Comme attendu, ce traitement a entraîné une augmentation d'expression de *ERG* d'environ 7 fois par rapport aux cellules VCaP non traitées (Figure 9.1A et C en annexe). De manière étonnante, ce traitement a entraîné une diminution d'expression de *FSCN1* d'environ 80% par rapport aux cellules VCaP non traitées (Figure 7.4A et C). D'autre part, quand l'expression endogène du gène de fusion est inhibée par l'utilisation d'un siRNA dirigé contre *ERG* et efficace à 75% (Figure 9.1B et C en annexe), l'expression de *FSCN1* demeure inchangée (Figure 7.4B et C). Ainsi, la modulation de l'expression du gène de fusion endogène n'a pas d'influence sur l'expression du gène *FSCN1* dans les cellules VCaP.

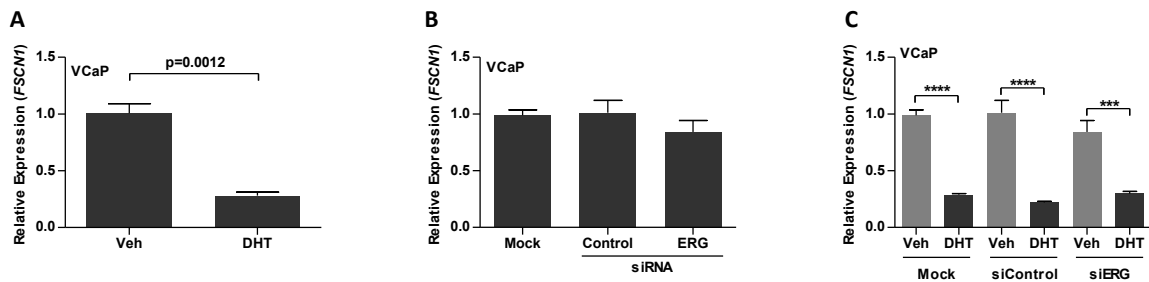


Figure 7.4 : Expression de *FSCN1* dans les cellules VCaP androgéno-dépendantes exprimant la fusion de manière endogène

A-C, Expression de *FSCN1* analysée par RT-qPCR dans les cellules VCaP exprimant la fusion et traitées avec soit de l'éthanol (Veh) ou de la dihydrotestostérone (DHT) (**A**) ($P=0,0012$, two-tailed unpaired t test), soit un siRNA contrôle ou spécifique de *ERG* (**B**) ($P=NS$, two-tailed Mann Whitney t test), soit l'ensemble de ces traitements (**C**) ($***P<0,001$, $****P<0,0001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test). Le niveau d'expression des cellules traitées avec l'éthanol (**A**), le siRNA contrôle (**B**), ou l'éthanol et le siRNA contrôle (**C**) a été normalisé à 1.

En revanche, étant donné que le traitement à la DHT a entraîné une diminution importante de l'expression de *FSCN1*, nous nous sommes interrogés sur une régulation négative potentielle par le récepteur aux androgènes. En effet, la première conséquence du traitement à la DHT est l'activation d'AR, dont un des gènes cibles directs est le gène de fusion *TMPRSS2:ERG*. De plus, et comme présenté en introduction, un réseau complexe d'interactions transcriptionnelles a été révélé entre le facteur de transcription ERG et le récepteur aux androgènes AR (Wei *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Chng *et al.*, 2012). Ils sont d'ailleurs tous deux capables de se fixer au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles communs, et d'induire des effets opposés sur la transcription de ces gènes, c'est-à-dire une

activation par l'un, et une répression par l'autre, comme cela a été montré pour plusieurs gènes impliqués dans la différenciation de l'épithélium prostatique (voir section 4.3.4.2 de l'introduction) (Wright *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2008; Rickman *et al.*, 2010). Ainsi, même si dans les clones PC3c n'exprimant pas AR, *FSCN1* semble être régulée positivement par ERG, il n'est pas exclu que dans les cellules VCaP exprimant un AR fonctionnel, *FSCN1* puisse être régulée négativement par AR. Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes d'abord intéressés à l'expression de *FSCN1* dans toutes les lignées tumorales prostatiques disponibles au laboratoire, exprimant ou non AR. De manière très intéressante, les cellules n'exprimant pas le récepteur aux androgènes ont des taux plus élevés de *FSCN1* que les cellules qui l'expriment (Figure 7.5A). Par ailleurs, dans le clone PC3c-pcDNA contrôle, ne surexprimant pas la fusion, l'expression de *FSCN1* est identique à celle dans les cellules exprimant AR (VCaP, LNCaP et MDA-PCa-2b) (Figure 7.5B). Dans les cellules PC3c, l'expression de ERG semble nécessaire à l'activation de la transcription de *FSCN1*, d'environ 70 fois dans le clone -T1E4-H (Figure 7.2A). Ainsi, il semble exister une régulation négative de *FSCN1* en présence d'un AR fonctionnel.

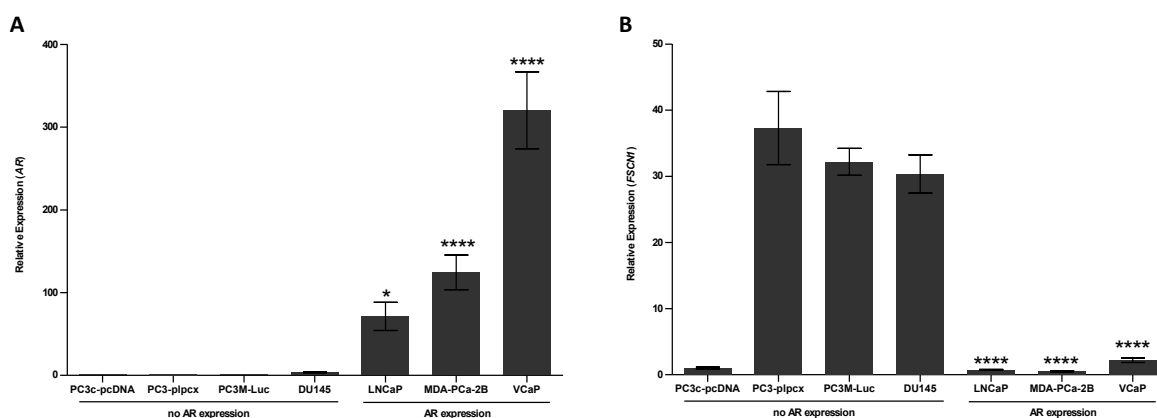


Figure 7.5 : Expression de *FSCN1* dans des lignées de cellules tumorales prostatiques exprimant ou non AR

A-B, Expression de *FSCN1* (A) et de AR (B) analysée par RT-qPCR dans les cellules PC3c-pcDNA, PC3-plpcx, PC3M-Luc et DU145 n'exprimant pas AR, et LNCaP, MDA-PCa-2b et VCaP exprimant un AR fonctionnel. * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison test. Le niveau d'expression des cellules PC3c-pcDNA a été normalisé à 1.

Pour confirmer cette régulation négative par AR, nous avons utilisé un agoniste de ce récepteur, la DHT, ou un antagoniste spécifique de ce récepteur, le bicalutamide (BIC), permettant ainsi d'activer ou de réprimer AR dans les cellules VCaP, et de suivre l'expression correspondante de *FSCN1*. L'expression de deux gènes cibles de ce récepteur,

TMPRSS2:ERG et *PSA*, a été suivie afin de confirmer l'induction ou la répression de son potentiel de régulateur transcriptionnel en fonction du traitement (Figure 7.6A, B, D et E). Dans la première expérience, des doses croissantes de DHT ont été appliquées aux cellules VCaP (Figure 7.6A, B et C). Comparée aux cellules contrôles non traitées, une baisse significative de l'expression de *FSCNI* a été observée dans les cellules traitées avec les doses croissantes de DHT, confirmant les résultats précédemment observés (Figure 7.6C ; Figure 7.4A et C). Dans la deuxième expérience, les cellules VCaP, préalablement traitées avec du BIC à 50 μ M pendant 8 heures afin d'inhiber le potentiel de régulateur transcriptionnel d'AR, ont ensuite reçues des doses croissantes de DHT pendant 16 heures afin de déplacer cet équilibre vers une réactivation d'AR (Figure 7.6D, E et F). Le traitement au BIC n'induit aucune différence d'expression de *ERG*, *PSA*, et *FSCNI* comparé aux cellules contrôle non traitées, ce qui est cohérent étant donné que les cellules contrôles n'ont pas été hormono-induites (Figure 7.6D, E et F). De manière intéressante, l'équilibre entre répression et activation d'AR est progressivement déplacé vers une activation avec les doses de DHT de 100nM et 1000nM, comme en témoignant l'augmentation d'expression de *ERG* et *PSA* (Figure 7.6D et E). En adéquation avec les résultats précédents, l'expression de *FSCNI* est progressivement diminuée lorsque AR est activé, c'est-à-dire avec les doses de DHT de 100nM et 1000nM (Figure 7.6F).

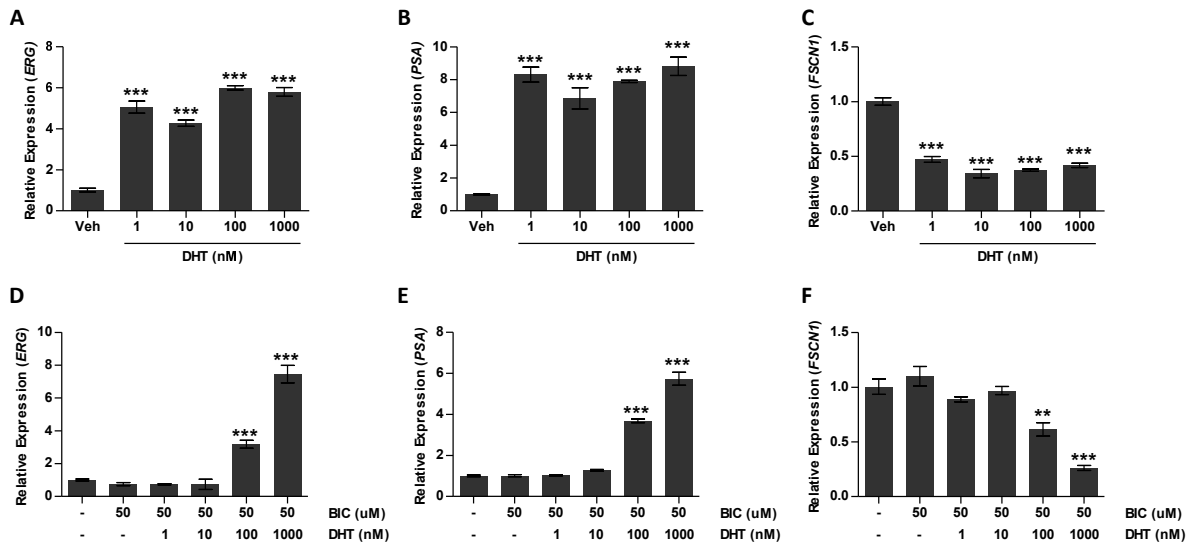


Figure 7.6 : Expression de *ERG*, *PSA* et *FSCNI* dans les cellules VCaP androgéno-dépendantes exprimant la fusion de manière endogène

A-C, Expression de *ERG* (**A**), *PSA* (**B**) et *FSCNI* (**C**) analysée par RT-qPCR dans les cellules VCaP exprimant la fusion et traitées avec de l'éthanol (Veh) ou différentes doses de dihydrotestostérone (DHT) comme indiqué (***) $P < 0,001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test). **D-F**, Expression de *ERG* (**D**), *PSA* (**E**) et *FSCNI* (**F**) analysée par RT-qPCR dans les cellules VCaP exprimant la fusion et traitées avec du DMSO (-BIC et -DHT), ou du bicalutamide (BIC) avec différentes doses de dihydrotestostérone (DHT) comme indiqué (** $P < 0,01$; ***) $P < 0,001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test). Le niveau d'expression des cellules traitées avec l'éthanol (**A-C**) ou le DMSO (**D-E**) a été normalisé à 1.

Ainsi, *FSCNI* semble être un gène cible direct d'AR, lequel réprime son expression. Afin d'évaluer l'existence d'une fixation directe de ce récepteur sur le promoteur du gène codant *FSCNI*, nous avons analysé des données de ChIP-seq publiées dans sept lignées différentes de cellules tumorales prostatiques exprimant AR (Figure 7.7) (Cai *et al.*, 2012; Decker *et al.*, 2012; Asangani *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). Cette analyse montre qu'il existe une fixation de AR sur le promoteur de *FSCNI*, conservée dans toutes les lignées tumorales prostatiques étudiées, et augmentée par un traitement avec un agoniste de AR (DHT), diminuée par un traitement avec un antagoniste de AR (BIC, bicalutamide ou ENZ, enzalutamide) (Figure 7.7).

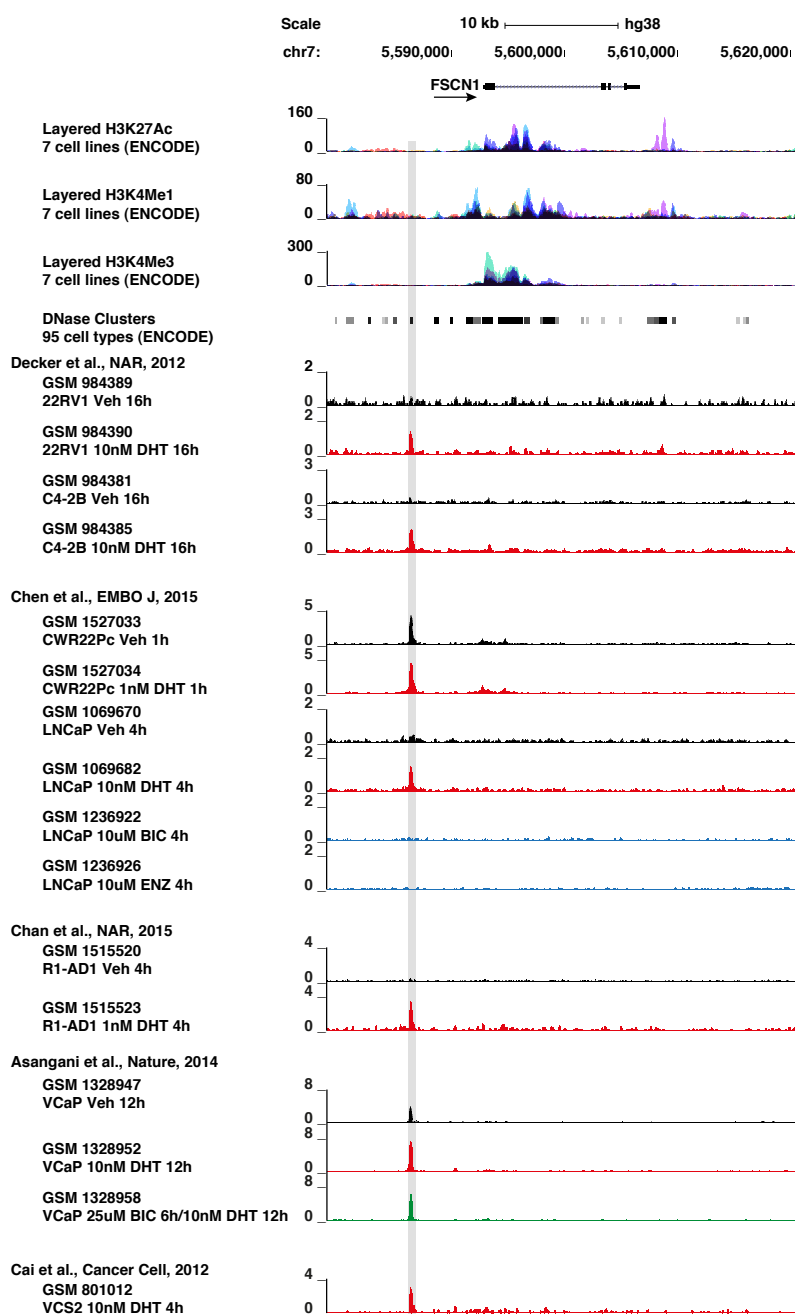


Figure 7.7 : Analyse de ChIP-seq publiés du récepteur aux androgènes AR sur le locus *FSCN1* dans sept lignées de cellules exprimant AR

Les jeux de données proviennent de cinq publications et ont été analysés en utilisant UCSC Browser (Cai *et al.*, 2012; Decker *et al.*, 2012; Asangani *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015). Les pistes sont montrées pour les marques épigénétiques H3K27Ac et H3K4Me1 (souvent trouvées près d'éléments régulateurs), H3K4Me3 (souvent trouvées près des promoteurs), l'hypersensibilité à la DNase I (les régions régulatrices, et en particulier les promoteurs, sont sensibles à la DNase), et pour les ChIP AR dérivés de cellules 22RV1, C4-2B, CWR22Pc, LNCaP, R1-AD1, VCaP et VC2S, non traitées (en noir), traitées soit avec un agoniste de AR (DHT pour dihydrotestostérone en rouge), soit avec un antagoniste de AR (BIC pour bicalutamide ou ENZ pour enzalutamide en bleu), soit avec les deux, antagoniste et agoniste de AR (BIC et DHT en vert). Pour l'hypersensibilité à la DNase I, une zone grise indique l'étendue de la région hypersensible (DNase Clusters), et l'intensité de gris est proportionnelle à la force de signal maximal observé.

L'ensemble de ces résultats permet d'envisager une régulation transcriptionnelle complexe de *FSCN1*, avec une répression induite par AR dans les cellules VCaP, et une activation induite par ERG en absence d'un AR fonctionnel dans les cellules PC3c.

7.1.2.2 Rôle de FSCN1 dans la migration et l'invasion cellulaire *in vitro*

De nombreux articles dans la littérature ont établi un rôle de FSCN1 dans la migration et l'invasion des cellules tumorales, via la stabilisation de structures particulières d'actine appelées invadopodes (Figure 7.1). De plus, l'équipe a déjà montré que les clones PC3c-T1E4-M et -H présentent une augmentation de l'expression de MMP9, une métalloprotéase présente au niveau de ces invadopodes et impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire, en comparaison au clone -pcDNA contrôle (Tian *et al.*, 2014). Un test de dégradation de la gélatine a également montré l'association entre l'augmentation de sécrétion de MMP9 et la dégradation d'une matrice de gélatine dans le clone PC3c-T1E4-H. D'autre part, dans le clone PC3c-T1E4-H, un siRNA dirigé contre ERG a montré une diminution de la migration cellulaire de plus de 50%, et de l'invasion cellulaire de 70% (Tian *et al.*, 2014). Nous avons donc orienté nos études fonctionnelles dans ce sens, afin de voir si dans notre modèle d'étude, FSCN1 joue un rôle dans ces processus de migration et d'invasion cellulaire.

Ainsi, une première expérience d'immunofluorescence a permis de montrer que le clone PC3c-T1E4-H exprime un haut niveau de FSCN1, exclusivement au niveau cytoplasmique, et de ERG, exclusivement au niveau nucléaire, comparé au clone contrôle (Figure 7.8). Ceci confirme nos observations en Western blot et en RT-qPCR, à savoir une surexpression de FSCN1 dans les clones PC3c-T1E4 par rapport au clone contrôle -pcDNA.

Nous nous sommes alors intéressés aux capacités invasives des clones cellulaires exprimant la fusion et plus particulièrement à la formation d'invadopodes. Pour cela, une expérience de dégradation de la gélatine a été réalisée. Les invadopodes correspondent aux structures riches en F-actine et se développent sur la face ventrale des cellules, en contact avec la matrice de gélatine couplée à un fluorophore émettant dans le vert. Les filaments d'actine sont visualisés en tirant profit des propriétés naturelles de liaison à l'actine de la Phalloïdine, une toxine extraite de certains champignons et empoisonnant la cellule en se liant à l'actine afin d'empêcher sa dépolymérisation, préalablement couplée à un fluorophore émettant dans le rouge. Ainsi, les cellules PC3c-T1E4-H sont capables de former des

invadopodes, visualisés par les points rouges, et de dégrader la matrice extracellulaire sous-jacente, phénomène visualisé par les points noirs dans la gélatine verte (Figure 7.9).

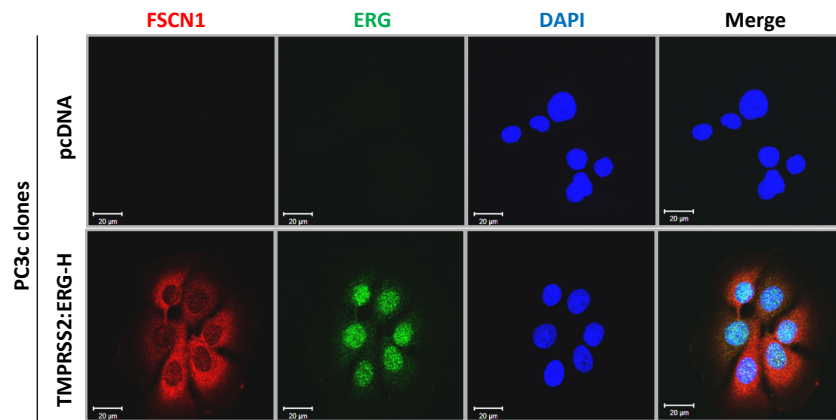


Figure 7.8 : Marquage immunofluorescent de FSCN1 et ERG dans les clones PC3c androgéno-indépendants surexprimant la fusion de manière ectopique

Expression de FSCN1 (rouge) et ERG (vert) analysée par immunofluorescence dans les clones PC3c-pcDNA contrôle et -T1E4-H exprimant la fusion T1E4. Barre d'échelle, 20µm.

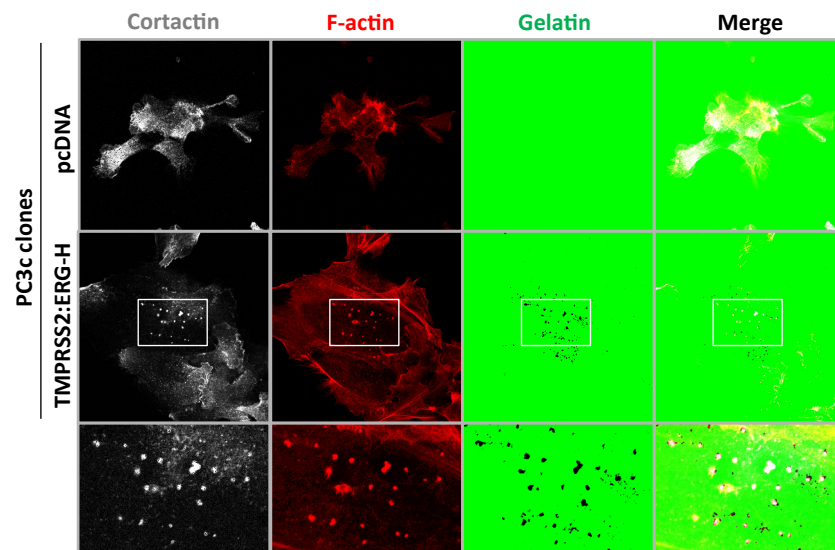


Figure 7.9 : Test de dégradation de la gélatine et marquage immunofluorescent de Cortactin et F-actine dans les clones PC3c androgéno-indépendants surexprimant la fusion de manière ectopique

Expression de Cortactine (gris) et F-actine (rouge) analysée par immunofluorescence dans les clones PC3c-pcDNA contrôle et -T1E4-H exprimant la fusion T1E4.

Afin de confirmer le rôle de FSCN1, établi dans la littérature, dans la stabilisation de ces structures lors de l'étape d'assemblage, nous avons souhaité réaliser un co-marquage des filaments d'actine et de FSCN1. Cependant, après plusieurs expériences, nous avons établi qu'une incompatibilité technique concernant les différentes méthodes de fixation des cellules

ne permettrait pas la réalisation de ce co-marquage. Par ailleurs, malgré le nombre important d'articles étudiant les invadopodes, ce co-marquage n'a jamais été effectué dans des cellules exprimant de manière endogène FSCN1. De manière générale, les auteurs utilisent des transfections de protéines de fusion FSCN1-GFP. En effet, afin de visualiser FSCN1 par immunofluorescence, il est nécessaire de fixer les cellules au méthanol. Cependant, le méthanol détruit la conformation native de certaines protéines, et ne permet pas le marquage de F-actine à l'aide de Phalloïdine.

Pour contourner cette difficulté technique et justifier la présence spécifique d'invadopodes dans notre modèle d'étude, une colocalisation a été effectuée entre un autre régulateur clé de la polymérisation de l'actine impliqué de l'initiation à la maturation des invadopodes, la cortactine, et F-actine (Figure 7.9). De manière indirecte, nous avons également pu visualiser une colocalisation de FSCN1 et de cortactine dans les cellules PC3c-T1E4-H par rapport aux cellules contrôles n'exprimant pas FSCN1 (Figure 7.10). Par ailleurs, ces cellules contrôles -pcDNA expriment la cortactine, mais ne sont pas capables de former des invadopodes lors du test de dégradation de la gélatine, semblant confirmer le rôle essentiel de FSCN1 dans la stabilisation de ces structures (Figure 7.9 ; Figure 7.10)

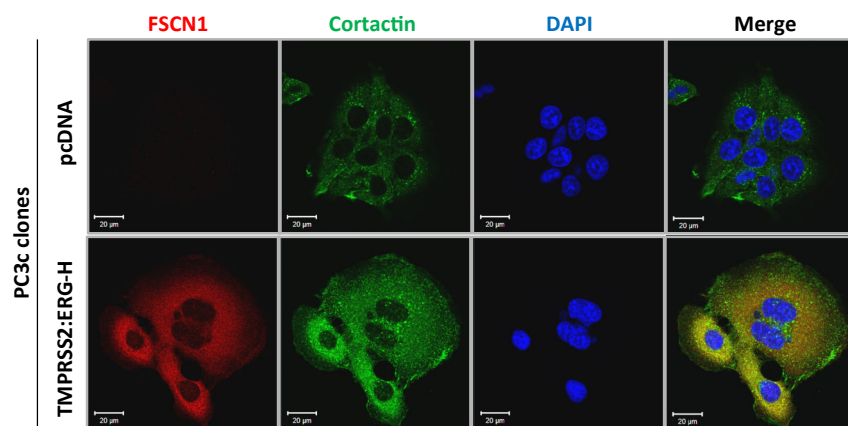


Figure 7.10 : Marquage immunofluorescent de FSCN1 et Cortactine dans les clones PC3c androgéno-indépendants surexprimant la fusion de manière ectopique

Expression de FSCN1 (rouge) et Cortactine (vert) analysée par immunofluorescence dans les clones PC3c-pcDNA contrôle et -T1E4-H exprimant la fusion T1E4. Barre d'échelle, 20µm.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle de FSCN1 dans la migration des cellules tumorales *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé un siRNA inhibant l'expression de *FSCN1* d'environ 85% dans le clone -H, puis un test de migration a été effectué (Figure 7.11A). L'inhibition de *FSCN1* induit une diminution de la migration d'environ 50% après 20 heures

de culture des cellules sur un système de plaques de 24 puits spécifiques, permettant le comptage automatisé des cellules ayant migrées (FluoroBlok) (Figure 7.11B).

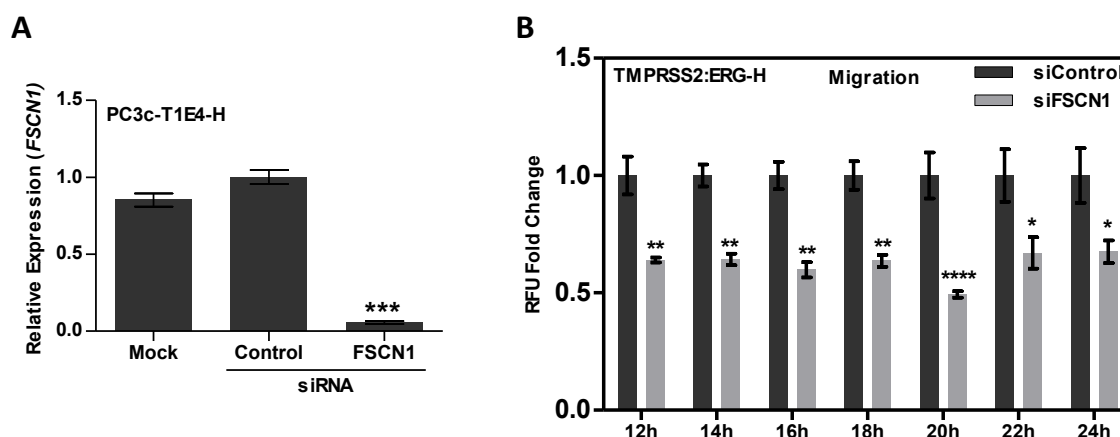


Figure 7.11 : Test de migration effectué sur le clone PC3c-T1E4-H traité avec un siRNA contrôle ou spécifique de FSCN1

A, Expression de *FSCN1* analysée par RT-qPCR dans le clone PC3c-T1E4-H traité avec un siRNA contrôle ou spécifique de FSCN1. Le niveau d'expression des cellules traitées avec le siRNA contrôle a été normalisé à 1. *** $P < 0,001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunett's multiple comparison test. **B**, Test de migration effectué sur le clone PC3c-T1E4-H traité avec un siRNA contrôle ou spécifique de FSCN1. Pour chaque temps, le niveau d'expression des cellules traitées avec le siRNA contrôle a été normalisé à 1. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison test.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle établi de FSCN1 dans l'invasion des cellules tumorales via la formation des invadopodes, ainsi que dans la migration cellulaire *in vitro*, dans notre modèle d'étude du cancer de la prostate.

7.1.2.3 Expression de FSCN1 dans le cancer de la prostate et ses métastases chez l'homme

D'abord, en 2009, une équipe a montré que l'expression de FSCN1 est détectée dans les cellules tumorales de cancer de la prostate primaire et CRPC (Darnel *et al.*, 2009a). Ainsi, en parallèle des études *in vitro*, nous avons utilisé une cohorte, composée de 52 échantillons humains de tissus prostatiques cancéreux primaires (CaP) et 20 échantillons humains de tissus prostatiques sains, adjacents à la tumeur (N-CaP), obtenue en collaboration avec la tumorothèque du Cancéropôle Nord Ouest, et déjà publiée par l'équipe (Tian *et al.*, 2014). Cependant, grâce à des expériences de RT-qPCR effectuées sur ces échantillons, nous

n'avons pas observé de différence d'expression de *FSCN1* entre les CaP et les N-CaP (Figure 7.12A). Ensuite, étant donné l'expression « dose dépendante » de *FSCN1* en fonction de l'expression de la fusion dans l'étude transcriptomique, nous avons étudié son expression dans les 52 échantillons humains de tissus prostatiques cancéreux dont 32 expriment la fusion, et 20 ne l'expriment pas. Cependant, aucune différence significative entre les deux types d'échantillons, ni aucune corrélation entre l'expression de *FSCN1* et celle de *ERG* n'a pu être mise en évidence par des expériences de RT-qPCR (Figure 7.12B et C).

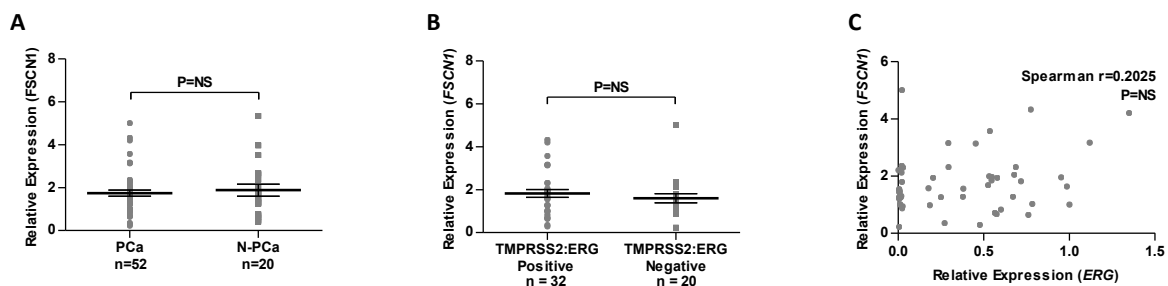


Figure 7.12 : Expression de *FSCN1* dans des échantillons humains de cancers primaires de la prostate

A, Expression de *FSCN1* analysée par RT-qPCR dans des échantillons humains de cancers primaires de la prostate CaP (n=52) ou de tissus sains prélevés au large de la tumeur N-CaP (n=20). P=NS, two-tailed Mann Whitney t test. **B**, Expression de *FSCN1* analysée par RT-qPCR dans des échantillons humains de cancers primaires de la prostate TMPRSS2:ERG-positifs (n=32) et -négatifs (n=20). P=NS, two-tailed Mann Whitney t test. **C**, Représentation en nuage de points montrant l'expression relative de *FSCN1* et celle de *ERG* dans les échantillons humains de cancers primaires de la prostate (n=52). Spearman $r=0.2025$, P=NS, two-tailed non parametric Spearman correlation test with $\alpha=0.05$.

Ensuite, en 2014, une autre équipe a montré que l'expression de *FSCN1* n'est pas retrouvée dans les cellules tumorales, ni au niveau de la tumeur primaire de la prostate, ni au niveau de la métastase osseuse associée (Ozdemir *et al.*, 2014). En revanche, l'expression est retrouvée *de novo* dans les ostéoblastes, ostéocytes, et les fibroblastes associés à la tumeur (CAF) dans la métastase osseuse. C'est pourquoi, pour analyser plus finement l'expression éventuelle de *FSCN1* dans les tumeurs prostatiques humaines ou les métastases associées, des expériences d'immunohistochimie (IHC) sur des coupes de tissus sont intéressantes à réaliser. En effet, elles permettent de localiser l'expression de la protéine directement au niveau des cellules tumorales, ou éventuellement dans d'autres cellules présentes dans le stroma. Cette distinction n'est pas possible par RT-qPCR.

Concernant les coupes de tumeurs primaires, l'expression de FSCN1 est retrouvée au niveau des cellules endothéliales de vaisseaux, comme attendu d'après la littérature, mais pas dans les cellules épithéliales normales de la prostate, dans des échantillons de tissus sains prélevés au large de la tumeur, ni dans les cellules tumorales de la prostate, dans des échantillons de tissus prostatiques tumoraux primaires exprimant ou non la fusion (Figure 7.13). Cette observation, faite sur trois coupes individuelles de tissus ainsi que sur un TMA (Tissue Microarray) contenant 65 coupes de tissus prostatiques tumoraux primaires, explique nos résultats obtenus précédemment par RT-qPCR, et est en accord avec la publication de Ozdemir et al., mais en désaccord avec celle de Darnel et al. (Darnel *et al.*, 2009a; Ozdemir *et al.*, 2014). Pour renforcer nos résultats, deux anticorps ont été utilisés dont le clone 55K2, commercialisé par plusieurs fournisseurs et régulièrement utilisé et cité dans la littérature. De plus, la fonctionnalité de ces anticorps a été confirmée par un anatomopathologiste, le Pr Xavier Leroy, qui confirme un marquage des cellules endothéliales vasculaires et des cellules dendritiques, connues pour exprimer cette protéine dans la littérature.

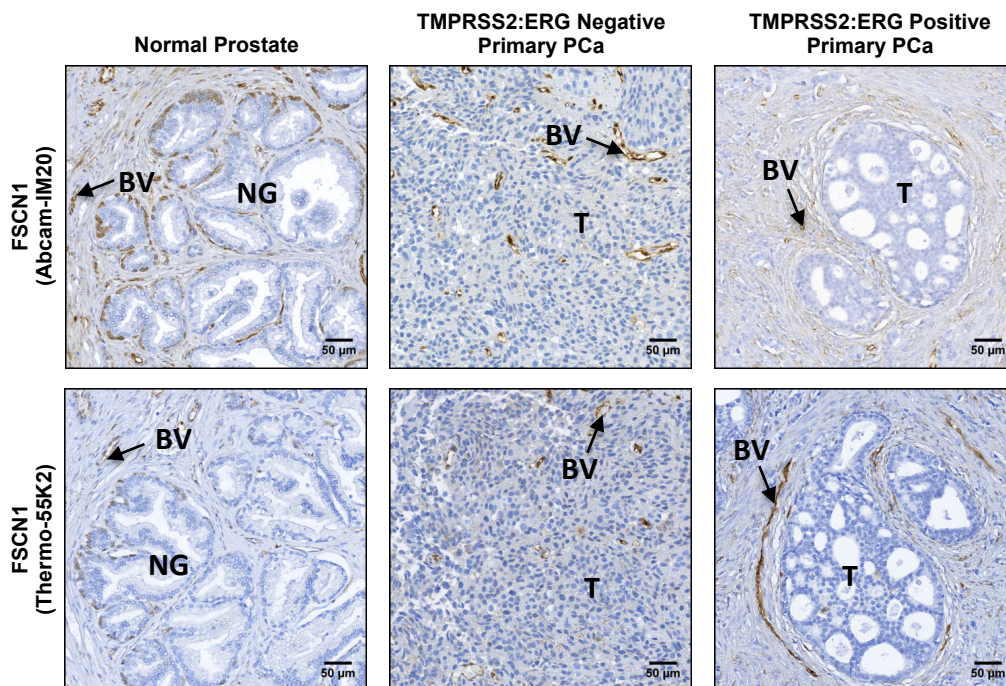


Figure 7.13 : Marquage immunohistochimique de FSCN1 dans des échantillons humains de cancers primaires de la prostate

Les marquages ont été effectués à l'aide de deux anticorps obtenus auprès de deux fournisseurs différents comme indiqué. Trois coupes individuelles de tissu ainsi qu'un TMA (Tissue Microarray) contenant 65 coupes de tissu ont été analysées et trois images représentatives ont été sélectionnées. L'hématoxyline a été utilisée comme contre-colorant pour augmenter le contraste (bleu). NG, Glandes Normales (Normal Glands) ; BV, Vaisseaux Sanguins (Blood Vessels) ; T, Tumeur (Tumor).

Concernant les coupes de métastases osseuses et ganglionnaires associées au cancer de la prostate, l'expression de FSCN1 est retrouvée au niveau des cellules endothéliales vasculaires et des cellules dendritiques, comme précédemment, mais pas dans les cellules tumorales (Figure 7.14 ; Figure 7.15A). De manière intéressante et en accord avec la publication de Ozdemir et al., l'expression de FSCN1 est retrouvée dans les ostéoblastes et les ostéocytes des métastases osseuses du cancer de la prostate (Figure 7.15B) (Ozdemir *et al.*, 2014).

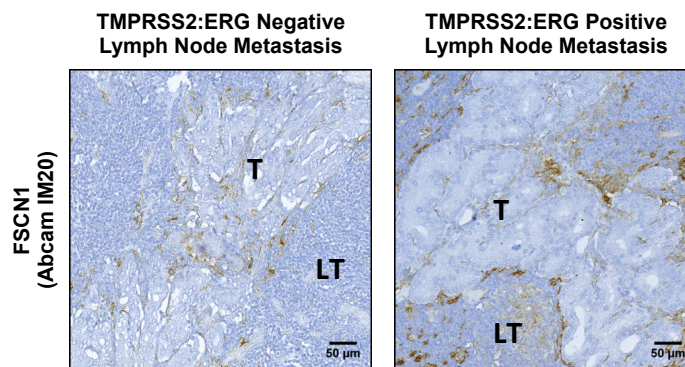


Figure 7.14 : Marquage immunohistochimique de FSCN1 dans des échantillons humains de métastases ganglionnaires associées au cancer de la prostate

Les marquages ont été effectués à l'aide d'un seul anticorps comme indiqué. Trois coupes de tissu ont été analysées, et deux sont présentées. L'hématoxyline a été utilisée comme contre-colorant pour augmenter le contraste (bleu). LT, Tissu Lymphoïde (Lymphoid Tissue) ; T, Tumeur (Tumor).

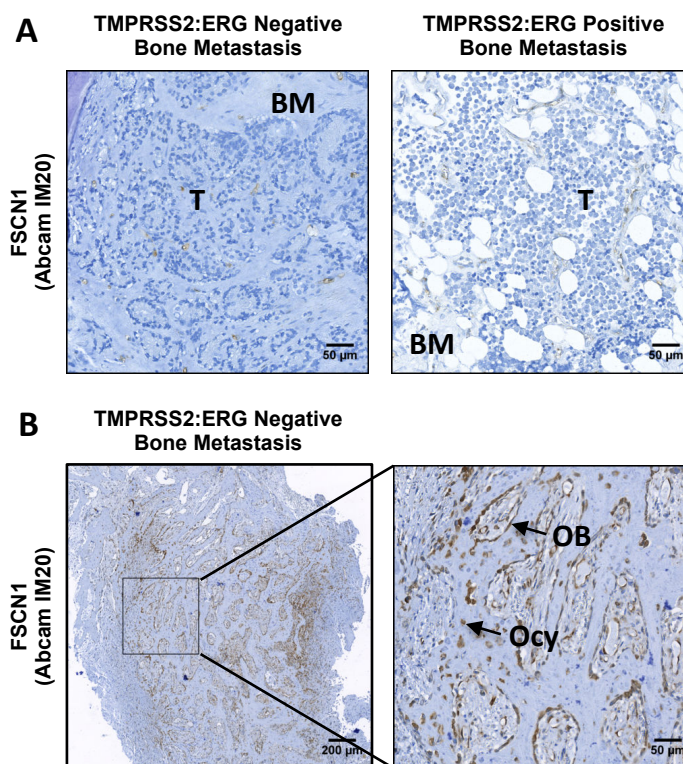


Figure 7.15 : Marquage immunohistochimique de FSCN1 dans des échantillons humains de métastases osseuses associées au cancer de la prostate

A-B, Les marquages ont été effectués à l'aide d'un seul anticorps comme indiqué. Cinq coupes de tissu ont été analysées, et trois sont présentées. L'hématoxyline a été utilisée comme contre-colorant pour augmenter le contraste (bleu). BM, Matrice Osseuse (Bone Matrix) ; T, Tumeur (Tumor) ; OB, Ostéoblaste ; OCy, Ostéocyte.

Compte tenu des difficultés à obtenir des échantillons métastatiques de patients, seules trois métastases ganglionnaires et cinq métastases osseuses ont pu être analysées par IHC au cours de ma thèse. Cependant, pour pallier cette difficulté et compléter ce résultat, des banques de données publiées et disponibles permettent d'effectuer des méta-analyses et de suivre l'expression de gènes dans différents types d'échantillons tumoraux. Quatre banques de données publiées ont été utilisées et ont permis d'observer une surexpression significative du gène codant FSCN1 dans les métastases associées au cancer de la prostate par rapport aux cancers de la prostate primaires et aux tissus normaux (Figure 7.16A, B, C et D) (Yu *et al.*, 2004; Varambally *et al.*, 2005; Grasso *et al.*, 2012).

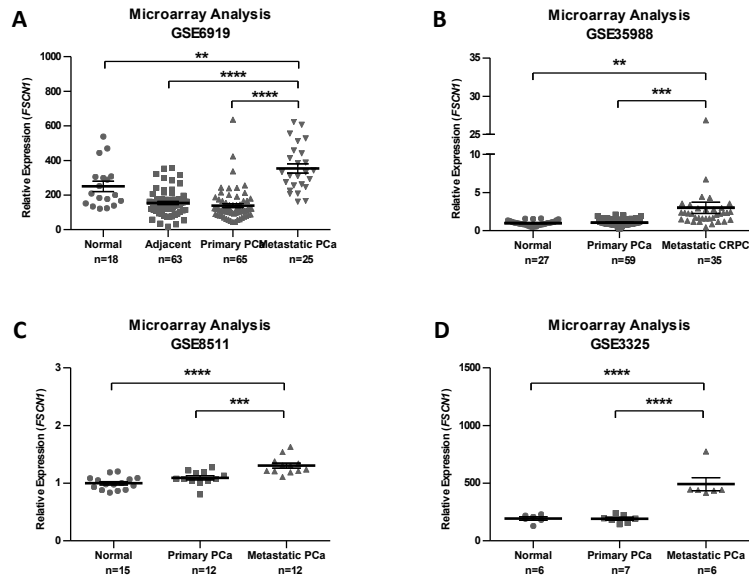


Figure 7.16 : Méta-analyses de l'expression de *FSCN1* dans des échantillons humains de cancers de la prostate

Comparaison des profils d'expression de *FSCN1* dans des échantillons humains prostatiques normaux, adjacents à la tumeur, de cancers de la prostate primaires et métastatiques (A) ; des échantillons humains prostatiques normaux, de cancers de la prostate primaires et métastatiques (B-D) utilisant différentes données publiées (Yu *et al.*, 2004; Varambally *et al.*, 2005; Grasso *et al.*, 2012). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test.

De plus, une étude transcriptomique récemment publiée a été effectuée sur 149 échantillons humains métastatiques de CRPC, prélevés au niveau de différents sites, dont 20 au niveau de métastases osseuses associées au cancer de la prostate (Haider *et al.*, 2016). Nous avons utilisé ces données publiées et effectué une méta-analyse afin de voir si l'expression de *FSCN1* pouvait être spécifique d'un type de métastases en particulier, notamment osseuses. Nos résultats montrent que l'expression de *FSCN1* dans les métastases osseuses est significativement supérieure à celle dans les autres métastases (Figure 7.17). Ce résultat est en accord avec la publication de Ozdemir *et al.*, mais des marquages immunohistochimiques complémentaires devront être effectués sur des coupes de métastases osseuses de cancer de la prostate, afin de valider la localisation de cette protéine, soit au niveau des cellules de l'os, ostéocytes et ostéoblastes, soit directement au niveau des cellules tumorales exprimant ERG mais ne possédant pas un AR fonctionnel (Ozdemir *et al.*, 2014).

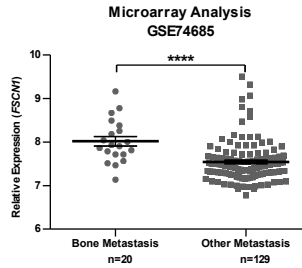


Figure 7.17 : Méta-analyse de l’expression de FSCN1 dans des échantillons humains de métastases associées au cancer de la prostate

Comparaison des profils d’expression de FSCN1 dans des échantillons humains de métastases osseuses ou d’autres métastases (Haider *et al.*, 2016). **** $P < 0.0001$, two-tailed Mann Whitney t test.

L’ensemble de ces résultats met en évidence une surexpression de FSCN1 dans les métastases du cancer de la prostate, et plus spécifiquement les métastases osseuses, par rapport au cancer de la prostate primaire et au tissu sain. Cette expression semble limitée aux ostéocytes et ostéoblastes présents dans l’os, autour de la tumeur.

7.1.3 Discussion et Perspectives

7.1.3.1 Expression et régulation transcriptionnelle de *FSCN1* dans des lignées de cellules tumorales prostatiques

Les résultats obtenus concernant l’expression et la régulation transcriptionnelle de *FSCN1* dans les lignées prostatiques tumorales permettent d’envisager une régulation transcriptionnelle complexe de *FSCN1*. En effet, il existe une répression de la transcription induite par AR dans les cellules VCaP, et une activation de la transcription induite par ERG dans les cellules PC3c n’exprimant pas AR.

Cependant, l’expression du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* est sous la dépendance de AR. L’existence d’une régulation transcriptionnelle positive de *FSCN1* par les protéines de fusion en absence d’AR est donc peu envisageable. En revanche, il existe un réseau complexe d’interactions transcriptionnelles entre ERG et AR, qui peuvent entrer en compétition pour la fixation au promoteur de leurs gènes cibles, et induire des effets opposés. De manière intéressante, il existe un site consensus de fixation de ERG, 60 bases avant le site consensus de fixation d’AR, au niveau de la région promotrice de *FSCN1* identifiée précédemment en ChIP-seq (Figure 7.7). Des expériences de ChIP seront prochainement effectuées, en utilisant un couple d’oligonucléotides encadrant les deux sites, afin d’évaluer si les deux régulateurs

transcriptionnels sont capables de se fixer au niveau de la même région promotrice de *FSCN1*, et d'en réguler l'expression, de manière positive pour ERG, négative pour AR.

7.1.3.2 Rôle de FSCN1 dans la migration et l'invasion cellulaire *in vitro*

Par ailleurs, nous avons mis en évidence par des tests de dégradation de la gélatine, des expériences d'immunofluorescence, et des tests de migration *in vitro*, que le clone PC3c-T1E4-H exprimant ERG est capable de former des structures particulières d'actine, les invadopodes, conférant à ces cellules des capacités migratoires et invasives accrues. Etant donné le rôle de FSCN1 dans la stabilisation de ces invadopodes, nous envisageons désormais de réaliser à nouveau ces expériences ainsi que des tests d'invasion *in vitro*, mais en présence d'un siRNA spécifique de FSCN1, afin de voir s'il existe un différentiel, et plus précisément une diminution de la formation d'invadopodes et de l'invasion cellulaire, par rapport au clone PC3c-T1E4-H traité avec un siRNA contrôle.

7.1.2.3 Expression de FSCN1 dans le cancer de la prostate et ses métastases chez l'homme

La protéine FSCN1 est exprimée dans les ostéocytes et les ostéoblastes au niveau des métastases osseuses de patients atteints d'un cancer de la prostate (Figure 7.15) (Ozdemir *et al.*, 2014). Pour l'instant, nous n'avons pas détecté d'expression de FSCN1 au niveau des cellules tumorales dans les échantillons dont nous disposons, c'est-à-dire dans les tissus issus de cancers primaires de la prostate, ou de métastases ganglionnaires et osseuses associées.

Notre hypothèse est que les cellules tumorales prostatiques réprimant l'activité transcriptionnel de AR, ou celles ne l'exprimant plus, pourraient exprimer FSCN1, n'étant alors plus réprimée par AR. Deux types de patients pourraient ainsi respectivement présenter ces caractéristiques : les patients en cours de traitement par hormonothérapie à base d'antagonistes d'AR, ou les patients ayant été traités par hormonothérapie mais ayant développés un CRPC particulier de type neuroendocrine. Chez ces deux types de patients, nous pensons que l'expression de FSCN1, augmentant les capacités migratoires et invasives des cellules tumorales, pourrait participer à l'acquisition d'un phénotype plus agressif et être un facteur de mauvais pronostic, associé à une espérance de vie maximale estimée à 2 ans. Cependant, il sera difficile d'obtenir de tels échantillons de tissus pour valider notre hypothèse, puisque des biopsies sont rarement effectuées chez ces patients. En revanche, nous pensons effectuer des cultures organotypiques ou de cellules tumorales prostatiques primaires,

prélevées chez des patients, naïfs vis-à-vis de l'hormonothérapie, notamment au cours d'une prostatectomie radicale. Nous pourrions traiter ces cultures soit avec l'agoniste de AR (DHT), soit avec l'antagoniste de AR (BIC), puis suivre l'évolution de l'expression de FSCN1 dans les cellules tumorales prostatiques primaires humaines.

7.1.2.4 Effet de AR sur l'expression de FSCN1 et le développement de tumeur *in vivo*

Une autre manière d'étudier l'effet du récepteur aux androgènes sur l'expression de FSCN1 serait d'injecter des cellules tumorales prostatiques exprimant un AR fonctionnel, notamment les VCaP, en xélogreffe chez la souris. Les souris seront réparties en plusieurs groupes en fonction des traitements, notamment deux groupes traités ou non avec l'agoniste de AR (DHT), et deux autres dans lesquels les souris pourront ou non être castrées soit chimiquement, grâce à l'utilisation de l'antagoniste de AR (BIC), soit physiquement. Par ailleurs, l'utilisation de shRNA ou de la nouvelle technologie CRISPR-Cas9 permettant d'inhiber l'expression de FSCN1 de manière stable est également envisagée. Après le développement d'une tumeur sous-cutanée, les souris seront sacrifiées, les tumeurs prélevées, et nous étudierons l'expression de FSCN1 dans ces échantillons de tissus. Nous pourrions également comparer d'autres paramètres, notamment la taille des tumeurs induites, indicateur de la prolifération cellulaire. FSCN1 étant impliquée plutôt dans la migration et dans l'invasion, l'idéal serait d'utiliser des cellules tumorales prostatiques capables de développer spontanément des métastases, mais ce type de modèle est rare pour l'étude du cancer de la prostate, et est plus difficile à mettre en œuvre.

7.1.2.5 Rôle de FSCN1 dans le tropisme des cellules tumorales vers l'os, et le développement de métastases ostéocondensantes *in vivo*

En fonction des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* pour ce gène, et de l'obtention de clones stables PC3c dépourvus de la protéine FSCN1, nous pourrions nous orienter vers d'autres expériences, notamment *in vivo* avec le développement de modèles murins de type injections intra-cardiaques, permettant d'étudier son rôle dans le tropisme des cellules tumorales vers l'os, ou injections intra-tibiales, permettant d'étudier le développement de métastases ostéocondensantes, comme cela a déjà été effectué dans l'équipe (Deplus *et al.*, 2017; Delliaux *et al.*, Soumis).

7.2 Etude du récepteur HCAR1 (Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1)

Lors de l'étude transcriptomique publiée par l'équipe (Tian *et al.*, 2014), le gène *HCAR1* est surexprimé dans les clones PC3c-T1E4-L, -M et -H par rapport au clone contrôle -pcDNA, et de manière dépendante de la quantité de ERG surexprimée dans ces clones. Ce gène répond donc à notre premier critère de sélection, nous avons alors effectué une revue bibliographique de la littérature afin d'évaluer la pertinence de ce gène dans le sujet de cette thèse, c'est-à-dire la recherche de gènes cibles des protéines de fusion TMPRSS2:ERG, et leur rôle dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate.

7.2.1 Revue bibliographique

De nombreux nutriments et intermédiaires métaboliques sont non seulement des substrats de base pour le métabolisme énergétique, mais fonctionnent également comme des molécules de signalisation activant des récepteurs spécifiques, et modulant ainsi diverses fonctions cellulaires. Récemment, divers récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) ont été décrits comme étant activés par des intermédiaires métaboliques et jouent ainsi un rôle important dans la médiation des effets de ces métabolites (Blad *et al.*, 2012). Parmi eux, la famille des récepteurs aux acides hydroxycarboxyliques (HCARs) est composée de trois membres, HCAR1, HCAR2 et HCAR3, également connus sous le nom de GPR81, GPR109A et GPR109B respectivement. Dans la suite de l'exposé, HCAR1 sera le récepteur le plus décrit ; quelques similarités ou différences entre les trois récepteurs de cette famille seront rapidement abordées.

7.2.1.1 Structure, ligand, expression et régulation

Chez l'homme, les gènes codant les récepteurs HCARs sont tous localisés en tandem sur le chromosome 12q24.31 et sont composés d'un seul exon qui, dans le cas de *HCAR1*, code un polypeptide de 346 acides aminés. HCAR1 a d'abord été identifié comme un récepteur orphelin, appelé GPR81, par une analyse BLAST utilisant les bases de données de séquences génomiques et de séquences connues pour coder des GPCR. Il a ensuite été isolé à partir d'un clone de chromosome artificiel bactérien portant la région génomique humaine 12q (Lee *et al.*, 2001). Le récepteur HCAR1 partage approximativement 55% d'homologie de séquence d'acides aminés avec HCAR2 et HCAR3, partageant eux-mêmes 96% d'homologie de séquence. Les trois récepteurs partagent un résidu arginine dans l'hélice transmembranaire

3, essentiel pour la liaison des ligands de type acide carboxylique (Tunaru *et al.*, 2005). HCAR1 est le récepteur phylogénétiquement le plus ancien, déjà retrouvé chez le poisson, alors que HCAR2 semble restreint aux mammifères, et HCAR3 aux primates supérieurs (Ahmed, 2011; Kuei *et al.*, 2011; Offermanns, 2017).

Les ligands physiologiques des HCARS présentent une similarité structurelle, ceux sont tous des acides hydroxycarboxyliques, des intermédiaires métaboliques clés dont les niveaux locaux et systémiques reflètent des états métaboliques particuliers (Offermanns *et al.*, 2011). Ainsi, HCAR1 est activé par un métabolite glycolytique, l'acide 2-hydroxypropionique (acide lactique ou lactate), HCAR2 par un corps cétonique, l'acide 3-hydroxybutyrique (β -hydroxybutyrate), ainsi que par l'acide butyrique, et HCAR3 par un intermédiaire de la β -oxydation, l'acide 3-hydroxyoctanoïque (Offermanns, 2017).

Le récepteur à l'acide lactique HCAR1 est principalement exprimé par les adipocytes des tissus adipeux blanc et brun (Lee *et al.*, 2001; Jeninga *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Des niveaux d'expression relativement faibles de HCAR1 ont été décrits dans plusieurs autres tissus, tels que le foie, le rein ou encore le muscle squelettique, mais sans savoir si cela est dû à la présence d'adipocytes dans ces tissus, ou si cela reflète une expression par d'autres types de cellules résidentes (Offermanns, 2017).

La différenciation des adipocytes à partir des pré-adipocytes 3T3-L1, ainsi que la fixation d'un hétérodimère PPAR γ /RXR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma/Retinoid X Receptor) au niveau du promoteur proximal du gène entraînent une augmentation d'expression du récepteur HCAR1 (Lee *et al.*, 2001; Jeninga *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Par ailleurs, une alimentation hypercalorique ou une exposition à divers stimuli inflammatoires entraînent une diminution de son expression dans le tissu adipeux (Feingold *et al.*, 2011; Wanders *et al.*, 2012).

7.2.1.2 Implications physiologiques

Les récepteurs HCARS sont des GPCR tous couplés à une protéine G de type inhibitrice (Gi/Go) et dont l'activation entraîne une diminution de l'activité de l'adénylyl cyclase et donc, une diminution de la production d'AMPc dans des systèmes d'expression hétérologues ainsi que dans les adipocytes primaires humains et murins (Figure 7.18) (Ahmed, 2011). Dans les adipocytes, l'AMPc est un second messenger important pour induire la lipolyse (voie métabolique de dégradation des lipides en acide gras et glycérol), par activation de la protéine kinase A (PKA), qui à son tour phosphoryle et active des enzymes

lipolytiques, telles que la lipase hormono-sensible (HSL). Ainsi, l'activation des récepteurs HCARs a pour résultat un effet anti-lipolytique dans les adipocytes primaires et chez la souris dans différentes conditions : pour HCAR1, pendant la période postprandiale en servant d'intermédiaire à l'insuline, pour HCAR2 et HCAR3, pendant des conditions physiologiques ou physiopathologiques d'une augmentation de la β -oxydation (voie métabolique de dégradation des acides gras produisant de l'acétyl-CoA, du NADH et du FADH₂ dans la mitochondrie), tels que le jeûne prolongé (Cai *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Offermanns *et al.*, 2011). Les trois récepteurs HCARs régulent donc la lipolyse de manière négative et fonctionnent ainsi comme des capteurs métaboliques.

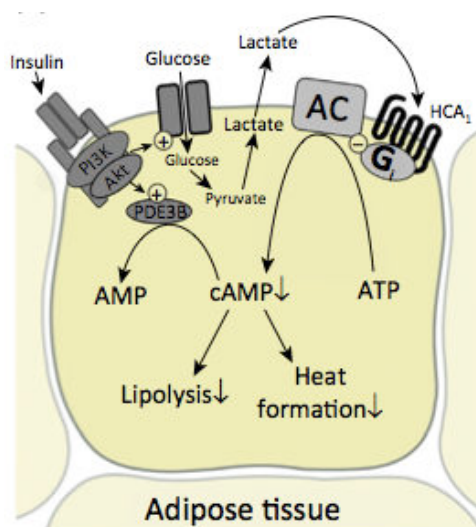


Figure 7.18 : Régulation de la fonction adipocytaire par le récepteur HCAR1

HCAR1 agit comme médiateur d'une régulation autocrine et/ou paracrine de la fonction adipocytaire par le lactate. Le lactate est libéré des adipocytes, un processus augmenté par l'absorption de glucose induite par l'insuline. Le lactate peut activer le récepteur HCAR1 sur les adipocytes et ainsi inhiber la formation d'AMPc, ce qui entraîne d'une part un effet anti-lipolytique, et d'autre part une diminution de la production de chaleur et du brunissement du tissu adipeux. AC, adénylyl cyclase ; Akt, protéine kinase B ; HCA, acide hydroxycarboxylique ; PDE3B, phosphodiesterase 3B ; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase. D'après (Offermanns, 2017).

En 2008, le lactate a été décrit comme un ligand agoniste spécifique du récepteur HCAR1 (Cai *et al.*, 2008). Les taux rapportés de lactate pour activer HCAR1 sont plutôt faibles par rapport aux ligands classiques de GPCR tels que les hormones ou les neurotransmetteurs. Cependant, alors que les concentrations plasmatiques basales de lactate sont comprises entre 0,5 et 2 mM (et seraient donc trop faibles pour activer complètement le récepteur HCAR1), les taux de lactate systémique peuvent augmenter jusqu'à 20 mM pendant

un exercice intensif mais les études chez des souris dépourvues de HCAR1 ne favorisent pas un rôle de ce récepteur dans la lipolyse pendant l'exercice intensif (Ahmed *et al.*, 2010; Offermanns, 2017). Une autre source d'acide lactique agissant sur HCAR1 dans le tissu adipeux provient des adipocytes eux-mêmes; le glucose est pris dans des conditions basales ou stimulées par l'insuline, et le lactate peut être produit à partir du pyruvate lors de la fermentation lactique suivant la glycolyse (voie métabolique d'assimilation du glucose et de production d'énergie dans le cytoplasme) (Figure 7.18) (Offermanns, 2017). Le lactate libéré par les adipocytes sert alors de substrat pour la gluconéogenèse hépatique en entrant dans la circulation, mais augmente également la concentration locale de lactate dans le tissu adipeux (Ahmed *et al.*, 2010; Offermanns, 2017). Ainsi, l'acide lactique peut agir de manière autocrine et/ou paracrine sur les effets anti-lipolytiques de l'insuline en activant HCAR1.

Des souris dépourvues de HCAR1 montrent une réduction de l'inhibition de la lipolyse induite par l'insuline (Ahmed *et al.*, 2010). L'insuline pourrait donc inhiber la formation d'AMPc induite par le lactate agissant via HCAR1, et ainsi exercer ses effets anti-lipolytiques. Chez ces souris, l'absence de HCAR1 n'a pas d'effet sur le poids corporel en conditions d'alimentation normale, mais induit une diminution significative du gain de poids en condition d'alimentation hypercalorique. Ceci pourrait résulter d'une faible désinhibition de l'activité de l'adénylyl cyclase entraînant des niveaux d'AMPc plus élevés, et une lipolyse accrue dans le tissu adipeux blanc ainsi qu'une augmentation de la production de chaleur et un brunissement dans les tissus adipeux brun et blanc (Figure 7.18) (Offermanns, 2017).

7.2.1.3 Implications pathologiques

Le blocage de HCAR1 dans les adipocytes par l'utilisation d'un antagoniste pourrait prévenir et traiter l'obésité induite par l'alimentation (Ahmed *et al.*, 2010). En effet, les études effectuées sur les souris déficientes en HCAR1 suggèrent que l'inhibition du récepteur pourrait être utilisé pour traiter l'obésité en réduisant les effets anabolisants induits par l'anti-lipolyse postprandiale de l'insuline médiée par HCAR1. Par ailleurs, l'activation de HCAR1 dans les adipocytes par l'utilisation d'un agoniste pourrait réduire la résistance à l'insuline chez les patients diabétiques de type 2 par l'induction d'une inhibition pharmacologique de la lipolyse (Offermanns, 2017). En effet, une inhibition partielle de la lipolyse améliore le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline sans altérer la masse grasse. Il faudrait étudier plus en détail dans quelles conditions les patients pourraient bénéficier de l'une ou

l'autre stratégie de traitement, c'est-à-dire les effets de réduction du poids par le blocage du récepteur, ou les effets anti-lipolytiques par l'activation du récepteur.

Très récemment, il a été montré que le récepteur HCAR1 est exprimé dans diverses cellules tumorales primaires (Roland *et al.*, 2014; Staubert *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016; Wagner *et al.*, 2017). Ceci est intéressant car la plupart des tumeurs solides montrent une augmentation de l'absorption du glucose et de la formation de lactate même dans des conditions normoxiques, appelé l'effet Warburg, avec des concentrations de lactate dans le microenvironnement tumoral de l'ordre de 30 mM, suffisantes pour activer HCAR1 (Warburg, 1925; Walenta *et al.*, 2000; Liberti and Locasale, 2016). De plus, le lactate est un composé métabolique impliqué et nécessaire dans toutes les principales étapes de la carcinogenèse, en particulier l'angiogenèse, l'échappement immunitaire, la migration cellulaire, la métastase et l'autosuffisance métabolique (San-Millan and Brooks, 2016). Ainsi, plusieurs études *in vitro* ont montré que l'inhibition ou la suppression de l'activation de HCAR1 peut entraîner une survie réduite des cellules tumorales. Pour expliquer cela, différents mécanismes ont été proposés : un déséquilibre du métabolisme lipide/acide gras pouvant affecter la prolifération de cellules cancéreuses surexprimant HER2 (Menendez, 2010; Staubert *et al.*, 2015), une expression réduite des transporteurs de lactate entraînant une absorption réduite (Roland *et al.*, 2014), ou une réduction de la réparation de l'ADN induite par le lactate (Wagner *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2017). De plus, l'extinction de l'expression de HCAR1 dans des cellules humaines d'adénocarcinome pancréatique montre une réduction significative de la croissance tumorale et des métastases hépatiques dans un modèle de xénogreffe *in vivo* (Roland *et al.*, 2014). Des données plus récentes suggèrent que l'activation de HCAR1 dans les cellules tumorales mammaires favorise également l'angiogenèse tumorale en stimulant l'expression de l'amphiréguline, un médiateur pro-angiogénique (Lee *et al.*, 2016). HCAR1 pourrait ainsi affecter la progression tumorale, mais plus de données sont nécessaires pour définir le rôle exact de ce récepteur dans les tumeurs, notamment *in vivo*, par l'utilisation de modèles appropriés.

7.2.2 Résultats

Nous avons ainsi choisi d'étudier HCAR1 dans la formation des métastases osseuses associées au cancer de la prostate en raison (1) de sa régulation transcriptionnelle potentielle par le facteur de transcription ERG, et (2) de la revue bibliographique présentée ci-avant. En effet, même s'il n'existait au début de ma thèse aucun lien entre le récepteur HCAR1 et le

cancer, son ligand, le lactate, était déjà connu pour être très présent dans le microenvironnement tumoral via l'effet Warburg, et influencer les différentes étapes de la carcinogénèse.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de HCAR1 dans la pathologie humaine du cancer de la prostate et ses métastases, puis nous avons étudié son expression et sa régulation transcriptionnelle dans des lignées de cellules tumorales prostatiques, et enfin, nous avons cherché à élucider son rôle dans le cancer de la prostate.

7.2.2.1 Expression de HCAR1 dans le cancer de la prostate et ses métastases chez l'homme

En commençant ce projet en 2012 pendant le Master 2 Recherche, aucun lien entre l'expression de HCAR1 et le cancer de manière générale n'avait encore été établi dans la littérature. Il était donc crucial pour nous, avant de poursuivre notre étude, de savoir si une surexpression de HCAR1, comme obtenue lors de l'étude transcriptomique, est observée dans la pathologie humaine du cancer de la prostate. Ainsi, nous avons utilisé une cohorte, composée de 52 échantillons humains de tissus prostatiques cancéreux (CaP) et 20 échantillons humains de tissus prostatiques sains, adjacents à la tumeur (N-CaP), obtenue en collaboration avec la tumorothèque du Cancéropôle Nord Ouest et déjà publiée par l'équipe (Tian *et al.*, 2014). De manière très intéressante, grâce à des expériences de RT-qPCR effectuées sur ces échantillons, nous avons observé une surexpression significative de *HCAR1* dans les CaP par rapport aux N-CaP (Figure 7.19A). Ce résultat montre pour la première fois un lien entre la surexpression de ce récepteur et le cancer de la prostate chez l'homme. Ensuite, étant donné l'expression « dose-dépendante » de *HCAR1* en fonction de l'expression de la fusion dans l'étude transcriptomique, nous avons étudié son expression dans les 52 échantillons humains de tissus prostatiques cancéreux dont 32 expriment la fusion, et 20 ne l'expriment pas. Cependant, aucune différence significative entre les deux types d'échantillons, ni aucune corrélation entre l'expression de *HCAR1* et celle de *ERG* n'a pu être mise en évidence par des expériences de RT-qPCR (Figure 7.19B et C).

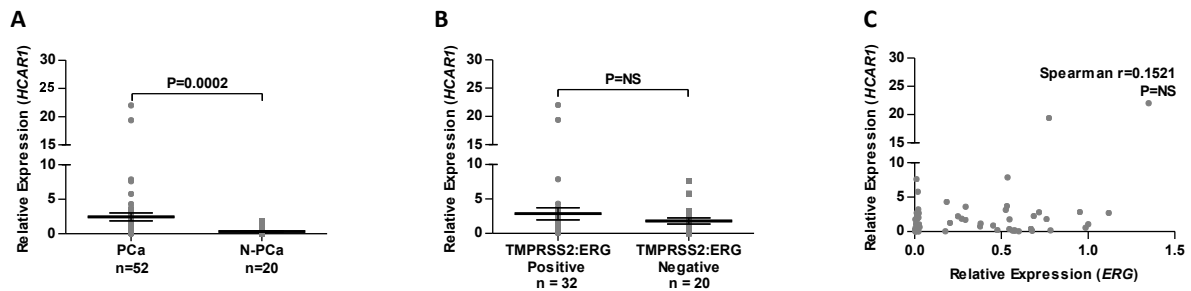


Figure 7.19 : Expression de *HCARI* dans des échantillons humains de cancers primaires de la prostate

A, Expression de *HCARI* analysée par RT-qPCR dans des échantillons humains de cancers primaires de la prostate CaP (n=52) ou de tissus sains prélevés au large de la tumeur N-CaP (n=20). P=0,0002, two-tailed Mann Whitney t test. **B**, Expression de *HCARI* analysée par RT-qPCR dans des échantillons humains de cancers primaires de la prostate TMPRSS2:ERG-positifs (n=32) et -négatifs (n=20). P=NS, two-tailed Mann Whitney t test. **C**, Représentation en nuage de points montrant l'expression relative de *HCARI* et celle de *ERG* dans les échantillons humains de cancers primaires de la prostate (n=52). Spearman $r=0,1521$, P=NS, two-tailed non parametric Spearman correlation test with $\alpha=0.05$.

Pour analyser plus finement l'expression de HCARI dans les tumeurs prostatiques humaines ou les métastases associées, et voir un lien potentiel avec l'expression de la fusion, des expériences d'immunohistochimie (IHC) sur des coupes de tissus ont été réalisées, permettant de localiser l'expression de la protéine directement au niveau des cellules tumorales, ou éventuellement dans d'autres cellules présentes dans le stroma. Cette distinction n'est pas possible par RT-qPCR.

Concernant les coupes de tumeurs primaires, l'expression du récepteur HCARI est retrouvée à la fois dans les cellules glandulaires normales de la prostate, dans des échantillons de tissus sains prélevés au large de la tumeur, ainsi que dans les cellules tumorales de la prostate, dans des échantillons de tissus prostatiques tumoraux primaires exprimant ou non la fusion (Figure 7.20). Une faible surexpression de HCARI peut être observée en présence de la fusion dans le cancer de la prostate primaire. Par ailleurs, dans ces coupes, l'expression de HCARI est également largement retrouvée au niveau du stroma, ce qui pourrait partiellement expliquer l'absence de corrélation mesurée par RT-qPCR entre l'expression du récepteur et celle de la fusion ou de ERG (Figure 7.20).

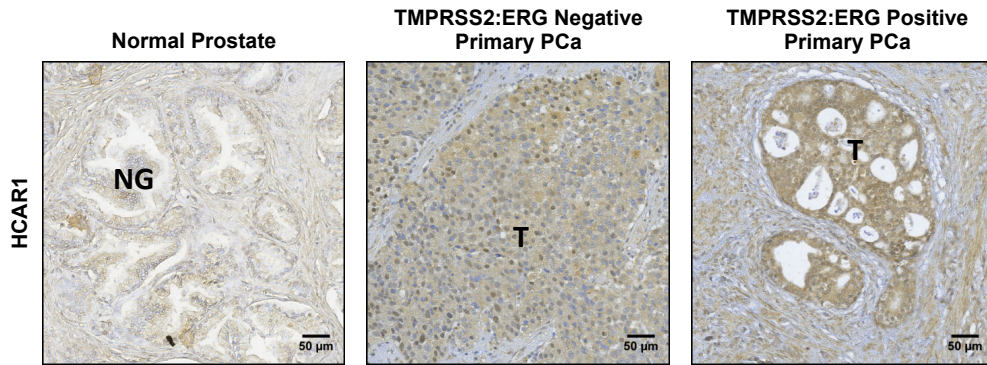


Figure 7.20 : Marquage immunohistochimique de HCAR1 dans des échantillons humains de cancers primaires de la prostate

Trois coupes de tissus ont été analysées, une coupe de tissus sains, prélevés au large de la tumeur, et deux coupes de tissus tumoraux de cancer de la prostate primaires exprimant ou non la fusion. L'hématoxyline a été utilisée comme contre-colorant pour augmenter le contraste (bleu). NG, Glandes Normales (Normal Glands) ; T = Tumeur (Tumor).

Concernant les coupes de métastases associées au cancer de la prostate, aucune expression du récepteur HCAR1 n'est détectée dans les métastases ganglionnaires, alors qu'une expression faible à modérée est retrouvée dans les métastases osseuses (Figure 7.21 ; Figure 7.22). Une fois encore, le récepteur HCAR1 semble être plus exprimé en présence de la fusion dans les métastases osseuses associées au cancer de la prostate (Figure 7.22).

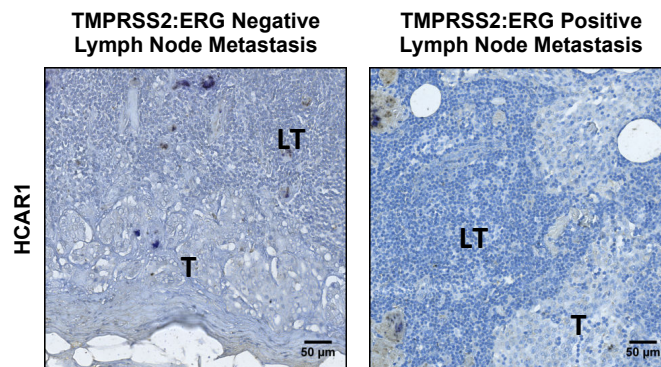


Figure 7.21 : Marquage immunohistochimique de HCAR1 dans des échantillons humains de métastases ganglionnaires associées au cancer de la prostate

Deux coupes de tissus ont été analysées et sont présentées. L'hématoxyline a été utilisée comme contre-colorant pour augmenter le contraste (bleu). LT, Tissu Lymphoïde (Lymphoid Tissue) ; T, Tumeur (Tumor).

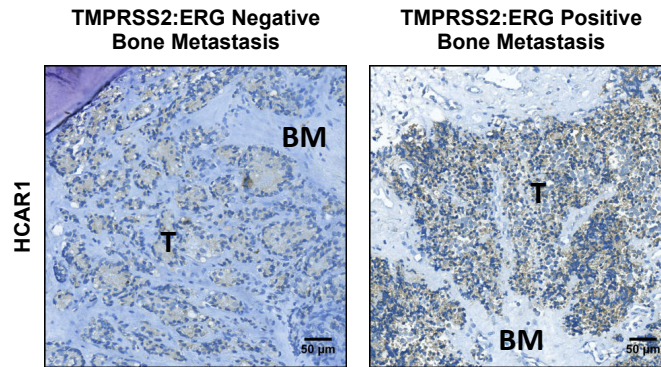


Figure 7.22 : Marquage immunohistochimique de HCAR1 dans des échantillons humains de métastases osseuses associées au cancer de la prostate

Cinq coupes de tissu ont été analysées et deux sont présentées. L'hématoxyline a été utilisée comme contre-colorant pour augmenter le contraste (bleu). BM, Matrice Osseuse (Bone Matrix) ; T, Tumeur (Tumor).

Compte tenu des difficultés à obtenir des échantillons métastatiques de patients, seules deux métastases ganglionnaires et cinq métastases osseuses ont pu être analysées par IHC au cours de ma thèse. Cependant, pour pallier cette difficulté et compléter ce résultat, des banques de données publiées et disponibles permettent d'effectuer des méta-analyses et de suivre l'expression de gènes dans différents types d'échantillons tumoraux. Quatre banques de données publiées ont été utilisées et ont permis d'observer une surexpression significative du gène codant le récepteur HCAR1 dans les cancer de la prostate primaires (Figure 7.23A, B et D) ainsi que dans les métastases associées au cancer de la prostate, par rapport aux tissus normaux (Figure 7.23C et D) (Yu *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2010; Peraldo-Neia *et al.*, 2011; Grasso *et al.*, 2012).

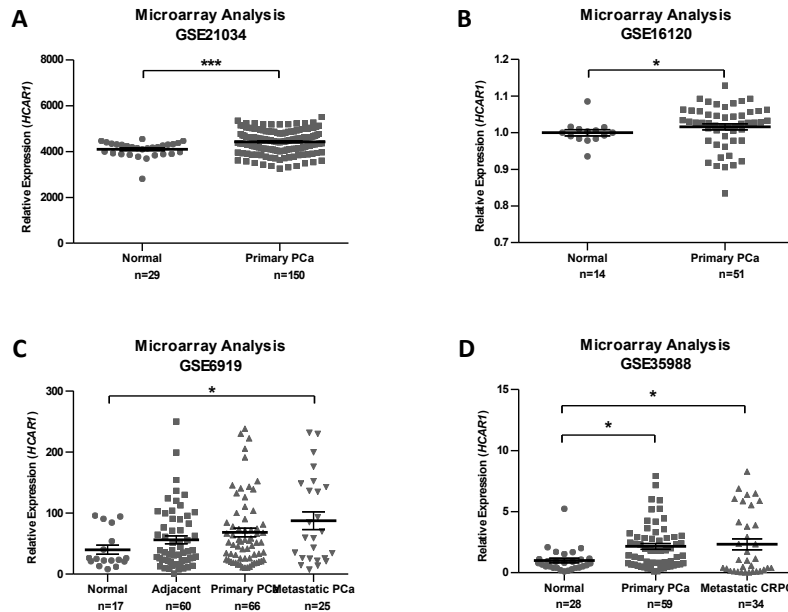


Figure 7.23 : Méta-analyses de l'expression de *HCARI* dans des échantillons humains de cancers de la prostate

Comparaison des profils d'expression de *HCARI* dans des échantillons humains prostatiques normaux et de cancer de la prostate primaires (A-B) ; des échantillons humains prostatiques normaux, adjacents à la tumeur, de cancer de la prostate primaires et métastatiques (C) ; des échantillons humains prostatiques normaux, de cancers de la prostate primaires et métastatiques (D) utilisant différentes données publiées (Yu *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2010; Peraldo-Neia *et al.*, 2011; Grasso *et al.*, 2012). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, two-tailed Mann Whitney t test (A-B), one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test (C-D).

De plus, une étude transcriptomique récemment publiée a été effectuée sur 149 échantillons humains métastatiques de CRPC, prélevés au niveau de différents sites, dont 20 au niveau de métastases osseuses associées au cancer de la prostate (Haider *et al.*, 2016). Nous avons utilisé ces données publiées et, compte tenu de nos résultats obtenus lors des expériences d'IHC sur les métastases ganglionnaires et osseuses, nous avons effectué différentes méta-analyses afin de voir si l'expression de *HCARI* pouvait être spécifique d'un type de métastases en particulier, notamment osseuses, ou alors si elle pouvait être spécifique des métastases à distance, par rapport aux métastases ganglionnaires qui ne l'expriment pas (Figure 7.21 ; Figure 7.22). Nos résultats montrent que l'expression de *HCARI* dans les métastases hépatiques est significativement supérieure à celle dans les métastases osseuses, et ne montrent pas de différence significative entre l'expression de *HCARI* dans les métastases à distance par rapport aux métastases ganglionnaires (Figure 7.24A et B). Une étude a déjà montré une corrélation entre l'expression de *HCARI* et l'apparition de métastases hépatiques liées au cancer du pancréas chez la souris (Roland *et al.*, 2014). Une possible explication de

cette corrélation est le fait que les taux de lactate au niveau du foie sont importants, étant donné que cet organe est le siège de la gluconéogenèse hépatique (voir section 7.2.1.2 des résultats). Par ailleurs, les patients atteints d'un cancer de la prostate présentant des métastases hépatiques ont le plus mauvais taux de survie globale comparés à d'autres patients présentant des métastases à d'autres sites (Halabi *et al.*, 2016)

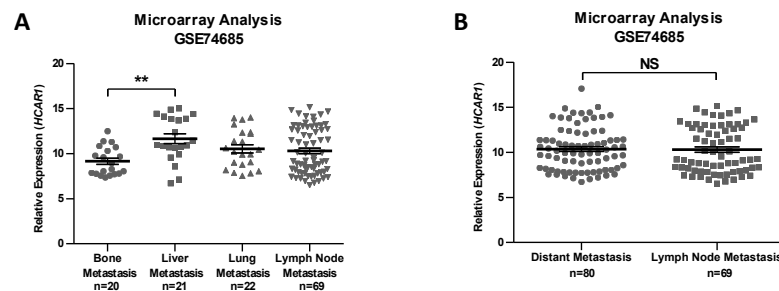


Figure 7.24 : Méta-analyses de l'expression de *HCARI* dans des échantillons humains de métastases associées au cancer de la prostate

Comparaison des profils d'expression de *HCARI* dans des échantillons humains de métastases osseuses, hépatiques, pulmonaires, et ganglionnaires (A) ou dans des échantillons humains de métastases à distance par rapport aux métastases ganglionnaires (B) (Haider *et al.*, 2016). ** $P < 0,01$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison test (A) ; two-tailed Mann Whitney t test (B).

L'ensemble de ces résultats met en évidence, pour la première fois, une surexpression de *HCARI* dans le cancer de la prostate et ses métastases associées, osseuses ou hépatiques, par rapport au tissu sain.

7.2.2.2 Expression et régulation transcriptionnelle de *HCARI* dans des lignées de cellules tumorales prostatiques

La corrélation entre l'expression de *HCARI* et celle de la fusion n'est pas claire. En effet, nos résultats précédents ont montré une absence de corrélation par des expériences de RT-qPCR dans notre cohorte d'échantillons humains, mais une possible corrélation par des expériences d'IHC dans les cancers de la prostate primaires et les métastases osseuses associées. Nous avons poursuivi cette étude *in vitro*, dans les clones cellulaires PC3c. L'expression de *HCARI* a d'abord été mesurée par RT-qPCR permettant ainsi d'observer une surexpression, dose dépendante par rapport à la quantité de *ERG* (Figure 9.1A en annexe), dans les clones PC3c-T1E4-L (4,1 fois), -M (8,1 fois) et -H (10,8 fois) par rapport au clone contrôle -pcDNA (Figure 7.25A). Ces résultats confirment ceux de l'étude transcriptomique

dans les clones PC3c-T1E4-L (3,4 fois), -M (4,9 fois), et -H (8,8 fois) par rapport au clone contrôle -pcDNA, bien que le différentiel soit plus grand lorsqu'il est mesuré par RT-qPCR. Ensuite, dans le clone PC3c-T1E4-H, l'utilisation d'un siRNA inhibant l'expression de *ERG* de 80% (Figure 9.1C en annexe) diminue l'expression de *HCAR1* d'environ 40% au niveau ARN (Figure 7.25B). Ainsi, il semble exister un lien direct entre l'expression de *ERG* et l'expression de *HCAR1* dans les clones PC3c. En effet, en présence de T1E4, *HCAR1* est surexprimée de manière dépendante de la quantité de *ERG*, alors qu'en absence de *ERG*, suite à l'utilisation d'un siRNA, *HCAR1* est inhibée.

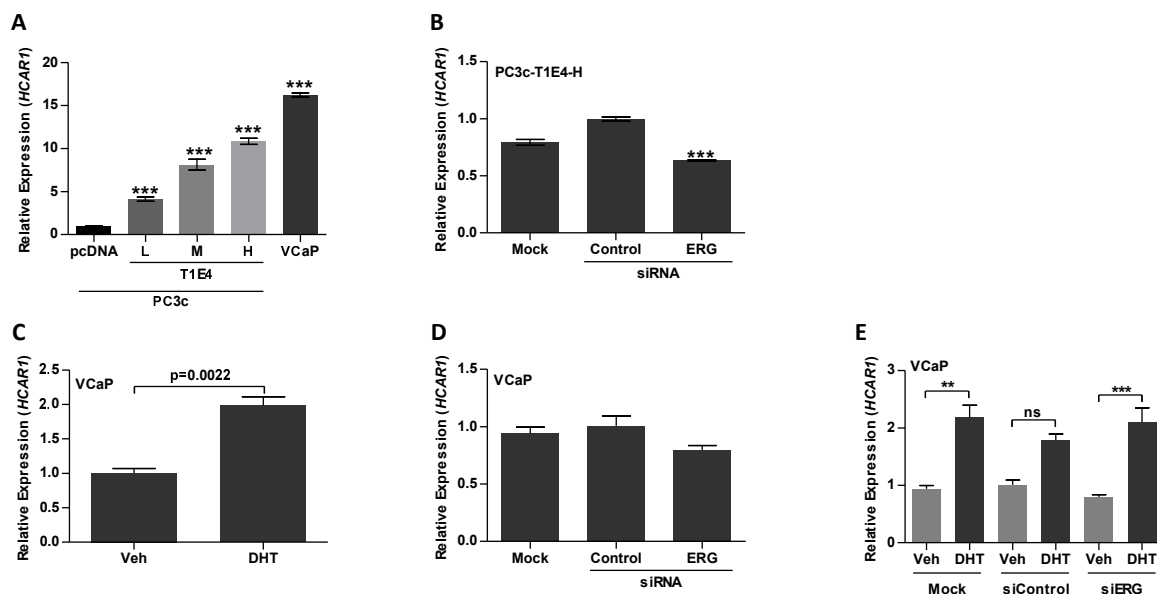


Figure 7.25 : Expression de *HCAR1* dans les cellules PC3c et VCaP, deux lignées tumorales prostatiques humaines

A, Expression de *HCAR1* analysée par RT-qPCR dans les clones PC3c-pcDNA contrôle, PC3c-T1E4-L, -M et -H exprimant différents niveaux de la fusion T1E4 (L : Low, M : Medium, H : High). *** $P < 0,001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test. **B**, Expression de *HCAR1* analysée par RT-qPCR dans les cellules PC3c-T1E4-H traitée avec un siRNA contrôle ou spécifique de *ERG*. Le niveau d'expression des cellules traitées avec le siRNA contrôle a été normalisé à 1. *** $P < 0,001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test. **C-E**, Expression de *HCAR1* analysée par RT-qPCR dans les cellules VCaP exprimant la fusion et traitées avec soit de l'éthanol (Veh) ou de la 5α -dihydrotestostérone (DHT) (**C**) ($P = 0,0022$, two-tailed unpaired t test), soit un siRNA contrôle ou spécifique de *ERG* (**D**) ($P = NS$, two-tailed Mann Whitney t test), soit l'ensemble de ces traitements (**E**) (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test). Le niveau d'expression des cellules traitées avec l'éthanol (**C**), le siRNA contrôle (**D**), ou le siRNA contrôle et l'éthanol (**E**) a été normalisé à 1.

Ces observations nous confortent dans l'hypothèse d'une régulation directe de *HCAR1* par le facteur de transcription ERG dans ce modèle d'étude PC3c. Pour aller plus loin et confirmer ce résultat, un deuxième modèle cellulaire a ensuite été utilisé. Les cellules VCaP, présentées précédemment, ont été isolées d'une métastase osseuse d'un patient atteint de cancer de la prostate et constituent la seule lignée cellulaire possédant la fusion *TMPRSS2:ERG* de manière endogène. Elles expriment également un AR fonctionnel, leur conférant des caractéristiques d'hormono-dépendances (Korenchuk *et al.*, 2001). Le gène codant le récepteur *HCAR1* est exprimé dans les cellules VCaP (16,2 fois par rapport au clone contrôle -pcDNA) (Figure 7.25A). Dans ces cellules, l'expression du gène de fusion, sous contrôle de la région promotrice du gène *TMPRSS2* contenant des éléments de réponse aux androgènes, est androgéno-dépendante et peut être augmentée avec un traitement par les androgènes (Tomlins *et al.*, Science, 2005). Ainsi, afin d'évaluer si l'expression de *HCAR1* est modulée suite à une augmentation de l'expression de la fusion, nous avons traité les cellules VCaP avec des androgènes, en particulier de la DHT à 10nM pendant 16 heures. Comme attendu, ce traitement a entraîné une augmentation d'expression de *ERG* d'environ 7 fois par rapport aux cellules VCaP non traitées (Figure 9.1A et C en annexe), ainsi qu'une augmentation d'expression de *HCAR1* de 2 fois (Figure 7.25C et E). D'autre part, quand l'expression endogène du gène de fusion est inhibée par l'utilisation d'un siRNA dirigé contre ERG et efficace à 75% (Figure 9.1B et C en annexe), l'expression de *HCAR1* n'est pas modulée de manière significative (Figure 7.25D et E).

Ainsi, la modulation de l'expression du gène de fusion a une faible influence sur l'expression du gène *HCAR1* dans les cellules VCaP. Afin d'évaluer l'existence d'une fixation directe du facteur de transcription ERG sur le promoteur du gène codant le récepteur *HCAR1*, nous avons analysé des données de ChIP-seq publiées dans les cellules VCaP, les seules disponibles pour l'étude de la fixation de ERG dans le cancer de la prostate (Chng *et al.*, 2012; Asangani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014). Cette analyse montre qu'il existe une fixation de ERG sur le promoteur de *HCAR1*, partiellement conservée entre les trois différentes études (Figure 7.26). Nous avons ensuite choisi une paire d'oligonucléotides ciblant cette région promotrice représentée par l'encadrement gris, et possédant un site de fixation de ERG potentiel (EBS, ETS Binding Site) (Figure 7.26). Des expériences de ChIP sont en cours au laboratoire dans les clones PC3c, afin de tester l'hypothèse d'une régulation directe de *HCAR1* par le facteur de transcription ERG.

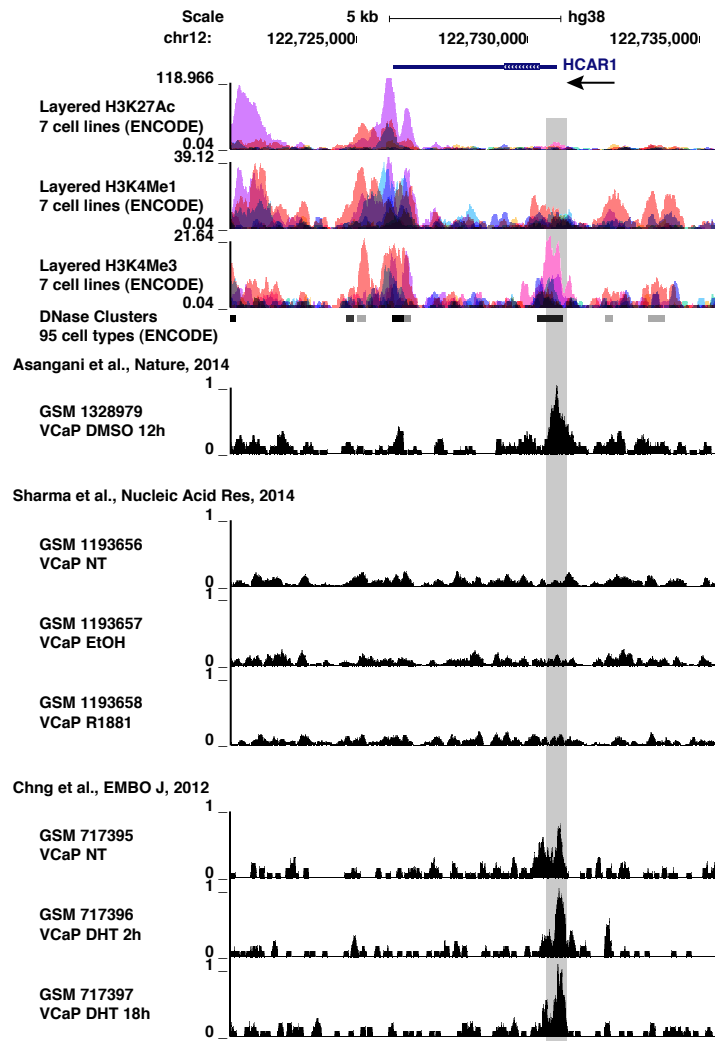


Figure 7.26 : Analyse de ChIP-seq publiés du facteur de transcription ERG sur le locus *HCARI* dans les cellules VCaP

Les jeux de données proviennent de trois publications et ont été analysés en utilisant UCSC Browser (Chng *et al.*, 2012; Asangani *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014). Les pistes sont montrées pour les marques épigénétiques H3K27Ac et H3K4Me1 (souvent trouvées près d'éléments régulateurs), H3K4Me3 (souvent trouvées près des promoteurs), l'hypersensibilité à la DNase I (les régions régulatrices, et en particulier les promoteurs, sont sensibles à la DNase), et pour les ChIP ERG dérivés de cellules VCaP non traitées ou traitées au R1881 ou au DHT comme indiqué. Pour l'hypersensibilité à la DNase I, une zone grise indique l'étendue de la région hypersensible (DNase Clusters), et l'intensité de gris est proportionnelle à la force de signal maximal observé.

L'ensemble de ces résultats permet d'envisager une régulation transcriptionnelle de *HCARI* par le facteur de transcription ERG dans les cellules tumorales prostatiques humaines.

7.2.2.3 Rôle de HCAR1 dans la migration cellulaire *in vitro*

De nombreux articles dans la littérature ont établi une augmentation des concentrations de lactate, ligand de HCAR1, dans le microenvironnement tumoral, via l'effet Warburg, et ce composé métabolique joue notamment un rôle dans la migration cellulaire et la formation de métastases (voir section 7.2.1.3 des résultats) (Warburg, 1925; Walenta *et al.*, 2000; Liberti and Locasale, 2016; San-Millan and Brooks, 2016). En outre, l'équipe a déjà montré que la présence du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* est associée à une augmentation des capacités migratoires et invasives des cellules tumorales *in vitro* (Tian *et al.*, 2014), à une augmentation du tropisme des cellules tumorales vers l'os *in vivo* (Deplus *et al.*, 2017), et à une augmentation du phénotype ostéocondensant des métastases osseuses induites *in vivo* (Delliaux *et al.*, Soumis). Nous avons donc orienté nos études fonctionnelles dans ce sens, dans un premier temps, avant la publication des articles décrivant un rôle de HCAR1 dans différents cancers, afin de voir si dans notre modèle d'étude, HCAR1 joue un rôle dans ce processus de migration cellulaire.

Pour cela, nous avons utilisé un siRNA inhibant l'expression de HCAR1 d'environ 80% dans le clone -H, puis un test de migration a été effectué (Figure 7.27A). L'inhibition de HCAR1 induit une diminution de la migration d'environ 50% après 20 heures de culture des cellules sur un système de plaques de 24 puits spécifiques, permettant le comptage automatisé des cellules ayant migrées (FluoroBlok) (Figure 7.27B). Des tests d'invasion pourront également être effectués afin d'évaluer l'implication de HCAR1 dans ce phénotype. Nous devons également évaluer si le phénotype observé est dû à l'activation du récepteur par son ligand, le lactate.

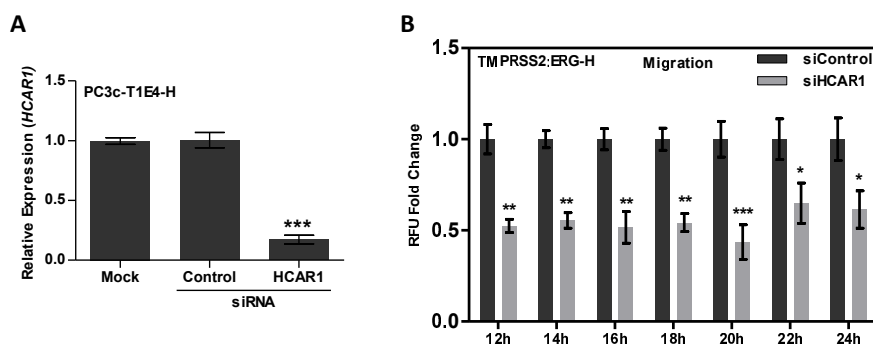


Figure 7.27 : Test de migration effectué sur le clone PC3c-T1E4-H traité avec un siRNA contrôle ou spécifique de HCAR1

A, Expression de *HCAR1* analysée par RT-qPCR dans le clone PC3c-T1E4-H traité avec un siRNA contrôle ou spécifique de HCAR1. Le niveau d'expression des cellules traitées avec le siRNA contrôle a été normalisé à 1. ***P<0,001, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunett's multiple comparison test. **B**, Test de migration effectué sur le clone PC3c-T1E4-H traité avec un siRNA contrôle ou spécifique de HCAR1. Pour chaque temps, le niveau d'expression des cellules traitées avec le siRNA contrôle a été normalisé à 1. *P<0,05 ; **P<0,01 ; ***P<0,001, two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison test.

Ce résultat montre que le récepteur au lactate HCAR1 est impliqué dans l'augmentation des capacités migratoires des cellules tumorales prostatiques PC3c exprimant la fusion.

7.2.3 Discussion et perspectives

7.2.3.1 Expression de HCAR1 dans le cancer de la prostate et ses métastases chez l'homme

Pour la première fois, une surexpression du récepteur HCAR1 est associée au cancer de la prostate. En effet, nous avons démontré que ce récepteur est surexprimé dans les cancers primaires de la prostate par rapport aux tissus prostatiques sains, grâce à des expériences de RT-qPCR et d'IHC effectuées sur des échantillons humains disponibles au laboratoire, ainsi que par des méta-analyses de données publiées dans la littérature. L'expression de ce récepteur semble également corrélée à la présence de la fusion au niveau protéique en IHC, mais pas par RT-qPCR, potentiellement en raison de l'expression stromale de HCAR1 dont on ne peut pas s'affranchir par RT-qPCR. L'ensemble de ces résultats pourrait être complété par une analyse plus fine d'un TMA (Tissue Microarray) de cancers primaires de la prostate exprimant ou non la fusion.

Ces expériences nous laissent également penser que l'expression de ce récepteur est associée au caractère métastatique de la pathologie, mais ce résultat reste à confirmer par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons de métastases. Ces analyses complémentaires pourront également permettre de déterminer si la surexpression de HCAR1 est spécifique d'un type de métastases en particulier, notamment osseuses ou hépatiques. En effet, cette piste est suggérée par les expériences d'IHC effectuées sur des échantillons humains disponibles au laboratoire dans lesquelles HCAR1 est plus exprimé dans les métastases osseuses par rapport aux métastases ganglionnaires, et par les méta-analyses de données publiées dans lesquelles HCAR1 est plus exprimé dans les métastases hépatiques par rapport aux métastases osseuses.

7.2.3.2 Développement d'outils pour les études fonctionnelles de HCAR1

Classiquement, pour étudier le rôle d'un gène, des expériences de modulation de son expression sont effectuées permettant ensuite d'effectuer des études fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, nous développons actuellement des outils permettant d'éteindre de manière stable l'expression du récepteur HCAR1. La première stratégie vise à utiliser des particules lentivirales contenant des shRNA spécifiques de HCAR1, dont l'expression est inductible par la doxycycline, obtenues directement auprès de la société Dharmacon. Une première infection de cinq constructions différentes a été effectuée, un shRNA contrôle non spécifique (contrôle négatif), un shRNA spécifique de GAPDH (contrôle positif) et trois shRNA spécifiques de HCAR1. Cependant, les trois constructions de shRNA spécifiques de HCAR1 se sont révélées inefficaces pour éteindre l'expression de *HCAR1*, alors que le contrôle positif est efficace pour inhiber l'expression de *GAPDH*. Nous envisageons de réaliser de nouvelles infections avec trois nouveaux shRNA spécifiques de HCAR1 que nous a fournis la société. En parallèle des shRNAs, nous développons pour la première fois au laboratoire la technique du CRISPR-Cas9 qui permet une extinction totale du gène ciblé. Les infections lentivirales ont été effectuées sur le clone PC3c-T1E4-H et les cellules VCaP, et les expériences de clonage sont en cours afin d'obtenir des clones dépourvus de HCAR1 de manière stable.

Afin de valider les résultats des études fonctionnelles, il est important de confirmer les modulations d'expression du récepteur HCAR1, surexpression ou inhibition, au niveau de l'expression du gène d'une part par RT-qPCR, mais également au niveau de l'expression de la protéine puisque c'est elle qui remplit la fonction du gène. Cependant, nous rencontrons des

difficultés à détecter la protéine par des expériences de western blot malgré l'utilisation de trois anticorps différents. Nous avons tenté d'optimiser nos protocoles de détection en utilisant des vecteurs d'expression de HCAR1 construits au laboratoire, et transfectés de manière transitoire dans les cellules PC3, exprimant un niveau basal plus faible de HCAR1. Quatre constructions ont été utilisées : une dans le vecteur pcDNA, permettant l'expression de la protéine HCAR1, et trois dans les vecteurs pEGFP-N1, pEGFP-N1m, et pEGFP-C1, permettant l'expression d'une protéine de fusion HCAR1-GFP pouvant ainsi être détectée grâce à un anticorps anti-GFP. Les vecteurs pEGFP-N1 et pEGFP-C1 permettent d'obtenir une protéine de fusion dans laquelle la GFP est placée respectivement en N-terminal ou en C-terminal de la protéine, c'est-à-dire, dans le cas de HCAR1 qui est un récepteur à sept domaines transmembranaires, du côté extracellulaire ou intracellulaire. Le vecteur pEGFP-N1m contient un ATG muté dans le gène codant la GFP, permettant de nous affranchir d'une traduction parasite de la GFP seule. L'efficacité de ces transfections pour la surexpression de *HCAR1* en ARN est présentée en Figure 7.28A. Nous avons également utilisé un siRNA inhibant l'expression de *HCAR1* en ARN d'environ 80% par rapport au siRNA contrôle dans les cellules PC3 (Figure 7.28B). Cependant, les western blot n'ont donné aucun résultat quelque soit l'anticorps utilisé. Des expériences d'immunofluorescence sont en cours mais cette technique permettrait de visualiser la protéine, sans la quantifier de manière précise.

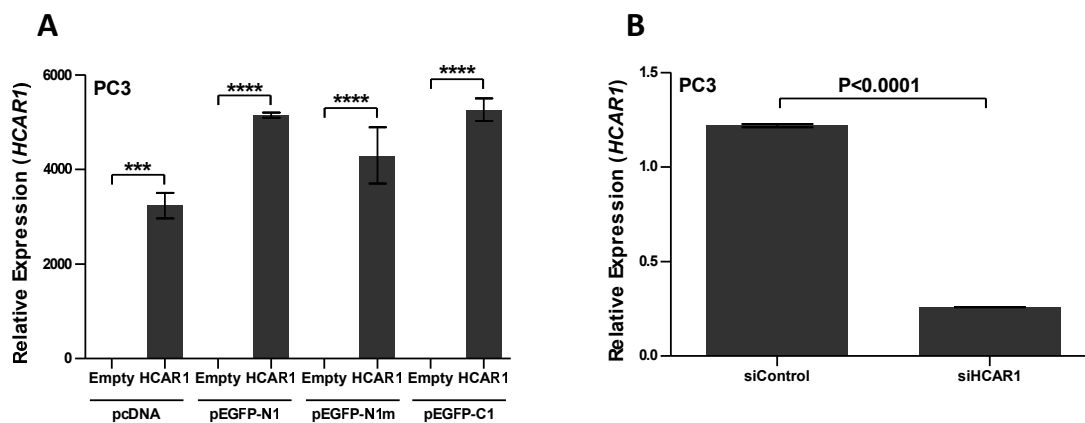


Figure 7.28 : Utilisation de vecteurs d'expression de HCAR1 et de siRNA spécifique de HCAR1 pour l'optimisation de la détection de la protéine en western blot

A, Expression de *HCAR1* analysée par RT-qPCR dans les cellules PC3 après transfection des différents vecteurs vides ou exprimant HCAR1 (pcDNA, pEGFP-N1, pEGFP-N1m (ATG, le codon d'initiation de la transcription, de la GFP est muté), pEGFP-C1). *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, one way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison test. **B**, Expression de *HCAR1* analysée par RT-qPCR dans les cellules PC3 traitée avec un siRNA contrôle ou spécifique de HCAR1. Le niveau d'expression des cellules traitées avec le siRNA contrôle a été normalisé à 1. $P < 0,0001$, two-tailed unpaired t test.

7.2.3.3 Rôle de HCAR1 dans le métabolisme des cellules tumorales *in vitro*

La source d'énergie de toute cellule est l'ATP (Adenosine Triphosphate), principalement produite lors de la phosphorylation oxydative par la chaîne respiratoire mitochondriale, dont l'efficacité dépend de la disponibilité en équivalents réducteurs NADH, NADH₂ et FADH₂ (Figure 7.29). Ces équivalents réducteurs sont essentiellement fournis par le cycle de Krebs qui convertit l'acétyl-CoA en citrate. Cet acétyl-CoA provient soit de la glycolyse, voie de dégradation du glucose en pyruvate, soit de la β -oxydation, voie de dégradation des acides gras en acétyl-CoA. Les cellules tumorales, plus particulièrement, ont une augmentation de l'absorption de glucose (« high glucose ») et de la formation de lactate (« high lactate »), même en conditions normoxiques, appelé l'effet Warburg (voir section 7.2.1.3 des résultats). Elles ont donc un apport énergétique important via la glycolyse. De manière intéressante, l'activité du récepteur HCAR1 est contrôlée par le lactate, notamment produit par la fermentation lactique du pyruvate, induisant une inhibition de la lipolyse, voie de dégradation des triglycérides en acides gras.

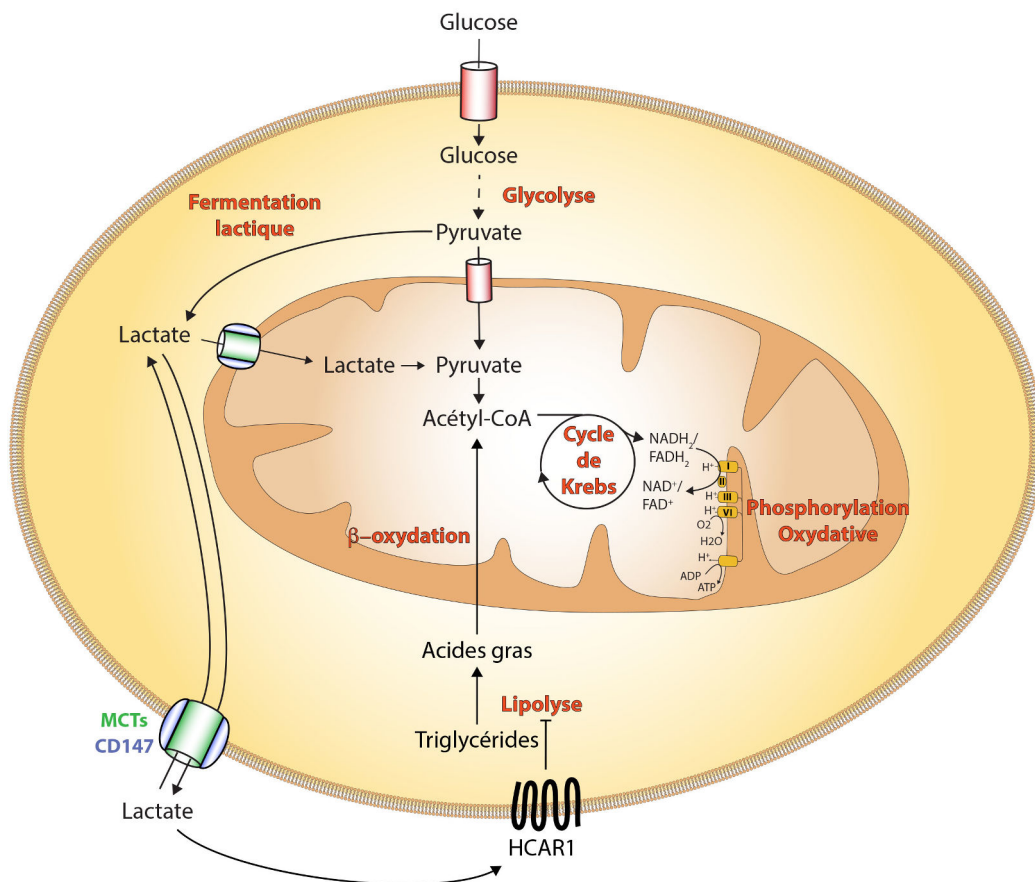


Figure 7.29 : Rôle de HCAR1 dans le métabolisme des cellules tumorales ?

Notre première hypothèse est que le récepteur HCAR1 pourrait agir comme un senseur métabolique du lactate, et influencer l'expression de transporteurs spécifiques de lactate à la membrane plasmique, les MCTs (Monocarboxylate Transporters), permettant d'augmenter son entrée dans la cellule. En effet, le lactate peut être utilisé comme métabolite énergétique alternatif pour produire de l'ATP (Kroemer and Pouyssegur, 2008; Sonveaux *et al.*, 2008; Kennedy and Dewhirst, 2010; Hirschhaeuser *et al.*, 2011). D'ailleurs, une étude montre que l'ajout de lactate dans le milieu de culture de cellules tumorales pancréatiques induit l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du lactate dans les cellules contrôles, mais pas dans celles traitées avec un siRNA ou un shRNA spécifique de HCAR1 (Roland *et al.*, 2014). Ces gènes sont *MCT1*, ayant une forte affinité pour le lactate et responsable de son entrée dans la cellule, *MCT4*, ayant une faible affinité pour le lactate et responsable de sa sortie de la cellule, *PGC1 α* (PPAR γ co-activator), régulant en partie l'expression de MCT1 (Benton *et al.*, 2008), et *CD147*, une chaperonne permettant le ciblage approprié de MCT1 et MCT4 à la membrane (Kirk *et al.*, 2000). De plus, l'inhibition de l'expression de HCAR1 n'a pas d'effet sur les cellules tumorales cultivées en condition « high glucose », mais induit la mort cellulaire de ces cellules si elles sont cultivées en « low glucose, high lactate » (Roland *et al.*, 2014).

Pour tester cette hypothèse, nous pourrions cultiver les cellules tumorales prostatiques traitées ou non avec un siRNA spécifique de HCAR1, en condition « low glucose, high lactate », et étudier l'expression des gènes précédemment cités, impliqués dans le métabolisme du lactate, ainsi que la survie ou la mort cellulaire. La difficulté sera d'établir les conditions de culture adéquate, très peu décrites dans la littérature. En effet, nous devons prendre en compte certains paramètres métaboliques de nos conditions de culture habituelles. D'une part, le milieu de culture contient du glucose, de la glutamine et du pyruvate, pouvant tous les trois être convertis en lactate respectivement via la glycolyse, la glutaminolyse, ou la fermentation lactique. D'autre part, celui-ci est supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal dont nous ne maîtrisons pas la composition exacte, et qui contient des métabolites énergétiques tels que ceux cités précédemment. Ainsi, une des alternatives sera l'utilisation du ligand artificiel de HCAR1, l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque (3,5-DHBA), non métabolisable par la cellule (Dvorak *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

Notre deuxième hypothèse est que le récepteur HCAR1 pourrait agir comme un senseur métabolique du lactate, et influencer le métabolisme mitochondrial en fonction de la présence ou non de lactate dans le milieu extracellulaire. En effet, en condition « high

glucose », la cellule est capable de produire du pyruvate via la glycolyse, puis l'acétyl-CoA est converti en citrate par le cycle de Krebs qui permet la production d'équivalents réducteurs alimentant la chaîne respiratoire mitochondriale et produisant de l'ATP. Dans cette condition, le récepteur HCAR1 est également activé par la fixation de son ligand, le lactate produit par la fermentation lactique du pyruvate, et inhibe la lipolyse, c'est-à-dire la voie de dégradation des lipides en acides gras. Il y a alors moins d'acides gras libres disponibles pour la β -oxydation, c'est-à-dire la voie de dégradation des acides gras en acétyl-CoA, donc moins d'acétyl-CoA disponible pour le cycle de Krebs, et donc moins d'équivalents réducteurs pour la respiration mitochondriale. En fait, le récepteur HCAR1 pourrait permettre de détecter la présence de taux élevés de lactate dans le microenvironnement tumoral, témoignant d'une glycolyse active et suffisante pour la production d'acétyl-CoA et la production d'ATP. En réponse à ces taux élevés de lactate et à cette « suffisance énergétique », le récepteur HCAR1 inhibe la lipolyse, favorisant ainsi le stockage des triglycérides. Cependant, en condition « low glucose » moins favorable à la glycolyse et à l'alimentation du cycle de Krebs en acétyl-CoA via cette voie, ce stock de triglycérides pourrait être rapidement sollicité. En effet, la glycolyse ne produisant plus de lactate, le récepteur HCAR1 n'est alors plus activé en absence de son ligand, ce qui entraîne une levée d'inhibition de la lipolyse, produisant ainsi des acide gras pour la β -oxydation, de l'acétyl-CoA pour le cycle de Krebs, et des équivalents réducteurs pour la phosphorylation oxydative mitochondriale produisant de l'ATP.

Pour tester cette hypothèse, nous pourrions cultiver les cellules, exprimant ou non le récepteur HCAR1, dans des conditions particulières de culture, permettant de ne pas utiliser (« low glucose ») ou d'inhiber (2-DG (2-Deoxy-D-Glucose)) la glycolyse (Tableau 7.1). La seule possibilité de production d'ATP et de survie pour la cellule serait alors d'utiliser la β -oxydation pour fournir de l'acétyl-CoA au cycle de Krebs et des équivalents réducteurs à la chaîne respiratoire mitochondriale. Le lactate, ligand naturel de HCAR1, ou le 3,5-DHBA, ligand artificiel de HCAR1, seront utilisés pour activer ce récepteur. L'activation du récepteur sera validée par des mesures des taux d'AMPc, comme cela a été fait dans la littérature (Staubert *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2015). L'etomoxir ou la perhexiline, deux inhibiteurs de la Carnitine O-Palmitoyltransférase (CPT), enzyme mitochondriale impliquée dans la β -oxydation, pourront être utilisés pour bloquer la β -oxydation, comme cela a été fait pour l'étude du rôle de HCAR3 dans le contrôle du métabolisme lipide/acide gras des cellules tumorales mammaires (Staubert *et al.*, 2015). Le palmitate, acide gras saturé capable d'alimenter la β -oxydation, pourra être utilisé pour activer la β -oxydation. L'effet de ces

différentes conditions de culture et de traitements sera évalué sur la survie ou la mort cellulaire d'une part (les résultats attendus sont présentés sur fond gris dans le Tableau 7.1), ainsi que sur le métabolisme mitochondrial d'autre part, via l'utilisation du système Seahorse Biosciences dans le laboratoire du professeur Pierre Sonveaux avec qui nous avons débuté une collaboration. Ce système permet d'évaluer la respiration mitochondriale via la mesure de l'OCR (Oxygen Consumption Rate : la mitochondrie consomme de l'oxygène pour générer de l'ATP lors de la phosphorylation oxydative) ; et la glycolyse via la mesure de ECAR (Extracellular Acidification Rate : les cellules génèrent de l'ATP via la glycolyse en produisant du lactate et des protons acidifiant le milieu).

Tableau 7.1 : HCAR1, un senseur métabolique influençant la β -oxydation et le métabolisme mitochondrial ?

Cellules HCAR1 positives cultivées en condition « low glucose » / 2-DG = HCAR1+ et glycolyse inactive / inhibée			
- Lactate / 3,5-DHBA = pas d'activation de HCAR1 donc lipolyse active		+ Lactate / 3,5-DHBA = activation de HCAR1 donc inhibition de la lipolyse	
Survie = acides gras disponibles pour la β -oxydation		Mort = pas d'acide gras disponible pour la β -oxydation	
- Etomoxir / Perhexiline = pas d'inhibition de la β -oxydation	+ Etomoxir / Perhexiline = inhibition de la β -oxydation	- Palmitate = pas d'acide gras saturé disponible pour la β -oxydation	+ Palmitate = acide gras saturé disponible pour la β -oxydation
Survie = acétyl-CoA disponible pour le cycle de Krebs	Mort = pas d'acétyl-CoA disponible pour le cycle de Krebs	Mort = pas d'acétyl-CoA disponible pour le cycle de Krebs	Survie = acétyl-CoA disponible pour le cycle de Krebs

Cellules HCAR1 négatives (siHCAR1) cultivées en condition « low glucose » / 2-DG = HCAR1- et glycolyse inactive / inhibée			
- Lactate / 3,5-DHBA = pas d'activation de HCAR1 donc lipolyse active		+ Lactate / 3,5-DHBA = pas d'activation de HCAR1 donc lipolyse active	
Survie = acides gras disponibles pour la β -oxydation		Survie = acides gras disponibles pour la β -oxydation	
- Etomoxir / Perhexiline = pas d'inhibition de la β -oxydation	+ Etomoxir / Perhexiline = inhibition de la β -oxydation	- Etomoxir / Perhexiline = pas d'inhibition de la β -oxydation	+ Etomoxir / Perhexiline = inhibition de la β -oxydation
Survie = acétyl-CoA disponible pour le cycle de Krebs	Mort = pas d'acétyl-CoA disponible pour le cycle de Krebs	Survie = acétyl-CoA disponible pour le cycle de Krebs	Mort = pas d'acétyl-CoA disponible pour le cycle de Krebs

De manière plus large, une autre hypothèse est que le développement et l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique du récepteur HCAR1 pourrait forcer les cellules tumorales à utiliser la β -oxydation plutôt que la glycolyse pour l'apport énergétique, les rendant ainsi plus sensibles à des traitements à base d'etomoxir ou de perhexiline. Autrement dit, une inhibition de HCAR1 associée à un traitement inhibant la β -oxydation pourrait nettement diminuer l'apport énergétique dans les cellules tumorales et induire la mort cellulaire, en particulier dans des conditions « low glucose », notamment induite par l'hypoxie, dans lesquelles la glycolyse est diminuée.

7.2.3.4 Rôle de HCAR1 dans le tropisme des cellules tumorales vers l'os, et le développement de métastases ostéocondensantes *in vivo*

En fonction des résultats obtenus *in vitro* pour ce gène, et de l'obtention de clones stables PC3c et/ou VCaP dépourvus du récepteur HCAR1, nous pourrions nous orienter vers d'autres expériences, notamment *in vivo*, afin d'étudier son rôle encore inconnu dans le cancer de la prostate. Nous pourrions envisager de mettre en place des modèles murins de type injections intra-cardiaques, permettant d'étudier son rôle dans le tropisme des cellules tumorales vers l'os, ou injections intra-tibiales, permettant d'étudier le développement des métastases ostéocondensantes, comme cela a déjà été effectué dans l'équipe (Deplus *et al.*, 2017; Delliaux *et al.*, Soumis).

III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES

8. DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES

8.1 Choix des modèles cellulaires et animaux

Dans la littérature, plusieurs lignées cellulaires tumorales prostatiques sont disponibles (voir section 3.3 de l'introduction). Les lignées cellulaires DU145 et PC3, isolées respectivement d'une métastase cérébrale ou osseuse d'adénocarcinome prostatique humain, ne possèdent pas de fusion ETS, sont androgéno-indépendantes et n'expriment pas AR (Stone *et al.*, 1978; Kaighn *et al.*, 1979). Ces cellules induisent des lésions ostéolytiques lors d'injections intra-osseuses, ce qui ne reproduit pas le phénotype des métastases osseuses chez l'homme, et les cellules DU145 possèdent un potentiel métastatique inférieur aux cellules PC3. Différentes lignées cellulaires dérivées des cellules PC3 ont été développées, suite à des implantations en série chez la souris. En effet, plusieurs cycles de récupération des tumeurs induites suivie de la réinjection des cellules tumorales ont été effectués. Ainsi, les cellules PC3M ont été sélectionnées pour leur capacité métastatique accrue, au poumon lors d'injections intravasculaires, à l'os lors d'injections intra-cardiaques (Pettaway *et al.*, 1996) ; les cellules PC3c ont été sélectionnées pour leur capacité à former des lésions osseuses mixtes (ostéolytiques et ostéoblastiques) lors d'injections intra-osseuses (Fradet *et al.*, 2013). La lignée cellulaire VCaP, isolée d'une métastase osseuse vertébrale de CRPC, possède la fusion TMPRSS2:ERG, est androgéno-dépendante et expriment AR et PSA (Korenchuk *et al.*, 2001). Ces cellules présentent un temps de doublement relativement long (120 à 144 heures), des taux d'efficacité de transfection ou d'infection faibles (expériences de notre équipe), mais sont capables d'induire des lésions mixtes (ostéolytiques et ostéocondensantes) lors d'injections intra-osseuses (Li *et al.*, 2009). La lignée cellulaire LNCaP, isolée d'une métastase ganglionnaire d'adénocarcinome prostatique humain, possède une translocation ETV1, est androgéno-dépendante et exprime un AR muté (T877A) (Horoszewicz *et al.*, 1980; Veldscholte *et al.*, 1990a; Veldscholte *et al.*, 1990b). Ces cellules ont été très utilisées pour développer des lignées cellulaires dérivées après des injections sous-cutanées ou orthotopiques chez la souris. Elles sont capables, ainsi que leurs dérivées, d'induire des métastases osseuses mixtes ou ostéocondensantes lors d'injections intra-osseuses (Tso *et al.*, 2000; Corey *et al.*, 2002; Corey *et al.*, 2003a). Ainsi, les cellules C4-2 androgéno-indépendantes ont été sélectionnées pour leur capacité à métastaser à l'os, mais avec une incidence faible (2/20) ; les cellules C4-2B androgéno-indépendantes ont été sélectionnées pour leur plus grande propension à métastaser à l'os par rapport aux cellules C4-2 (Wu *et al.*,

1998; Thalmann *et al.*, 2000). Les lignées cellulaires MDA-PCa-2a et MDA-PCa-2b, isolées d'une métastase osseuse de CRPC, sont androgéno-indépendantes et expriment un AR doublement muté (T877A et L701H) (Navone *et al.*, 1997). Cette double mutation diminue la sensibilité aux androgènes et modifie la spécificité vis-à-vis du ligand (Zhao *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000). Ces cellules induisent des lésions ostéocondensantes lors d'injections intra-osseuses. La lignée cellulaire MDA-PCa-2b possède une translocation ETV1.

Le récepteur aux androgènes, ainsi qu'un certain nombre d'altérations génétiques présentes dans les cellules tumorales prostatiques, jouent un rôle central dans la tumorigénèse prostatique. Cependant, les cellules DU145 et PC3 n'expriment pas AR, alors que la majorité des cellules tumorales, y compris celles issues de CRPC, maintiennent une expression de AR (voir section 2.3 de l'introduction) et n'expriment pas de fusion ETS, alors que 65 à 80% des cellules tumorales prostatiques possèdent des réarrangements chromosomiques à l'origine de ces fusions (voir section 4.3.1 de l'introduction). Les cellules LNCaP et MDA-PCa-2b possèdent une translocation ETV1 présente dans 5 à 10% des cellules tumorales prostatiques, et seules les cellules VCaP possèdent une fusion *TMPRSS2:ERG* présente dans 50 à 60% des cellules tumorales prostatiques. Ainsi, il n'existe pas de modèle cellulaire idéal pour l'étude du cancer de la prostate. Ceci est d'autant plus vrai lorsque nous nous intéressons aux capacités d'induction de métastases osseuses chez la souris, avec une incidence suffisamment élevée pour permettre des études fonctionnelles, et un phénotype similaire à celui retrouvé dans les métastases osseuses chez les hommes présentant un cancer de la prostate.

Ainsi, nous avons choisi d'utiliser principalement les cellules parentales PC3 et ses dérivées PC3M et PC3c, et dans une moindre mesure les cellules VCaP plus difficile à manipuler, pour étudier le rôle du gène de fusion *TMPRSS2:ERG*, exprimé respectivement de manière ectopique ou endogène dans ces cellules, dans le développement de métastases osseuses associées au cancer de la prostate. Par ailleurs, concernant les différentes techniques d'injections utilisées pour étudier les métastases osseuses chez la souris, nous avons choisi l'injection intra-cardiaque, pour l'étude du tropisme des cellules tumorales à l'os, et l'injection intra-osseuse, pour l'étude du phénotype des lésions induites (voir section 3.3 de l'introduction). L'injection orthotopique serait plus idéale mais aussi plus difficile à mettre en œuvre, et peu de lignées cellulaires tumorales prostatiques sont capables de former spontanément des métastases osseuses chez la souris suite à ce type d'injection.

8.2 Rôle du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate

Les résultats obtenus au cours de cette thèse soulignent le rôle du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans le cancer de la prostate et les métastases osseuses associées. En effet, nous avons démontré que des injections intra-cardiaques et intra-tibiales de cellules tumorales prostatiques exprimant la fusion *TMPRSS2:ERG* chez la souris SCID influencent respectivement le tropisme des cellules tumorales vers l'os (Deplus *et al.*, 2017), et le phénotype ostéocondensant des lésions osseuses induites (Delliaux *et al.*, Soumis).

Pour comprendre l'influence de la fusion sur le tropisme des cellules tumorales vers l'os et le phénotype ostéocondensant des lésions osseuses induites, nous avons cherché des gènes différentiellement exprimés suite à son expression dans les cellules tumorales prostatiques, respectivement par une étude transcriptomique des clones PC3c (microarray) (Tian *et al.*, 2014), et des cellules PC3M-Luc-C6 (RNA-seq) (Deplus *et al.*, 2017). En particulier, trois gènes sont surexprimés dans les clones PC3c utilisés pour les injections intra-tibiales, et directement régulés par le facteur de transcription ERG : *ET-1*, connue pour jouer un rôle dans la formation de métastases osseuses ostéocondensantes, *ALPL* et *COL1A1*, deux marqueurs osseux témoignant de l'acquisition d'un ostéomimétisme par les cellules tumorales prostatiques exprimant la fusion (Delliaux *et al.*, Soumis).

Ces dernières années, de plus en plus d'études ont cherché à définir une signature transcriptionnelle liée au facteur de transcription ERG dans des cohortes de patients atteints de cancer de la prostate (voir section 4.3.4.3 de l'introduction) (Setlur *et al.*, 2008; Gasi Tandefelt *et al.*, 2013; Barfeld *et al.*, 2014; Bismar *et al.*, 2014; Mochmann *et al.*, 2014; Rajan *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2016). Ainsi, il serait intéressant de compléter nos études transcriptomiques des clones PC3c et des cellules PC3M, permettant d'avoir une vue globale sur la variation du profil d'expression génique, par des expériences de ChIP-seq, permettant d'étudier les sites de fixation de *TMPRSS2:ERG* à l'échelle génomique, et ainsi de déterminer quel gène parmi nos études sont des gènes cibles directs de la fusion. Par ailleurs, la réalisation de ces expériences (microarray, RNA-seq, ChIP-seq) sur nos modèles cellulaires fournit une première information, mais à terme, il serait intéressant d'obtenir des échantillons de métastases osseuses de patients atteints de cancer de la prostate afin de définir une signature de gènes cibles de ERG, impliquée dans le développement des métastases osseuses.

L'ensemble de ces gènes pourrait constituer de nouveaux marqueurs pronostiques ou de nouvelles cibles thérapeutiques.

En plus des gènes impliqués dans le phénotype ostéocondensant des métastases osseuses, et le tropisme des cellules tumorales vers l'os, deux autres gènes ont été étudiés au cours de cette thèse, et ont un rôle dans l'invasion des cellules tumorales (*FSCN1*), ou le métabolisme (*HCARI*).

Le premier gène, *FSCN1*, codant une protéine de liaison à l'actine impliquée dans la stabilisation des invadopodes, est surexprimé dans la lignée cellulaire tumorale prostatique PC3c, dépendamment de la quantité de ERG. Cependant, l'expression de ce gène est fortement réprimée par AR dans les lignées cellulaires tumorales qui l'expriment. Il semble exister une régulation transcriptionnelle complexe de ce gène, avec une répression induite par AR, et une activation induite par ERG à confirmer. *FSCN1* joue un rôle dans les processus de migration et d'invasion cellulaire, notamment via la formation d'invadopodes. Chez l'homme, son expression est retrouvée dans les ostéoblastes et ostéocytes à proximité de la tumeur dans les métastases osseuses, mais pas dans les cellules tumorales de cancer primaire ou métastatique. L'obtention d'échantillons supplémentaires, notamment issue de patients sous hormonothérapie ou atteints d'un cancer de la prostate neuroendocrine sera indispensable à la poursuite de cette étude.

Le deuxième gène, *HCARI*, codant un récepteur activé par le lactate et inhibant la lipolyse, est surexprimé dans la lignée tumorale prostatique PC3c, dépendamment de la quantité de ERG. Pour la première fois, nous avons montré une forte expression de ce récepteur dans le cancer de la prostate, et ses métastases associées, osseuses ou hépatiques. La régulation transcriptionnelle de ce gène par le facteur de transcription ERG est encore en cours d'étude. Nous avons également mis en évidence un rôle de ce récepteur dans la migration cellulaire *in vitro*. Des études fonctionnelles permettront de mieux appréhender le rôle de ce récepteur, notamment dans le métabolisme mitochondrial des cellules tumorales, dans le tropisme vers l'os, ou le développement de métastases osseuses ostéocondensantes.

Enfin, d'autres facteurs de transcription de la famille ETS sont également impliqués dans des réarrangements chromosomiques du cancer de la prostate, notamment ETV1 dans 5 à 10% des cas (Tomlins *et al.*, 2005). Il serait intéressant d'étudier s'il existe une redondance, ou au contraire une spécificité fonctionnelle, entre les gènes de fusion impliquant ERG ou ETV1. Ce travail fait d'ailleurs l'objet d'une autre thèse au laboratoire.

8.3 Rôle du récepteur aux androgènes, un « garde-fou » ?

Le récepteur aux androgènes joue un rôle essentiel dans le maintien de la survie et de la croissance des cellules prostatiques normales et tumorales (Abate-Shen and Shen, 2000; Litvinov *et al.*, 2003) (voir section 2.3 de l'introduction). C'est pourquoi la suppression androgénique associée ou non à un blocage du AR par des antagonistes est le traitement de référence des patients en récurrence biochimique ou atteints d'un cancer de la prostate localement avancé ou métastatique (Huggins and Hodges, 1972). Cependant, malgré une réponse initiale allant de 2 à 3 ans, tous les patients finissent par progresser vers la résistance à la castration, principale cause de décès lié au cancer de la prostate (Harris *et al.*, 2009). Le plus souvent, la progression vers un CRPC est provoquée par la réactivation de la signalisation AR via différents mécanismes (Watson *et al.*, 2015). Cependant, 10 à 20% des CRPC constituent un sous-ensemble de tumeurs, associées à l'acquisition de caractéristiques neuroendocrines, et échappant à la thérapie par suppression androgénique via un mécanisme d'indépendance de la signalisation AR (Vlachostergios *et al.*, 2017).

Au cours de cette thèse, nous avons étudié le gène *FSCN1*, codant une protéine de liaison à l'actine impliquée dans la stabilisation des invadopodes, et ainsi dans l'invasion des cellules tumorales prostatiques. L'expression de ce gène est fortement réprimée en présence d'un AR fonctionnel, ce qui serait plutôt de bon pronostic étant donné son rôle dans l'invasion. Nous envisageons que l'expression de ce gène, et potentiellement d'autres ayant des rôles similaires, ne soient plus réprimées chez des patients traités par hormonothérapie, mais également chez des patients résistants à la castration, présentant un cancer de la prostate neuroendocrine. Cette levée d'inhibition d'expression de ce groupe de gènes pourrait expliquer l'acquisition d'un phénotype plus agressif par les cellules tumorales prostatiques. Ainsi, dans un premier temps, il serait intéressant de combiner des méta-analyses d'études transcriptomiques publiées, afin d'identifier des gènes réprimés ou activés respectivement en présence ou en absence d'un AR fonctionnel, avec des méta-analyses de CHIP-seq publiés, afin d'évaluer la fixation de AR sur les gènes précédemment identifiés. En fonction des résultats obtenus, des études fonctionnelles pourront être effectuées en utilisant différentes lignées cellulaires tumorales prostatiques, exprimant AR ou non. Par ailleurs, même si le développement de modèles murins pouvait fournir des arguments supplémentaires, il est impératif d'obtenir des échantillons humains de patients traités par hormonothérapie, ou ayant développés un cancer de la prostate neuroendocrine, afin de valider notre hypothèse.

8.4 Sous-groupes de patients et thérapies ciblées

Dans la publication N°1, nous montrons que l'expression du gène de fusion *TMPRSS2:ERG* influence le phénotype ostéocondensant des lésions osseuses induites lors d'injections intra-tibiales chez la souris (Delliaux *et al.*, Soumis). L'expression de *ET-1*, codant un peptide sécrété jouant un rôle dans la formation des métastases osseuses ostéocondensantes (Guise *et al.*, 2003), est augmentée dans les clones PC3c, et directement régulée par le facteur de transcription ERG, expliquant ainsi en partie le phénotype observé *in vivo*. L'ET-1 exerce ses effets paracrines et autocrines en se liant à ses récepteurs spécifiques, en particulier, l'activation de ETAR (Endothelin A Receptor) favorise la croissance tumorale prostatique et les métastases, suggérant que cet axe pourrait être une cible thérapeutique intéressante (Bagnato *et al.*, 2011). Cependant, même si les essais cliniques de phase II utilisant des antagonistes de ETAR, atrasentan ou zibotentan, étaient prometteurs, les essais de phase III n'ont produit aucun bénéfice concernant la progression des métastases osseuses, les douleurs osseuses associées, ou encore la survie globale des patients atteints de CRPC et possédant des métastases osseuses (James *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2015). Une des raisons pouvant expliquer cet échec pourrait être une mauvaise sélection des patients pour lesquels une inhibition de l'axe ET-1 serait bénéfique, opinion partagée par le docteur Fred Saad, urologue ayant participé à ces essais cliniques (Yu *et al.*, 2012). En effet, les patients exprimant d'importants niveaux de marqueurs de renouvellement osseux montrent une meilleure réponse à ce type de traitement (Lara *et al.*, 2014). De plus, nous montrons pour la première fois que l'expression du gène *ET-1* est régulée par le facteur de transcription ERG, produit du réarrangement chromosomique *TMPRSS2:ERG* dans le cancer de la prostate. Ainsi, il serait intéressant de tenir compte de l'expression du gène de fusion, en plus de l'expression de marqueurs de renouvellement osseux, tels que ALPL, COL1A1, ou ET-1, afin d'évaluer si les patients présentant une altération d'expression de l'ensemble de ces gènes répondent mieux aux traitements par antagonisme du récepteur de ET-1.

Récemment, une infrastructure multi-institutionnelle américaine a réalisé une étude prospective de séquençage complet de l'exome et du transcriptome de biopsies de tumeurs osseuses ou des tissus mous d'une cohorte de 150 patients atteints de CRPC (Robinson *et al.*, 2015). Les altérations génomiques des gènes *ETS*, *AR*, *P53* et *PTEN* ont été les plus fréquemment retrouvées, représentant 40 à 60% des cas (voir section 2.4 de l'introduction)

(Figure 8.1). Il existe de nombreuses autres altérations génomiques, notamment des gènes de réparation de l'ADN, tels que *BRCA2* (*Breast Cancer 2*), ayant une fréquence plus élevée dans les CRPC par rapport aux cancers primaires. Finalement, 89% des patients atteints de CRPC présentent au moins une altération génomique, suggérant l'importance du séquençage clinique et son influence sur les décisions de traitements des patients.

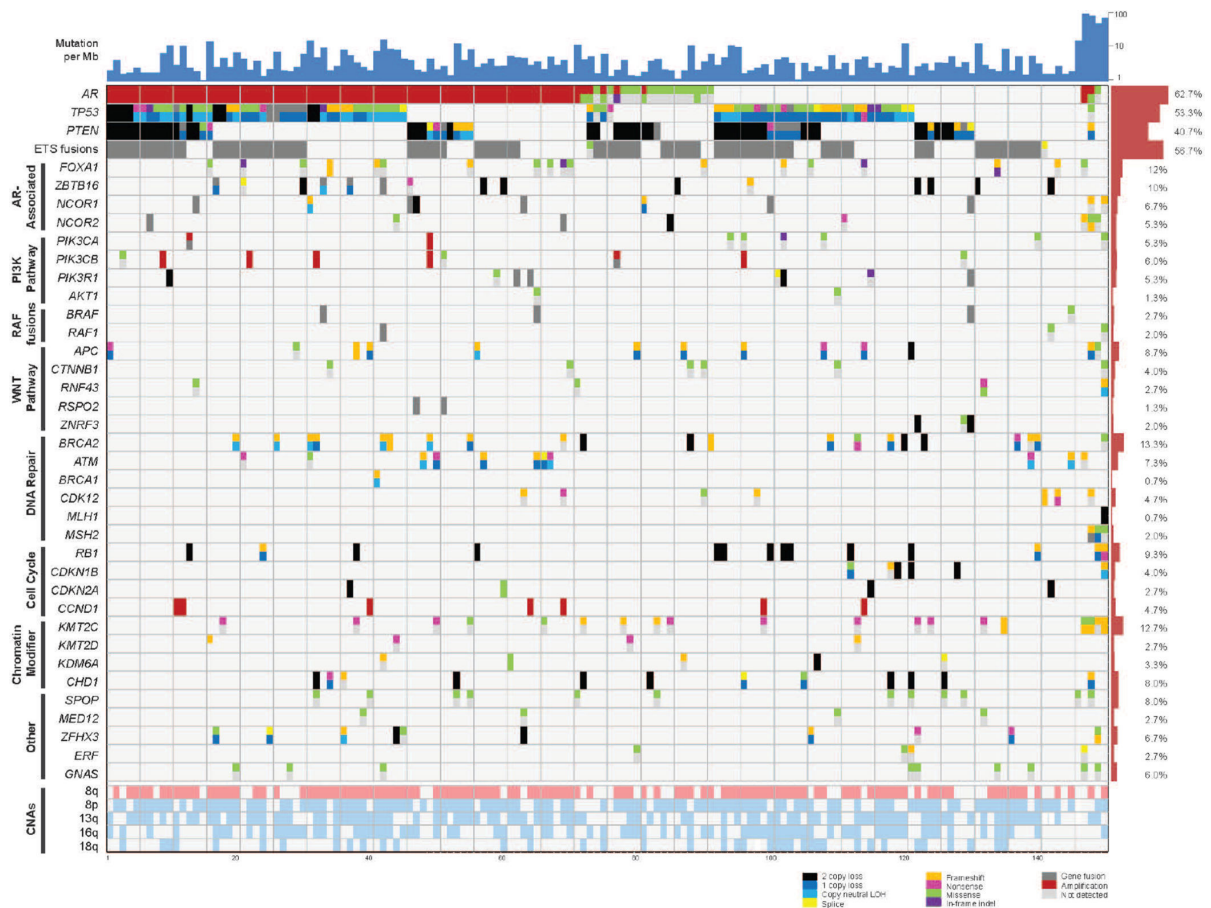


Figure 8.1 : Altérations génomiques retrouvées dans les CRPC métastatiques.

D'après (Robinson *et al.*, 2015).

A l'avenir, chaque patient présentant un cancer, quel qu'il soit, devrait pouvoir bénéficier d'une thérapie ciblée en fonction des caractéristiques de celui-ci. En effet, il existe une variabilité entre les cellules tumorales de sites primaires différents, mais également entre les cellules tumorales d'un même site primaire chez deux patients différents, et même entre les cellules tumorales du site primaire et du site métastatique chez le même patient. Ainsi, il serait intéressant de pouvoir établir une « carte d'identité » des cellules tumorales, permettant de connaître leurs caractéristiques, en particulier leurs altérations génomiques, afin d'utiliser la meilleure combinaison de thérapies possible pour chaque cancer, chaque patient, susceptible d'y répondre de manière différente.

IV. ANNEXES

9. Figure supplémentaire pour FSCN1 et HCAR1

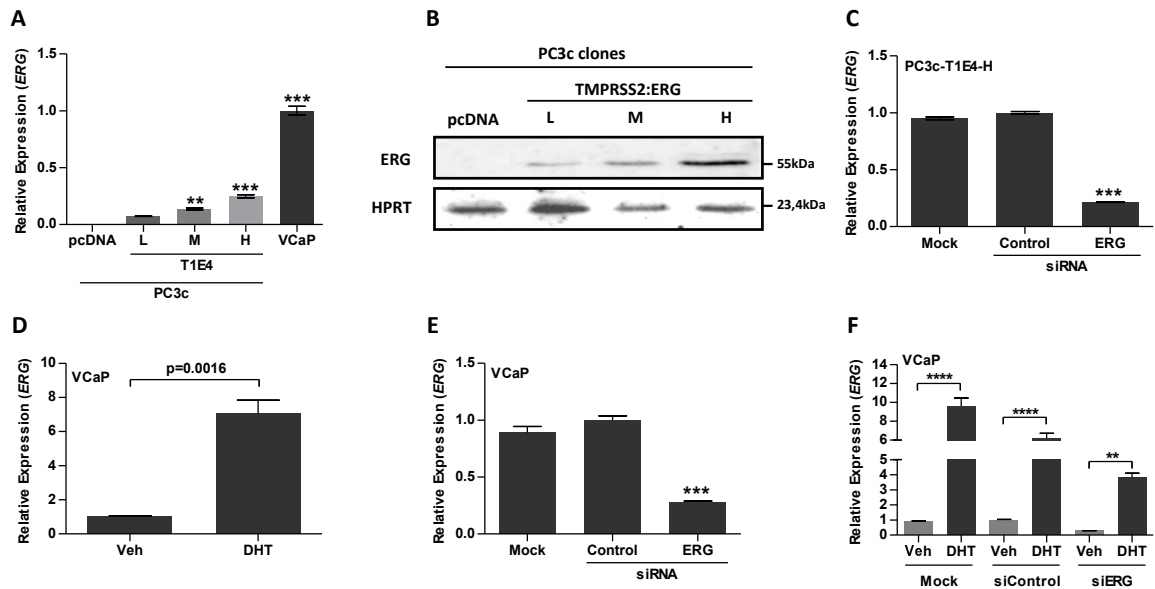


Figure 9.1 : Expression de ERG dans les cellules PC3c et VCaP, deux lignées tumorales prostatiques humaines

A, Expression de ERG analysée par RT-qPCR dans les clones PC3c-pcDNA contrôle, PC3c-T1E4-L, -M et -H exprimant différents niveaux de la fusion T1E4 (L : Low, M : Medium, H : High). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test. **B**, Expression de ERG analysée par WB dans les clones PC3c-pcDNA contrôle, PC3c-T1E4-L, -M et -H. **C**, Expression de ERG analysée par RT-qPCR dans les cellules PC3c-T1E4-H traitée avec un siRNA contrôle ou ERG. Le niveau d'expression des cellules traitées avec le siRNA contrôle a été normalisé à 1. *** $P < 0.001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test. **D-F**, Expression de ERG analysée par RT-qPCR dans les cellules VCaP exprimant la fusion et traitées avec soit de l'éthanol (Veh) ou de la dihydrotestostérone (DHT) pour augmenter l'expression de ERG (**D**) ($P = 0.0016$, two-tailed unpaired t test), soit un siRNA contrôle ou ERG (**E**) (*** $P < 0.001$, two-tailed Mann Whitney t test), soit l'ensemble de ces traitements (**F**) (** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test). Le niveau d'expression des cellules traitées avec l'éthanol (**D**), le siRNA contrôle (**E**), ou le siRNA contrôle et l'éthanol (**F**) a été normalisé à 1.

10. Publications au cours de la thèse

Est présentée en annexe la **Publication N°1** concernant la caractérisation des métastases osseuses induites par les cellules PC3-TMPRSS2:ERG et PC3c-TMPRSS2:ERG lors de l'implantation intra-tibiale chez la souris, citée dans la partie résultats.

Egalement, sont présentées en annexe deux publications supplémentaires auxquelles j'ai participé au cours de mon Doctorat.

En ce qui concerne la **Publication N°2**, publiée par l'équipe du docteur Edith Bonnelye avec qui nous collaborons, nous avons étudié l'implication de $ERR\alpha$ (Estrogen Related Receptor α) dans la progression tumorale vers l'os des CRPC. Par méta-analyses, nous avons d'abord montré que l'expression de $ERR\alpha$ est corrélée aux CRPC. Nous avons ensuite analysé la progression des cellules tumorales et les voies de signalisation associées dans des modèles CRPC exprimant ou réprimant $ERR\alpha$ *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, l'expression accrue de $ERR\alpha$ a conduit à une progression tumorale rapide, avec à la fois une destruction et une formation osseuse, en agissant directement sur les cellules de l'os. En effet, elle a entraîné une surexpression du VEGF-A et de WNT5A, deux facteurs capables de réguler l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes. De plus, leur expression est positivement corrélée à celle de $ERR\alpha$ dans des échantillons humains de CRPC. Enfin, cette surexpression de $ERR\alpha$ a augmenté la sécrétion de TGF β 1 par les cellules tumorales, lui-même capable de stimuler l'expression stromale de la périostine, un facteur pro-métastatique. Ceci suggère un rôle de $ERR\alpha$ dans la régulation du microenvironnement tumoral pour améliorer la progression tumorale. L'ensemble de ces résultats démontre que $ERR\alpha$ est un régulateur de la progression des cellules CRPC dans l'os. Par conséquent, l'inhibition de $ERR\alpha$ pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique pour les métastases osseuses du cancer de la prostate.

Dans la **Publication N°3**, nous avons développé des lignées cellulaires bioluminescentes exprimant la fusion TMPRSS2:ERG afin d'évaluer son rôle dans la croissance tumorale et l'apparition de métastases osseuses dans un modèle de souris. Tout d'abord, nous avons montré que la fusion TMPRSS2:ERG augmente la migration cellulaire et la taille des tumeurs sous-cutanées. Ensuite, en utilisant des expériences d'injections intracardiaques chez la souris, nous avons montré que l'expression de la fusion TMPRSS2:ERG augmente le nombre de métastases dans l'os, et affecte également le profil de la propagation métastatique, en augmentant l'incidence des tumeurs dans les membres postérieurs et la colonne vertébrale, deux des sites les plus fréquents de métastases osseuses du cancer de la prostate chez l'homme. Enfin, l'analyse transcriptomique par RNA-seq a mis en évidence une série de gènes régulés par la fusion et impliqués dans le processus métastatique. L'ensemble de ce travail a permis de montrer que TMPRSS2:ERG augmente le tropisme osseux des cellules tumorales prostatiques et le développement de métastases osseuses.

10.1 Publication N°1

***TMPRSS2:ERG* gene fusion expression enhances
the osteoblastic phenotype of prostate cancer bone metastases.**

**DELLIAUX C.*, TIAN V.T.*, BOUCHET M., FRADET A., VANPOUILLE N.,
FLOURENS A., DEPLUS R., VILLERS A., LEROY X., CLEZARDIN P.,
DE LAUNOIT Y., BONNELYE E., DUTERQUE-COQUILLAUD M.**

*Co-first authors

Submitted for publication in *Cancer Research* on 24th February 2017.

TMPRSS2:ERG gene fusion expression enhances the osteoblastic phenotype of prostate cancer bone metastases

DELLIAUX Carine^{1*}, TIAN V. Tian^{1,2*}, BOUCHET Mathilde^{3,4}, FRADET Anais^{3,4}, VANPOUILLE Nathalie¹, FLOURENS Anne¹, DEPLUS Rachel¹, VILLERS Arnaud⁵, LEROY Xavier⁶, CLEZARDIN Philippe^{3,4}, de LAUNOIT Yvan¹, BONNELYE Edith^{3,4}, DUTERQUE-COQUILLAUD Martine¹

¹Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T – Mechanisms of Tumorigenesis and Target Therapies, F-59000 Lille, France, ²Center for Genomic Regulation (CRG), The Barcelona Institut of Science and Technology, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Dr. Aiguader 88, S-08003 Barcelona, ³Unité INSERM U1033, F-69372 Lyon, ⁴Université Claude Bernard Lyon 1, F-69008 Lyon, ⁵Département d’Urologie, CHRU, Université de Lille, Lille, France, ⁶Institut de Pathologie-Centre de Biologie-Pathologie-Centre Hospitalier Régional et Universitaire, F-59037 Lille, France.

*Co-first authors

Running title: TMPRSS2:ERG and bone metastasis

Keywords: Fusion Gene, TMPRSS2:ERG, Prostate Cancers, Bone Metastasis, Osteoblastic lesions.

Correspondence: Dr. Martine Duterque-Coquillaud, Institut de Biologie de Lille, CNRS UMR8161, 1 rue du Professeur Calmette, F59021, France

Email: martine.duterque@ibl.cnrs.fr

Telephone: +33 3 20 87 10 95

Fax: +33 3 20 87 11 11

The authors declare no potential conflicts of interest.

Word count

Abstract: 194

Main Text: 4671 (Intro. 508; Mat. Meth. 1231; Results 2138; Discussion 794)

Figure Legends: 1501

7 Figures

3 Supplementary items: 1 Table, 2 Figures

ABSTRACT

Prostate cancers have a strong propensity to metastasize to bone and promote osteoblastic lesions. *TMPRSS2:ERG* is the most frequent gene rearrangement identified in prostate cancer, and whether it is involved in prostate cancer bone metastasis is largely unknown. Using an intra-tibial metastasis model, we found that ectopic expression of the *TMPRSS2:ERG* fusion enhances the ability of prostate cancer cell lines to induce osteoblastic lesions through stimulating bone formation and inhibiting the osteolytic response. In line with these *in vivo* results, we demonstrate that the *TMPRSS2:ERG* fusion protein increases the expression of Endothelin-1 - a protein with a documented role in osteoblastic bone lesion formation. Interestingly, under osteogenic culture conditions, *TMPRSS2:ERG*-expressing prostate cancer cells show a higher expression of osteoblastic markers such as *type I collagen* and *alkaline phosphatase*. Importantly, the *TMPRSS2:ERG* fusion protein is able to bind to the regulatory regions of these genes in both prostate cancer cell lines and human prostate cancer samples. Correspondingly, the expression levels of these osteoblastic markers are correlated with the expression of the *TMPRSS2:ERG* fusion in patients. Taken together, our results reveal an unprecedented role for the *TMPRSS2:ERG* gene fusion in osteoblastic lesion formation induced by prostate cancer cells.

INTRODUCTION

Bone lesion metastases occur in more than 80% of men who die from prostate cancer (1). Bone is a dynamic tissue that is constantly being remodeled by the interplay between bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts. Through a process called osteomimicry, metastatic prostate cancer cells acquire a bone cell-like phenotype that enables them to survive and proliferate within the bone microenvironment (2-4). At the same time, tumor cells homing into bone marrow promote alterations in osteoblast and osteoclast function (5-7). The reciprocal stimulations between tumor and bone cells generate a vicious circle and result in an alteration of bone structure (2). Despite the high occurrence of bone lesion formations found in prostate cancer, and the incurability of this complication, little is known about the molecular mechanisms underlying bone metastasis in this disease (8).

Chromosomal rearrangements involving genes encoding ETS (E-twenty-six) transcription factors are found in more than 50% of human prostate cancer cases and constitute the most frequent gene rearrangements in human malignancies (9, 10). The most common ETS gene rearrangement is *TMPRSS2:ERG* - a fusion which causes the androgen-responsive promoter of *TMPRSS2* to promote aberrant expression of *ERG*. This results in a significant upregulation of the ERG transcription factor (9). Several clinical studies suggest that *TMPRSS2:ERG* fusions are associated both with poorly differentiated samples (Gleason score >6) (11-13) and with disease recurrence after surgery (14). Other studies however, claim that these fusions - depending on the exact exons involved in the genomic rearrangement and on the copy number - are associated with a favorable prognosis (15, 16). Nevertheless, a higher dosage of ERG clearly leads to a more severe disease phenotype (15, 16). Indeed, using prostate cancer cell lines and diverse mouse models, several studies have demonstrated that the overexpression of *TMPRSS2:ERG* fusion proteins not only facilitates prostate cancer initiation (17, 18), but also promotes both prostate cancer cell migration and invasion (19, 20). Mechanistically, ERG

controls a transcriptional network related to the development of prostate cancer and its progression into a metastatic disease (21, 22). Until now, whether, and how *TMPRSS2:ERG* fusions are involved in prostate cancer bone metastasis remains unknown.

Recently, our group has shown that *TMPRSS2:ERG* fusions are involved in conferring bone tropism to prostate cancer cells (23). Here, in the present study, we aim to mechanistically dissect the role of *TMPRSS2:ERG* fusions in facilitating prostate cancer cells to progress in the bone microenvironment and induce bone metastasis. We found that after injection into the tibiae of severe combined immunodeficiency (SCID) mice, the human prostate cancer cell lines PC3 and PC3c expressing one of the most frequent *TMPRSS2:ERG* fusions, increase the osteoblastic phenotype of bone lesions and inhibit osteoclast-mediated bone destruction. In agreement with these findings, we also demonstrated that *TMPRSS2:ERG* directly controls the expression of two major osteoblastic markers, *type I collagen (COL1A1)* and *alkaline phosphatase (ALPL)*, as well as of *endothelin-1 (ET-1)*, which is known to favor the osteoblastic phenotype of bone metastases. Taken together, our results reveal an unprecedented role for *TMPRSS2:ERG* fusions in the control of prostate cancer cell-induced bone remodeling.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture, treatment and chemical reagents

PC3 and VCaP cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The PC3c cells, were isolated *in vitro* after single cell population culture (24). PC3 cells were cultured in F12K nutrient mixture, whereas PC3c and VCaP cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All media was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and cells were sub-cultured every 3-4

days. To induce *TMPRSS2:ERG* expression, VCaP cells were treated with 10 nM DHT (5 α -Androstan-17 β -ol-3-one), or vehicle for 16 hours. Unless otherwise stated, all chemical reagents were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Generation of *TMPRSS2:ERG* expressing cells

PC3c clones, stably transfected with either empty pcDNA3.1 vector or *TMPRSS2:ERG* expression vector, were obtained as described previously (namely PC3c-CT, PC3c-T1E4-L, PC3c-T1E4-M and PC3c-T1E4-H) (19). To obtain the PC3 clones, the same *TMPRSS2:ERG* cDNA was subcloned into the retroviral vector pLPCX (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA). For production of the virus, 7 x 10⁶ GP2-293 cells (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) were transfected with 25 μ g of empty pLPCX or pLPCX/*TMPRSS2:ERG*, and 6 μ g of pVPack-VSV-G (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) in the presence of 64 μ L of Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After incubating for two days with fresh medium, 4 mL of the viral particle-containing supernatants were mixed with 8 μ g/mL of Polybrene. This was then incubated with 0.3 x 10⁶ PC3 cells in a 6-well plate in order to generate the *TMPRSS2:ERG* expressing cells (namely PC3-CT and PC3-T1E4). Successfully infected cells were selected the next day by adding Puromycin (1 μ g/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in the culture medium for one week.

siRNA transfection

Predesigned and pooled siRNAs were obtained from GE Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Cells were transfected with the siRNA (50 nM) using Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's instructions. Gene-knockdown effects were evaluated 72 hours after the transfection. The siRNAs used in this study were siERG (ON-TARGETplus

SMARTpool L-003886-00) and the control siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Pool D-001810-10).

RNA extraction and gene expression analysis

Total RNA was purified using the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. For retrotranscription, 1 µg of total RNA was used to generate cDNA using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative PCRs (qPCRs) were performed using the power SYBR-Green PCR Master kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a Stratagene Mx3005P qPCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The relative expression levels of individual genes were calculated using the $-2^{\Delta\Delta CT}$ method and normalized to that of the 18S or L32 housekeeping gene. Optimal primer specificity and efficiency were validated according to the Mx3005P qPCR system user's guide. The primers used in this study can be found in Supplementary Table S1.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP assays were performed as described (19) using either a polyclonal rabbit anti-ERG antibody (sc-353, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA) or a control rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA). The genomic DNA was purified using NucleoSpin Clean-up columns (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer's instructions. Immuno-precipitated genomic DNA was analyzed by PCR or qPCR, and details of the primers used in this study can be found in Supplementary Table S1.

ELISA

Conditioned media from cell culture were used for protein detection. The levels of ET-1 secreted by PC3c cells and by PC3c-CT, PC3c-T1E4-L, PC3c-T1E4-M and PC3c-T1E4-H clones were measured using a Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Human prostate cancer samples

Human prostate cancer samples (n=52) were obtained from the local tumor tissue bank, C2RC (Lille, France), after approval by the internal review board (CSTMT-042, 27/07/2009). These tumor tissue samples, which had previously been extracted and subsequently frozen, originated from radical prostatectomies or trans-urethral prostatic resections performed at Lille University Hospitals (CHRU de Lille). All patients were informed and consent was obtained by the referring physician. To extract RNA, tissue samples were first homogenized in TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and total RNA was prepared using the NucleoSpin RNA kit. RNA quality and quantity were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyser system. Pathological findings of these prostate cancer samples have previously been described (19).

Image treatment and statistical analysis

All image treatments were carried out using Image J. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). The statistical methods used in this study are indicated in the corresponding figure legends. Unless otherwise indicated, all values in the figures are expressed as means \pm s.e.m.

Animal studies

The mice used in this study were handled according to French national rules (Décret N° 87-848 du 19/10/1987, Paris). Experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University Lyon-1, France (CEEA-55 Comité d’Ethique en Expérimentation Animale DR2014-32). Animal experiments were routinely inspected by the attending veterinarian to ensure continued compliance with the proposed protocols. Animals bearing tumor xenografts were carefully monitored for established signs of distress and discomfort and were humanely euthanized. Intra-osseous tumor xenograft experiments in anaesthetized mice were carried out in six-week-old SCID male mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA). PC3 cells are known to induce pure osteolytic lesions, while PC3c cells induce mixed lesions with both osteolytic and osteoblastic regions in the bone marrow cavity (24, 25). PC3 and PC3c cells (6×10^5 in 15 μ L PBS) were injected into the bone marrow cavity. Mice were then sacrificed after either six weeks (PC3) or 10 weeks (PC3c). Radiographs (LifeRay HM Plus, Ferrania) of animals were taken using a Faxitron MX-20 (Faxitron X-ray Corporation). The bone lesion surface, which includes both osteolytic and osteoblastic regions, was measured using the computerized image analysis system MorphoExpert (Exploranova). The extent of the bone lesions for each animal was expressed in mm^2 . Once sacrificed, the hind limbs of mice were collected for histology and histomorphometrics analyses. Tibiae were scanned using microcomputed tomography (Skyscan1174, Skyscan Kontich, Belgium) with an 8.8 voxel size and an X-ray tube (50kV; 800mA) with a 0.5-mm aluminum filter. Three-dimensional reconstructions and rendering were performed using the manufacturer’s software packages NRecon & CTVox, and Skyscan, respectively. Bone volume/tissue volume (%BV/TV) measurements include residual trabecular and remaining cortical bone for PC3 models, as well as new bone formation in the bone marrow cavity in the PC3c model. Tibiae from animals were fixed, decalcified in Osteosoft® (Merck, Darmstadt, Germany) for four weeks, and then embedded in paraffin. In

order to calculate the tumor burden to soft tissue volume (TB/STV) ratio (i.e., percentage of tumor tissue), sections of 5 μm were stained with Goldner's trichrome and histomorphometric analyses were performed. The *in situ* detection of osteoclasts was carried out on metastatic bone tissue sections using the tartrate-resistant acid phosphatases (TRAP) activity assay kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). The osteoclastic surface (OC.S/BS) was calculated as the ratio of TRAP-positive trabecular bone surface (OC.S) to the total bone surface (BS), using the computerized image system MorphoExpert (Exploranova).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry of human and mouse tissue sections was performed using anti-ERG (ab92513, Abcam, Cambridge, UK) at 1/100, anti-Ki67 (ab15580, Abcam, Cambridge, UK) at 1/200, and anti-ET-1 (No250640, Abbiotec, San Diego, CA, USA) at 1/100. Sections were incubated with secondary HRP-conjugated antibody. Counterstaining was performed using Mayer's hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany).

RESULTS

Human prostate cancer bone metastasis samples exhibit higher *ERG* expression levels

TMPRSS2:ERG fusions have been identified in the majority of primary prostate cancer cases and are known to control a transcriptional network related to the development of cancer and its metastatic progression (21, 22). However, no study has evaluated the relative expression of *ERG* in different prostate cancer metastasis samples. First, we analyzed a microarray dataset (GSE74685) including CRPC (castration-resistant prostate cancer) metastasis samples from both bone (n=20) and other sites (n=129) (26). Upon comparing these two groups of samples, we found that *ERG* expression is significantly higher in bone

metastasis than in samples derived from other sites (Fig. 1), thereby highlighting a potential role of *TMPRSS2:ERG* fusions in prostate cancer bone metastasis progression.

TMPRSS2:ERG* expression in prostate cancer cells enhances their capacity to induce osteoblastic lesions *in vivo

To assess whether *TMPRSS2:ERG* gene fusions are involved in prostate cancer bone metastasis progression *in vivo*, we used a prostate cancer-induced bone metastasis murine model. We first used the human *TMPRSS2:ERG*-negative prostate cancer cell line, PC3c, which was originally derived from the PC3 cell line. PC3c cells are capable of inducing mixed osteoblastic/osteolytic bone lesions when injected into the tibiae of male SCID mice (24, 25). As such, these cells more precisely recapitulate the phenotype of human bone metastasis progression than any other available prostate cancer cell lines. Notably, it has been shown that the parental PC3 cells solely induce pure osteolytic bone lesions (24), and in fact, mixed osteolytic/osteoblastic bone lesions have been found in most human prostate cancer bone metastasis samples (6). We have previously established and characterized several PC3c cell clones which stably express the most common *TMPRSS2:ERG* fusion. This fusion, named T1E4, consists of the noncoding exon 1 of *TMPRSS2* fused with exon 4 of *ERG* (19). Forced expression of *TMPRSS2:ERG* in PC3c cells (PC3c-T1E4) resulted in an increase of their migration and invasion capacities *in vitro*. To avoid any single-clone cell effect, we pooled PC3c cell clones expressing distinct levels (low, medium and high expression) of the *TMPRSS2:ERG* fusion in a 1:1:1 ratio, and injected them into the tibiae of SCID mice. PC3c cells expressing empty pcDNA vector (PC3c-CT) were also injected as a control. Ten weeks after injection, radiographical analysis revealed that, compared to the control animals, animals bearing tumors overexpressing the *TMPRSS2:ERG* fusion exhibited significantly smaller and larger bone destruction and bone formation areas, respectively (Fig. 2A and B). Further

analysis using three-dimensional micro-computed tomographic reconstruction, showed that tibiae bearing PC3c-T1E4 cells had a larger bone volume than those injected with PC3c-CT cells (Fig. 2C and D). Accordingly, Goldner's trichrome staining of tissue sections and histomorphometric analysis of tibiae lesions respectively showed that PC3c-T1E4 cell inoculation resulted in an induced bone formation within the bone marrow cavity and a lower skeletal tumor burden (Fig. 2E and F). Moreover, TRAP staining revealed 20% less TRAP-positive osteoclast surface (OC.S/BS) in tibiae injected with PC3-T1E4 cells compared to those inoculated with control PC3-CT cells (Fig. 2G and H). Immunostaining of the bone lesions revealed the presence of Ki-67-positive proliferating tumor cells, for which ectopic expression of *ERG* was also confirmed (Supplementary Fig. S1A). Collectively, these data show that the expression of the *TMPRSS2:ERG* fusion in PC3c cells is capable of enhancing the osteoblastic phenotype of skeletal lesions.

In contrast to PC3c cells, PC3 cells are known to solely induce pure osteolytic lesions when injected into the tibiae of mice. We then hypothesized that ectopic expression of *TMPRSS2:ERG* in PC3 cells would be capable of altering bone lesion characteristics just as it did in the PC3c model. Six weeks after intra-tibial tumor cell injection, both the T1E4-expressing PC3 cells (PC3-T1E4) and the PC3 control cells (PC3-CT) had induced osteolytic lesions (Fig. 3A). However, the PC3-T1E4-bearing bone showed a significantly lower level of bone destruction (Fig. 3B), a larger bone volume (Fig. 3C and D), and a lower tumor burden (Fig. 3E and F). Similar to effect observed in the PC3c model, TRAP staining of tibial sections from animals bearing PC3-T1E4 cells showed 5% less TRAP-positive osteoclast surface compared to control tibiae (Fig. 3H). Cancer cells were detected in these bone lesions using Ki-67 and ERG antibody-based immunostaining (Supplementary Fig. S1B). These results suggest that the expression of *TMPRSS2:ERG* in PC3 cells inhibits osteoclasts and decreases bone destruction.

Taken together, our results indicate that overexpression of the *TMPRSS2:ERG* fusion in prostate cancer cells increases the osteoblastic phenotype of bone lesions and inhibits osteoclastic destruction *in vivo*.

ERG transcription factor regulates ET-1 expression in prostate cancer cells

To further understand the mechanism by which aberrant expression of *TMPRSS2:ERG* fusions in prostate cancer cells contributes to osteoblastic lesion formation, we first focused on gene expression comparisons between the PC3c-CT and PC3c-T1E4 cell clones (19). Interestingly, among the 2,000 deregulated genes in cells expressing *TMPRSS2:ERG*, the expression of *ET-1* is upregulated. The *ET-1* gene encodes a 21-amino acid secreted peptide that has a documented role in osteoblastic lesion formation in prostate cancer bone metastasis (27). In fact, this peptide is able to stimulate osteoblast differentiation (28) and prevent osteoclast-mediated bone resorption (29, 30), thereby promoting overall osteoblastic lesion formation.

By using PC3c clones expressing distinct levels of the *TMPRSS2:ERG* T1E4 fusion (low, medium and high), we first confirmed that forced expression of the fusion results in *ET-1* upregulation. In fact, the increase in *ET-1* mRNA levels was correlated with the expression level of the fusion (Fig. 4A). In agreement with these results, an ELISA assay revealed that PC3c-T1E4 clones secreted significantly higher levels of ET-1 compared to control PC3c-CT cells (Fig. 4B). Importantly, knocking down expression of the *TMPRSS2:ERG* fusion in PC3c-T1E4 cells using an siRNA against *ERG*, led to approximately a 40% reduction in *ET-1* expression compared to in control siRNA-transfected cells (Fig. 4C). In addition, to further test the possible role of *TMPRSS2:ERG* in regulating ET-1 expression, we used another prostate cancer cell line, VCaP, which is the only cell line harboring endogenous expression of *TMPRSS2:ERG* (31). Knocking down the *TMPRSS2:ERG* fusion in VCaP cells

(Supplementary Fig. S2A) resulted in a significant decrease in *ET-1* expression (40%; Fig. 4D). Furthermore, DHT-stimulated *TMPRSS2:ERG* fusion expression (Supplementary Fig. S2B) was associated with a significant increase in *ET-1* mRNA expression (Fig. 4E).

Interestingly, using published ERG ChIP-seq data (21, 32, 33) obtained from VCaP cells, we found that there are three ERG binding sites at the *ET-1* gene locus. Moreover, these sites were marked by the active transcriptional regulatory epigenetic marks H3K4me1 (histone 3 lysine 4 monomethylation), H3K4me3 (histone 3 lysine 4 trimethylation), H3K27ac (histone 3 lysine 27 acetylation) or DNaseI sensitivity clusters (Fig. 4F). As such, we performed ChIP-qPCR assays and also found significant ERG binding to these regulatory elements in PC3c-T1E4 cells (Fig. 4G-I).

Taken together, our results highlight that ERG, which becomes aberrantly expressed due to the *TMPRSS2:ERG* rearrangement, directly controls *ET-1* expression in prostate cancer cells.

ET-1 expression positively correlates with ERG expression in human prostate cancer samples

To verify whether ERG is capable of regulating *ET-1* gene expression in human prostate cancer samples, we used RNAs isolated from 52 human prostatectomy specimens that belonged to a prostate cancer cohort (19). Among these human prostate cancer samples, 32 showed detectable *TMPRSS2:ERG* fusion transcripts (61.5%). Interestingly, we found that *ET-1* mRNA levels are significantly higher in *TMPRSS2:ERG*-positive prostate cancer samples than in *TMPRSS2:ERG*-negative ones (Fig. 4J). Importantly, a two-tailed non-parametric Spearman correlation analysis showed that *ET-1* expression significantly correlates with *ERG* expression in this cohort (Fig. 4K).

In addition, we performed immunohistochemistry staining in fusion-positive and -negative primary prostate cancer, lymph node and bone metastasis samples. As expected, ERG

expression was strong in all fusion-positive cancer tissues, but was restricted to the endothelial cells of blood vessels in fusion-negative or normal tissues (Fig. 4L and M). Congruently, using an ET-1-specific antibody, we found that ET-1 expression is higher in fusion-positive primary prostate cancer tissues (Fig. 4L). Moreover, while ET-1 was barely detected in lymph node metastases, a strong expression of ET-1 was detected in fusion-positive bone metastasis tissues (Fig. 4M).

Together, these results reveal a link between ERG and ET-1 expression in fusion-positive human primary prostate cancer and bone metastasis samples.

***TMPRSS2:ERG* expression enhances osteomimicry properties of prostate cancer cells**

The acquisition of a bone cell-like phenotype, namely osteomimicry, has been proposed to help cancer cells survive within the bone microenvironment (2, 5). For instance, it has been shown that prostate cancer cells can overexpress genes responsible for osteoblast differentiation and bone matrix mineralization (4). Specifically, PC3c cells express bone-associated markers such as *OPN* (*osteopontin*), *BSP* (*bone sialoprotein*), *RUNX2* (*runt-related transcription factor 2*) and *COL1A1* (*type 1 collagen*), which allow them to form a calcified matrix under osteogenic conditions (24). As ectopic expression of the *TMPRSS2:ERG* fusion gene in PC3c cells enhanced osteoblastic lesion formation, we contemplated whether this aberrant ERG expression could have an impact on the osteomimicry properties of PC3c cells. Indeed, after 3 weeks of culture in osteogenic conditions, including ascorbic acid and β -glycerophosphate, PC3c-T1E4 cells showed some mineralization (black zones) and a higher ALPL (*alkaline phosphatase*) activity than control PC3c-CT cells (in pink) (Fig. 5A). Although the expression levels of *BSP* and *OCN* (*osteocalcin*) were comparable between PC3c-T1E4 and PC3c-CT cells (Fig. 5B), in PC3c-T1E4 cells there was a higher expression of the early osteoblast differentiation marker *ALPL* (*alkaline phosphatase*), as well as of

COL1A1 and *OPN*, two genes associated with crucial organic bone matrix components (Fig. 5B). Importantly, *OPN* has previously been shown to be a target gene of ERG in prostate cancer (34), and has a documented role in osteoblastic lesion formation induced by cancer cells (35). In addition, we found that the expression of *OPG* (*osteoprotegerin*), which is known to inhibit osteoclastogenesis by interacting with RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), was also higher in PC3c-T1E4 cells (Fig. 5B). Moreover, this osteomimicry enhancement was also observed, albeit to a lesser extent, in PC3-T1E4 cells cultured under osteogenic conditions (Fig. 5C and D). Interestingly *RANKL* expression was also down-regulated in PC3-T1E4 cells.

These data suggest that the expression of the *TMPRSS2:ERG* fusion in prostate cancer cells enhances their osteomimicry properties, thereby explaining, at least in part, their capacity to increase the osteoblastic response *in vivo*.

ERG directly controls the expression of *ALPL* and *COL1A1* in prostate cancer cells

Our results demonstrate that aberrant expression of ERG in prostate cancer cells can enhance their osteomimicry properties through increasing osteogenic marker expression. We therefore asked whether these osteogenic markers are directly regulated by ERG in prostate cancer cells. By analyzing published ERG ChIP-seq data performed in the VCaP cell line (21, 32, 33), we found that ERG binds to active regulatory regions of the *ALPL* and *COL1A1* genes (Fig. 6A and B). Importantly, knockdown of *TMPRSS2:ERG* fusion expression in VCaP cells significantly decreased the expression of *ALPL* and *COL1A1* by 27% and 58%, respectively (Fig. 6C and E). In contrast, when the same cells were treated with DHT to increase *TMPRSS2:ERG* fusion expression, there was a significant increase in the expression levels of *ALPL* (four-fold) and *COL1A1* (seven-fold) (Fig. 6D and F).

Furthermore, we also found that ectopic expression of the fusion in PC3c cells resulted in an increased expression of both *ALPL* and *COL1A1* (three-fold and two-fold, respectively) even though cell cultures were performed without osteogenic conditions (Fig. 6G and I). This *ALPL* and *COL1A1* upregulation was specific to ectopic expression of ERG because silencing the *TMPRSS2:ERG* fusion in PC3c-T1E4 cells led to a reduced expression of both osteogenic markers (Fig. 6H and J). Likewise, in PC3c-T1E4 cells, we also found that ERG significantly binds to the same regulatory regions of *ALPL* and *COL1A1* that were identified in VCaP cells (Fig. 6K and L).

These results demonstrate that ERG directly controls the expression of the *ALPL* and *COL1A1* osteogenic markers in prostate cancer cells.

The expression of ERG correlates with osteogenic marker expression in human prostate cancer samples

So far, we found that aberrant expression of ERG enhances osteogenic marker expression, namely ET-1, ALPL and COL1A1, in prostate cancer cells, and accordingly, that ERG-expressing prostate cancer cells induce osteoblastic lesion formation *in vivo*. To further confirm the clinical relevance of this regulatory network, we analyzed a gene expression dataset based on 81 human prostate cancer metastasis samples using the cBioPortal platform (36-38). In this cohort, we found that the expression levels of the novel targets *ET-1*, *ALPL* and *COL1A1*, are indeed significantly correlated with the expression of *ERG* (Fig. 7). In addition, a correlated expression also exists between *ERG* and the other bone remodeling-associated marker, *OPN*, and to a lesser extent, with *BSP* (Fig.7). On the other hand, no correlations were observed with *OCN*, *OPG* or *RANKL*. Such clinical relevance further highlights the importance of the ERG transcription factor in the control of a bone turnover-associated gene network *in vivo*.

DISCUSSION

Prostate cancer cells most commonly metastasize to the bone, inducing osteoblastic or mixed osteoblastic/osteolytic lesions (1, 6). We have recently shown that *TMPRSS2:ERG* - the most common gene fusion found in prostate cancer cells - is involved in bone tropism of prostate cancer (23). In the present study, we aimed to address whether the *TMPRSS2:ERG* fusion is involved in bone metastasis formation. Using a murine intra-tibial prostate cancer engraftment model, we focused on the critical interplay between prostate cancer cells and the bone microenvironment. We found that ectopic expression of the *TMPRSS2:ERG* fusion in PC3c or PC3 cells, which are known to induce mixed osteoblastic/osteolytic or solely pure osteolytic lesions respectively (24), results in an increase in bone formation events and a decrease in bone resorption. Since bone homeostasis is tightly controlled by the balance between osteoclast and osteoblast activities (2, 7, 39), our results suggest that prostate cancer cells harboring the *TMPRSS2:ERG* fusion are able to interrupt this balance in favor of osteoblastic activity.

Indeed, we found that in prostate cancer cells the ERG transcription factor is capable of directly controlling the expression of major bone markers, such as *COL1A1* and *ALPL* (40, 41). By enhancing the expression of *COL1A1* and *ALPL* in tumor cells, ERG promotes the osteomimicry properties of the tumor cells, likely facilitating their survival and growth in the bone microenvironment. Importantly, *COL1A1* and *ALPL* directly participate in the bone formation process (2, 7): *COL1A1*, which is mainly secreted by osteoblasts, makes up approximately 90% of the bone matrix, and *ALPL*, a pivotal early marker of osteoblast activity, has been shown as essential for matrix mineralization (42, 43). Moreover, using human prostate cancer samples, we found that there is a positive correlation between the expression of ERG and the expression of both *COL1A1* and *ALPL*. Noteworthy, among the bone-related parameters detected in patient blood, the level of *ALPL* has been identified as an

important predictor of bone metastasis (44, 45). Recently, it has been shown that ALPL may be a major contributor to the progression of prostate cancer, and that ALPL reduction increases cell death and epithelial plasticity in prostate cancer cells (46). In addition to the *COL1A1* and *ALPL* genes, we have previously shown that ERG also controls the expression of *OPN* (34), another gene involved in the bone remodeling and mineralization processes. Thus, one of the principal consequences of the aberrant expression of TMPRSS2:ERG in prostate cancer cells is a conferred bone-like phenotype. This not only enhances bone formation, but is also the underlying cause that provides prostate cancer cells with a survival advantage in the bone microenvironment.

Here, we also found the *ET-1* gene to be a direct target of ERG in prostate cancer cells. Importantly, *ET-1* expression was also significantly associated with ERG expression in human prostate cancer samples, both in terms of RNA and protein levels. The *ET-1* gene encodes a secreted peptide that is known to promote osteoblastic bone lesions during metastatic growth of prostate tumors in mouse models (40). Moreover, higher concentrations of ET-1 have been found in the plasma of metastatic prostate cancer patients (47). In fact, ET-1 is known to exert paracrine and autocrine effects by binding to the ET-1 receptors, ETAR and ETBR (41). Activation of ETAR by ET-1 can promote prostate cancer growth through pathways involved in angiogenesis, osteogenesis, cell migration and invasion (48). This suggests that the ET-1 axis could be an attractive therapeutic target for inhibiting cancer growth and metastasis. Clinical trials have shown that ETAR antagonists such as atrasentan (ABT-627, Abbott Laboratories, Abbott Park, CA, USA) and zibotentan (ZD4054, Astra-Zeneca), result in a delay in skeletal metastasis progression, a decrease in cancer-related bone pain, and an increase in the overall survival of patients with CRPC and bone metastases (49, 50). However, despite promising Phase II trials in patients with advanced metastatic prostate cancer, Phase III trials using atrasentan and zibotentan mono-therapy or in combination with

docetaxel chemotherapy, were unsuccessful in patients with established disease (51, 52). Two possible reasons for these clinical findings could be that the dose of chemotherapy received by the patients was too weak or, more importantly, that screening patients for non-metastatic disease status can prove difficult (52). As patients with highly elevated bone turnover markers appear to preferentially benefit from atrasentan therapy (53), *TMPRSS2:ERG*-positive or -negative fusion levels – which we show to be associated with bone marker levels - could help in selecting good responders for ETAR treatment in further Phase III trials.

In conclusion, our study provides both *in vivo* and *in vitro* evidence supporting that aberrant expression of the *TMPRSS2:ERG* fusion in prostate cancer cells enhances their osteomimicry and promotes osteoblastic lesion formation. This provides a novel therapeutic concept for the management of patients with prostate cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank M. Tardivel and E. Werkmeister from the BioImaging Center Lille Nord de France (BICeL) for their technical assistance; M. Canouil for his statistics advice; and M. Vernier for his bioinformatics advice and stimulating discussions. We would also like to thank the local Tumor Tissue Bank (Tumorotheque), Regional Reference Oncology Center (CRRC) (Head, Pr. M.C. Copin) in Lille, France.

GRANT SUPPORT

This work was supported by grants from Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Ligue nationale contre le Cancer (Comité du Pas-de-Calais), and Institut national du cancer (INCa_4419). CD was supported by Institut Pasteur de Lille, Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), TT by Institut Pasteur de Lille, Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais and Association pour la Recherche sur le

Cancer (ARC), MB by Institut national du cancer (INCa), and AF by Ligue nationale contre le Cancer and Fondation pour la Recherche Médicale. The work of TT in the Center of Genomic Regulation was supported by a Juan de la Cierva Postdoctoral Fellowship.

REFERENCES

1. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(8):584-93.
2. Kan C, Vargas G, Pape FL, Clezardin P. Cancer Cell Colonisation in the Bone Microenvironment. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(10).
3. Ibrahim T, Flamini E, Mercatali L, Sacanna E, Serra P, Amadori D. Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer*. 2010;116(6):1406-18.
4. Koeneman KS, Yeung F, Chung LW. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. *The Prostate*. 1999;39(4):246-61.
5. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(6):411-25.
6. Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(1):21-8.
7. Croucher PI, McDonald MM, Martin TJ. Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(6):373-86.
8. Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(10):2609-17.
9. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005;310(5748):644-8. Epub 2005/10/29.
10. Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common gene rearrangements in prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(27):3659-68.
11. Rajput AB, Miller MA, De Luca A, Boyd N, Leung S, Hurtado-Coll A, et al. Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *Journal of clinical pathology*. 2007;60(11):1238-43.
12. Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O, Schmidt F, Setlur SR, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*. 2007;26(31):4596-9.
13. Hagen RM, Adamo P, Karamat S, Oxley J, Aning JJ, Gillatt D, et al. Quantitative analysis of ERG expression and its splice isoforms in formalin-fixed, paraffin-embedded prostate cancer samples: association with seminal vesicle invasion and biochemical recurrence. *American journal of clinical pathology*. 2014;142(4):533-40.
14. Nam RK, Sugar L, Yang W, Srivastava S, Klotz LH, Yang LY, et al. Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. *British journal of cancer*. 2007;97(12):1690-5.
15. Adamo P, Ladomery MR. The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer. *Oncogene*. 2016;35(4):403-14.

16. Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, Zhou Q, Al-Ahmadie HA, Fine SW, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer research*. 2009;69(4):1400-6.
17. Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nature genetics*. 2009;41(5):619-24.
18. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia*. 2008;10(2):177-88.
19. Tian TV, Tomavo N, Huot L, Flourens A, Bonnelye E, Flajollet S, et al. Identification of novel TMPRSS2:ERG mechanisms in prostate cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2. *Oncogene*. 2014;33(17):2204-14.
20. Hollenhorst PC, Ferris MW, Hull MA, Chae H, Kim S, Graves BJ. Oncogenic ETS proteins mimic activated RAS/MAPK signaling in prostate cells. *Genes & development*. 2011;25(20):2147-57.
21. Chng KR, Chang CW, Tan SK, Yang C, Hong SZ, Sng NY, et al. A transcriptional repressor co-regulatory network governing androgen response in prostate cancers. *The EMBO journal*. 2012;31(12):2810-23.
22. Yu J, Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X, et al. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer cell*. 2010;17(5):443-54.
23. Deplus R, Delliaux C, Marchand N, Flourens A, Vanpouille N, Leroy X, et al. TMPRSS2-ERG fusion promotes prostate cancer metastases in bone. *Oncotarget*. 2017;8(7):11827-40.
24. Fradet A, Sorel H, Depalle B, Serre CM, Farlay D, Turtoi A, et al. A new murine model of osteoblastic/osteolytic lesions from human androgen-resistant prostate cancer. *PloS one*. 2013;8(9):e75092.
25. Fradet A, Bouchet M, Delliaux C, Gervais M, Kan C, Benetollo C, et al. Estrogen related receptor alpha in castration-resistant prostate cancer cells promotes tumor progression in bone. *Oncotarget*. 2016;7(47):77071-77086.
26. Haider M, Zhang X, Coleman I, Ericson N, True LD, Lam HM, et al. Epithelial mesenchymal-like transition occurs in a subset of cells in castration resistant prostate cancer bone metastases. *Clinical & experimental metastasis*. 2016;33(3):239-48.
27. Yin JJ, Mohammad KS, Kakonen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, et al. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(19):10954-9.
28. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone*. 1997;21(6):507-14.
29. Alam AS, Gallagher A, Shankar V, Ghatei MA, Datta HK, Huang CL, et al. Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility: implications for the vascular control of bone resorption. *Endocrinology*. 1992;130(6):3617-24.
30. Chiao JW, Moonga BS, Yang YM, Kancherla R, Mittelman A, Wu-Wong JR, et al. Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *British journal of cancer*. 2000;83(3):360-5.
31. Korenchuk S, Lehr JE, L MC, Lee YG, Whitney S, Vessella R, et al. VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. *In Vivo*. 2001;15(2):163-8.
32. Asangani IA, Dommeti VL, Wang X, Malik R, Cieslik M, Yang R, et al. Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2014;510(7504):278-82.

33. Sharma NL, Massie CE, Butter F, Mann M, Bon H, Ramos-Montoya A, et al. The ETS family member GABPalpha modulates androgen receptor signalling and mediates an aggressive phenotype in prostate cancer. *Nucleic acids research*. 2014;42(10):6256-69.
34. Flajollet S, Tian TV, Flourens A, Tomavo N, Villers A, Bonnelye E, et al. Abnormal expression of the ERG transcription factor in prostate cancer cells activates osteopontin. *Molecular cancer research : MCR*. 2011;9(7):914-24.
35. Kruger TE, Miller AH, Godwin AK, Wang J. Bone sialoprotein and osteopontin in bone metastasis of osteotropic cancers. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2014;89(2):330-41.
36. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*. 2013;6(269):p11.
37. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*. 2012;2(5):401-4.
38. Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, Benelli M, Puca L, Cyrta J, et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nature medicine*. 2016;22(3):298-305.
39. Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(20 Pt 2):6213s-6s.
40. Guise TA, Yin JJ, Mohammad KS. Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer*. 2003;97(3 Suppl):779-84.
41. Rosano L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(9):637-51.
42. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nature genetics*. 1995;11(1):45-51.
43. Fedde KN, Blair L, Silverstein J, Coburn SP, Ryan LM, Weinstein RS, et al. Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1999;14(12):2015-26.
44. Pasoglou V, Michoux N, Peeters F, Larbi A, Tombal B, Selleslagh T, et al. Whole-body 3D T1-weighted MR imaging in patients with prostate cancer: feasibility and evaluation in screening for metastatic disease. *Radiology*. 2015;275(1):155-66.
45. Metwalli AR, Rosner IL, Cullen J, Chen Y, Brand T, Brassell SA, et al. Elevated alkaline phosphatase velocity strongly predicts overall survival and the risk of bone metastases in castrate-resistant prostate cancer. *Urologic oncology*. 2014;32(6):761-8.
46. Rao SR, Snaith AE, Marino D, Cheng X, Lwin ST, Orriss IR, et al. Tumour-derived alkaline phosphatase regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer. *British journal of cancer*. 2017;116(2):227-36.
47. Nelson JB, Nguyen SH, Wu-Wong JR, Opgenorth TJ, Dixon DB, Chung LW, et al. New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology*. 1999;53(5):1063-9.
48. Bagnato A, Loizidou M, Pflug BR, Curwen J, Growcott J. Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *British journal of pharmacology*. 2011;163(2):220-33.

49. James ND, Caty A, Payne H, Borre M, Zonnenberg BA, Beuzeboc P, et al. Final safety and efficacy analysis of the specific endothelin A receptor antagonist zibotentan (ZD4054) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain-free or mildly symptomatic for pain: a double-blind, placebo-controlled, randomized Phase II trial. *BJU international*. 2010;106(7):966-73.
50. Qiao L, Liang Y, Li N, Hu X, Luo D, Gu J, et al. Endothelin-A receptor antagonists in prostate cancer treatment-a meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(3):3465-73.
51. Miller K, Moul JW, Gleave M, Fizazi K, Nelson JB, Morris T, et al. Phase III, randomized, placebo-controlled study of once-daily oral zibotentan (ZD4054) in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2013;16(2):187-92.
52. Yu EY, Miller K, Nelson J, Gleave M, Fizazi K, Moul JW, et al. Detection of previously unidentified metastatic disease as a leading cause of screening failure in a phase III trial of zibotentan versus placebo in patients with nonmetastatic, castration resistant prostate cancer. *The Journal of urology*. 2012;188(1):103-9.
53. Lara PN, Jr., Ely B, Quinn DI, Mack PC, Tangen C, Gertz E, et al. Serum biomarkers of bone metabolism in castration-resistant prostate cancer patients with skeletal metastases: results from SWOG 0421. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(4):dju013.

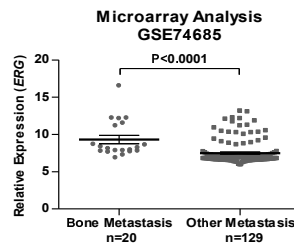


Figure 1.

Prostate cancer bone metastasis samples exhibit higher expression of *ERG*.

Comparison of the *ERG* expression profile between bone (n=20) and other (n=129) CRPC metastases using the GSE74685 dataset. $P < 0.0001$, two-tailed Mann-Whitney test.

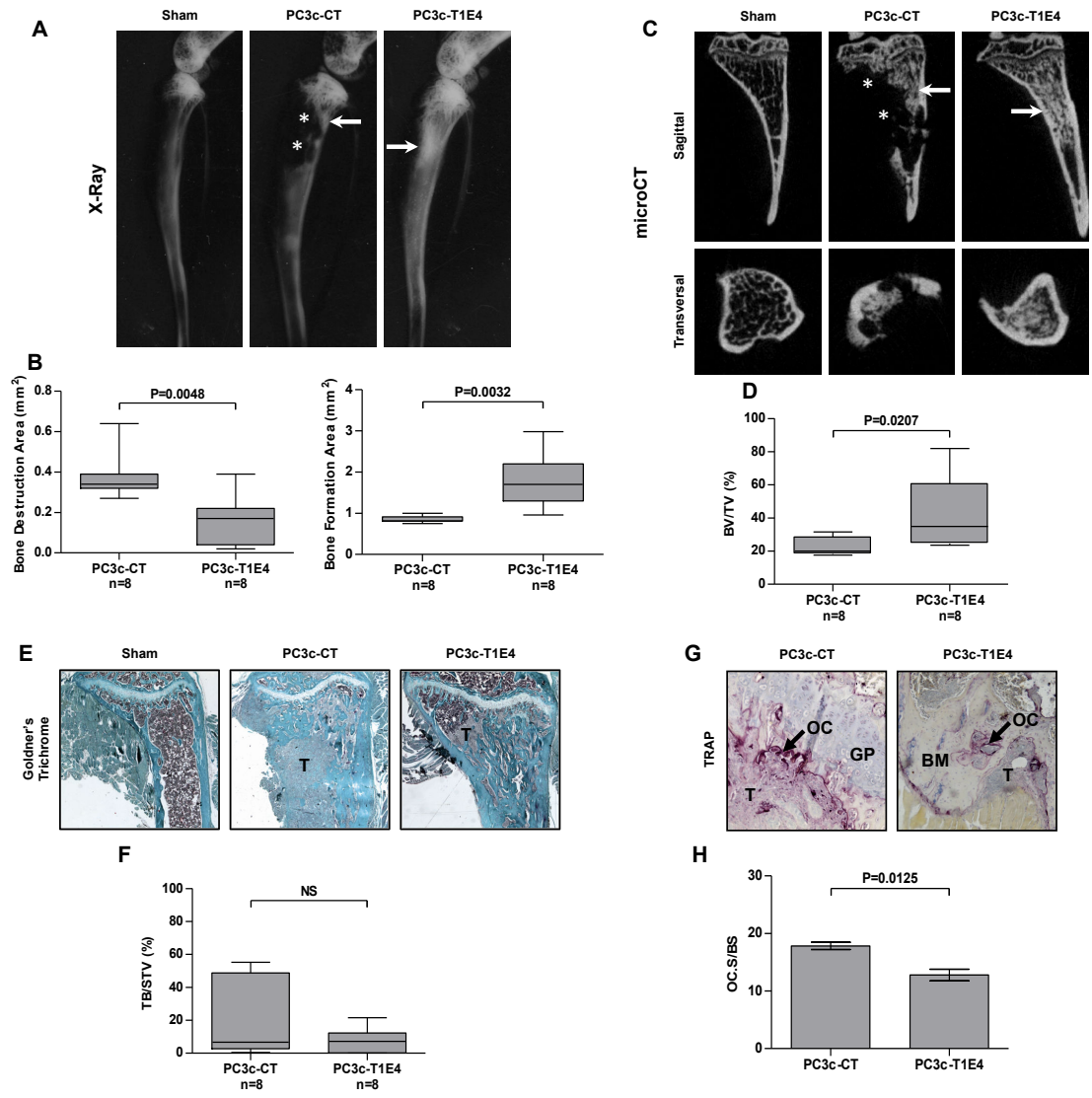


Figure 2.

The expression of TMPRSS2:ERG in PC3c cells enhances their capacity to induce osteoformation and to reduce osteolysis.

A, PC3c cells expressing empty vector (PC3c-CT), T1E4 (PC3c-T1E4) and PBS buffer (Sham) were injected into the tibiae of SCID mice. Ten weeks' post-inoculation, radiography revealed larger osteoblastic lesions (white arrows) in mice injected with PC3c-T1E4 cells compared to those injected with PC3c-CT cells. PC3c-CT-injected mice showed both osteoblastic lesions and osteolytic destructions (white asterisks). Multiple mice of each group were analyzed, and representative radiographies are shown. **B**, Comparison of bone destruction area (left panel; n=8, P=0.0148) and bone formation area (right panel; n=8, P=0.0032). Two-tailed Mann-Whitney t test. **C**, 3D micro-CT reconstructions of tibiae implanted with PC3c-CT or PC3c-T1E4 cells and PBS buffer (Sham). Multiple mice of each group were analyzed, and representative radiographies are shown. **D**, Comparison of bone volume over total tissue volume (BV/TV, %) between tibiae bearing PC3c-CT or PC3c-T1E4 cells (n=8, P=0.0207). Two-tailed Mann-Whitney t test. **E**, Goldner's trichrome staining of bone sections. Multiple mice of each group were analyzed, and representative images are shown. **F**, Comparison of tumor burden over total soft tissue volume (TB/STV, %) between tibiae bearing PC3c-CT or PC3c-T1E4 cells (n=8, P=NS). Two-tailed Mann-Whitney t test. **G**, TRAP staining of tibiae. Six mice of each group were analyzed, and representative images are shown. **H**, Comparison of osteoclast surface over bone surface (OC.S/BS, %) between tibiae bearing PC3c-CT or PC3c-T1E4 cells (n=6, P=0.0125). Two-tailed unpaired t test. T, Tumor; BM, Bone Matrix; OC, Osteoclasts; GP, Growth Plate.

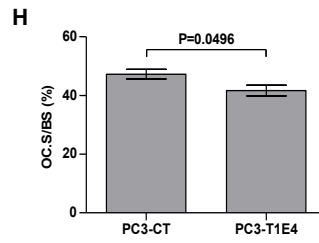
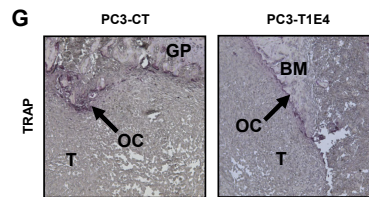
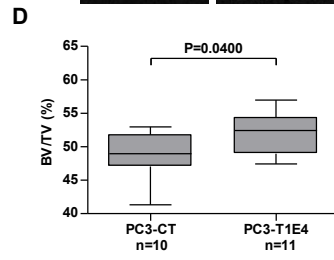
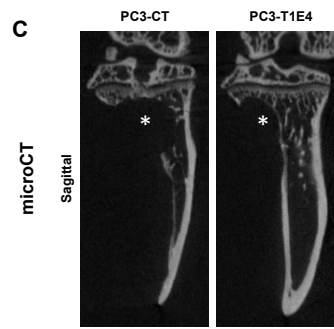
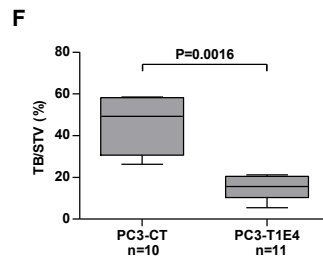
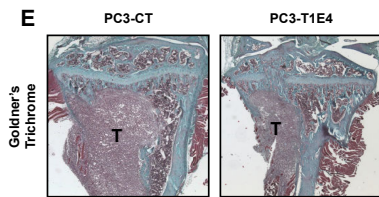
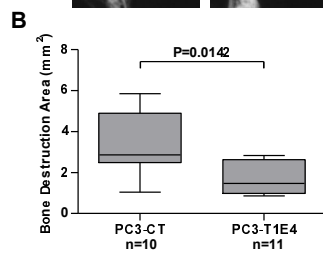
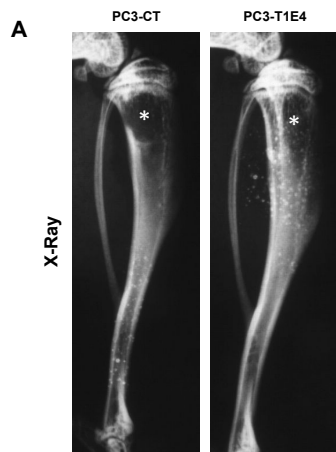


Figure 3.

The expression of TMPRSS2:ERG in PC3 cells enhances their capacity to reduce osteolysis.

A, PC3 cells expressing empty vector (PC3-CT) and T1E4 (PC3-T1E4) were injected into the tibiae of SCID mice. Four weeks' post-inoculation, radiography revealed smaller osteolytic lesions (white asterisks) in mice injected with PC3-T1E4 cells compared to those injected with PC3-CT cells. Multiple mice of each group were analyzed, and representative radiographies are shown. **B**, Comparison of bone destruction area (PC3-CT: n=10, PC3-T1E4: n=11, P=0.0142). Two-tailed Mann-Whitney t test. **C**, 3D micro-CT reconstructions of tibiae implanted respectively with PC3-CT and PC3-T1E4 cells. Multiple mice of each group were analyzed, and representative radiographies are shown. **D**, Comparison of bone volume over total tissue volume (BV/TV, %) between tibiae bearing PC3-CT or PC3-T1E4 cells (PC3-CT: n=10, PC3-T1E4: n=11, P=0.0400). Two-tailed Mann-Whitney t test. **E**, Goldner's trichrome staining of bone sections from tibiae injected with PC3-CT or PC3-T1E4. Multiple mice of each group were analyzed, and representative radiographies are shown. **F**, Comparison of tumor burden over total soft tissue volume (TB/STV, %) between tibiae bearing PC3-CT or PC3-T1E4 cells (PC3-CT: n=10, PC3-T1E4: n=11, P=0.0016). Two-tailed Mann-Whitney t test. **G**, TRAP staining of tibiae bearing PC3-CT or PC3-T1E4 cells. Five mice of each group were analyzed, and representative images are shown. **H**, Comparison of osteoclast surface over bone surface (OC.S/BS, %) between tibiae bearing PC3-CT or PC3-T1E4 cells (n=5, P=0.0496). Two-tailed unpaired t test. T, Tumor; BM, Bone Matrix; OC, Osteoclasts; GP, Growth Plate.

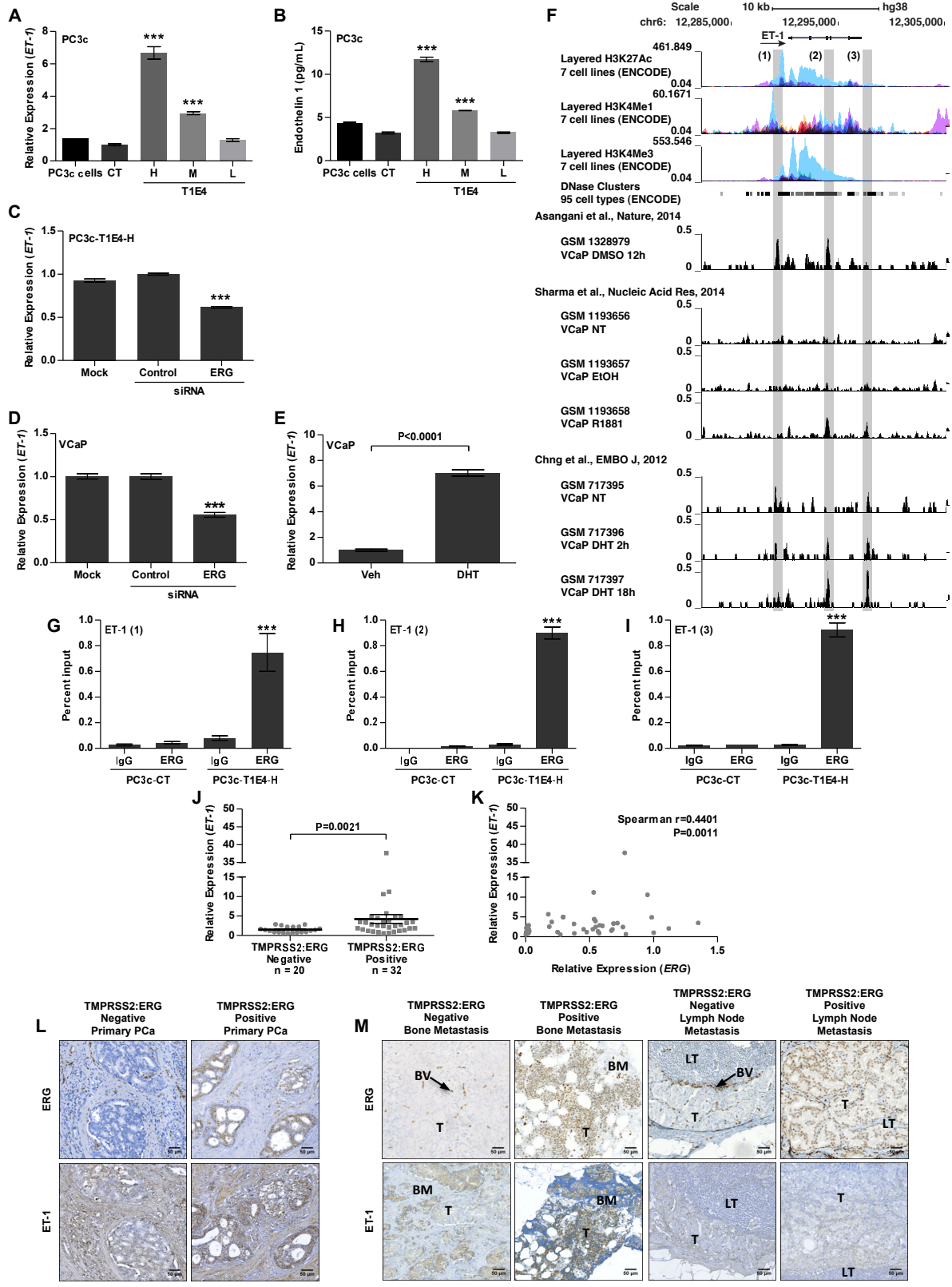


Figure 4.

ERG transcription factor regulates *ET-1* gene expression in prostate cancer.

A, The expression of *ET-1* was analyzed by RT-qPCR in the parental PC3c, control PC3c-CT and PC3c-T1E4 cells expressing distinct levels of T1E4 fusion (H: high; M: medium; L: low). One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test (n=3, ***P<0.001). **B**, The expression of the ET-1 protein was evaluated based on an ELISA of the conditioned media collected from the parental PC3c cells, control PC3c-CT cells and PC3c-T1E4 cells expressing distinct level of T1E4 fusion (H: high; M: medium; L: low). One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test (n=3, ***P<0.001). **C**, The expression of *ET-1* was analyzed by RT-qPCR in PC3c-T1E4-H cells treated with either control or ERG siRNA. The expression level of *ET-1* found in cells treated with control siRNA was normalized to 1. One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test (n=3, ***P<0.001). **D-E**, The expression of *ET-1* was analyzed by RT-qPCR in fusion-positive VCaP cells treated with either control or ERG siRNA (**D**) (n=3, ***P<0.001, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test), and in fusion-positive VCaP cells treated with either ethanol vehicle (Veh) or dihydrotestosterone (DHT) to enhance ERG expression (**E**) (n=3, P<0.0001, unpaired t test). The expression level of *ET-1* found in cells treated with control siRNA was normalized to 1. **F**, Analysis of ChIP-seq datasets for the binding of ERG at the *ET-1* locus in VCaP cells. The ChIP-seqs of H3K27Ac, H3K4Me1 and H3K4Me3 marks, as well as of DNase-1 hypersensitivity peak clusters are from the human ENCODE project. ERG binding sites are highlighted by grey bars and are numbered as (1), (2) and (3). Tracks are shown for H3K27Ac and H3K4Me1 marks (often found near regulatory elements), H3K4Me3 marks (often found near promoters), DNase-1 hypersensitivity peak clusters, and for ERG ChIP derived from untreated, R1881-treated, or DHT-treated VCaP cells as indicated. **G-I**, The binding of ERG at

the *ET-1* locus was analyzed using ChIP-qPCR in PC3c-T1E4-H and control PC3c-CT cells. All three ERG binding sites ((1), (2) and (3)) identified in VCaP cells by ChIP-seq (shown in figure 4D) were analyzed (**G**), (**H**) and (**I**). Non-specific rabbit-IgG was used as a negative control. One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test (n=3, ***P<0.001). **J**, The expression of *ET-1* was evaluated using RT-qPCR in TMPRSS2:ERG-negative (n=20) and -positive (n=32) human prostate cancer samples (P=0.0021). Two-tailed Mann-Whitney t test. **K**, Scatter plot showing relative expression of *ET-1* and those of *ERG* in primary prostate cancer samples (n=52, r=0.4401, P=0.0011). Two-tailed non-parametric Spearman correlation test with alpha=0.05. **L-M**, Immunohistochemistry staining using ERG or ET-1 specific antibodies in *TMPRSS2:ERG*-negative and -positive primary prostate cancer samples (**L**), bone metastasis and lymph node metastasis samples (**M**). Representative images were shown. T: Tumor cells; BV: Blood vessel; BM: Bone matrix; LT: Lymphoid tissue.

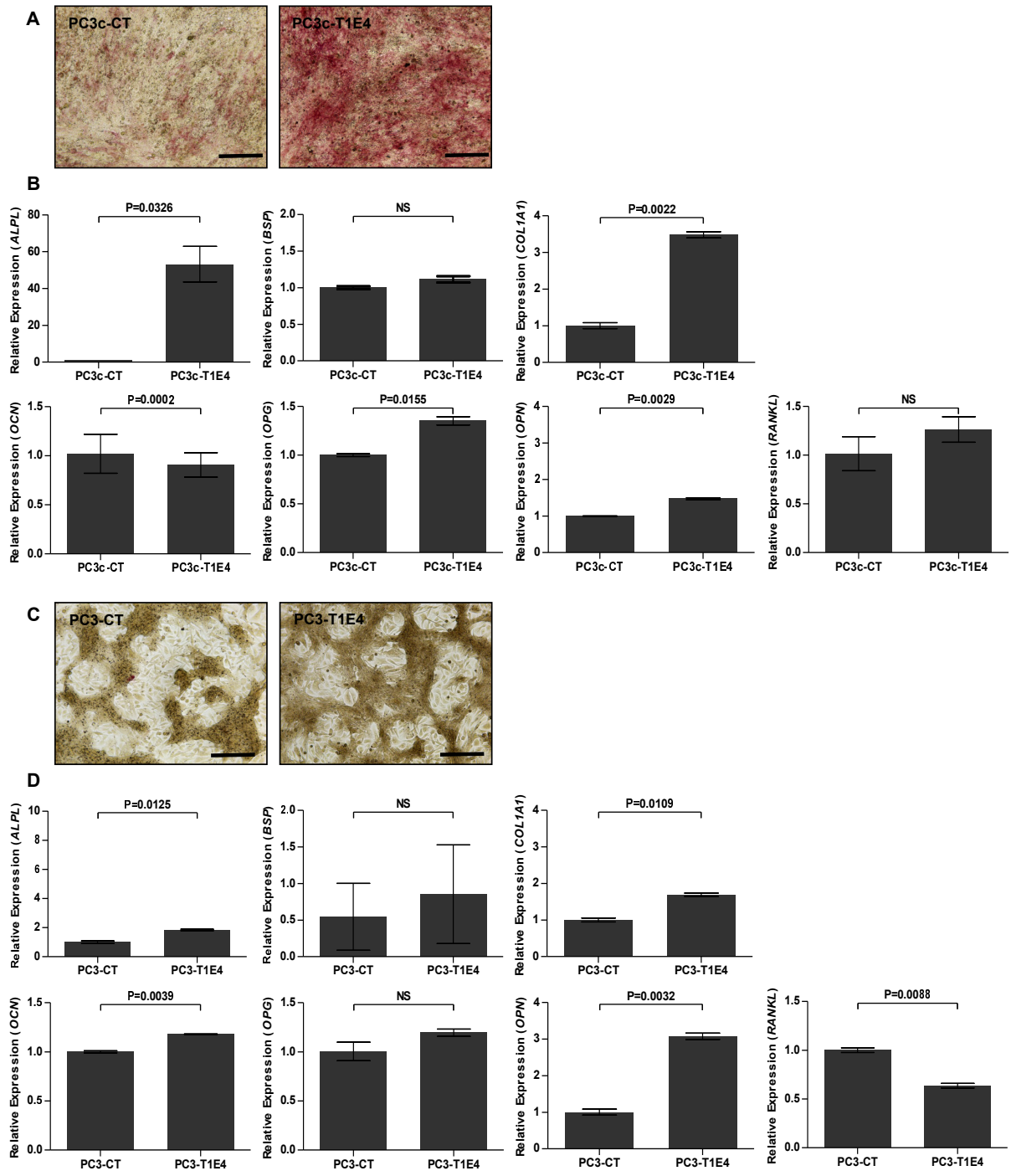


Figure 5.

The expression of the TMPRSS2:ERG fusion enhances osteomimicry properties of prostate cancer cells.

A and **C**, Von Kossa staining was performed on control PC3c-CT and PC3c-T1E4 cells (**A**) or on control PC3-CT and PC3-T1E4 cells (**C**), both of which were cultured in osteogenic conditions for 21 days. Von Kossa staining shows mineralization (black zones) and ALPL activity (in pink) (e.g., PC3c-T1E4 cells). **B** and **D**, Comparison of the expression of osteogenic markers evaluated by RT-qPCR between control PC3c-CT and PC3c-T1E4 (**B**), or control PC3-CT and PC3-T1E4 (**D**) cells both cultured in osteogenic conditions for 21 days (P values are indicated on each graph, two-tailed unpaired t test). Bar= 200 μ M.

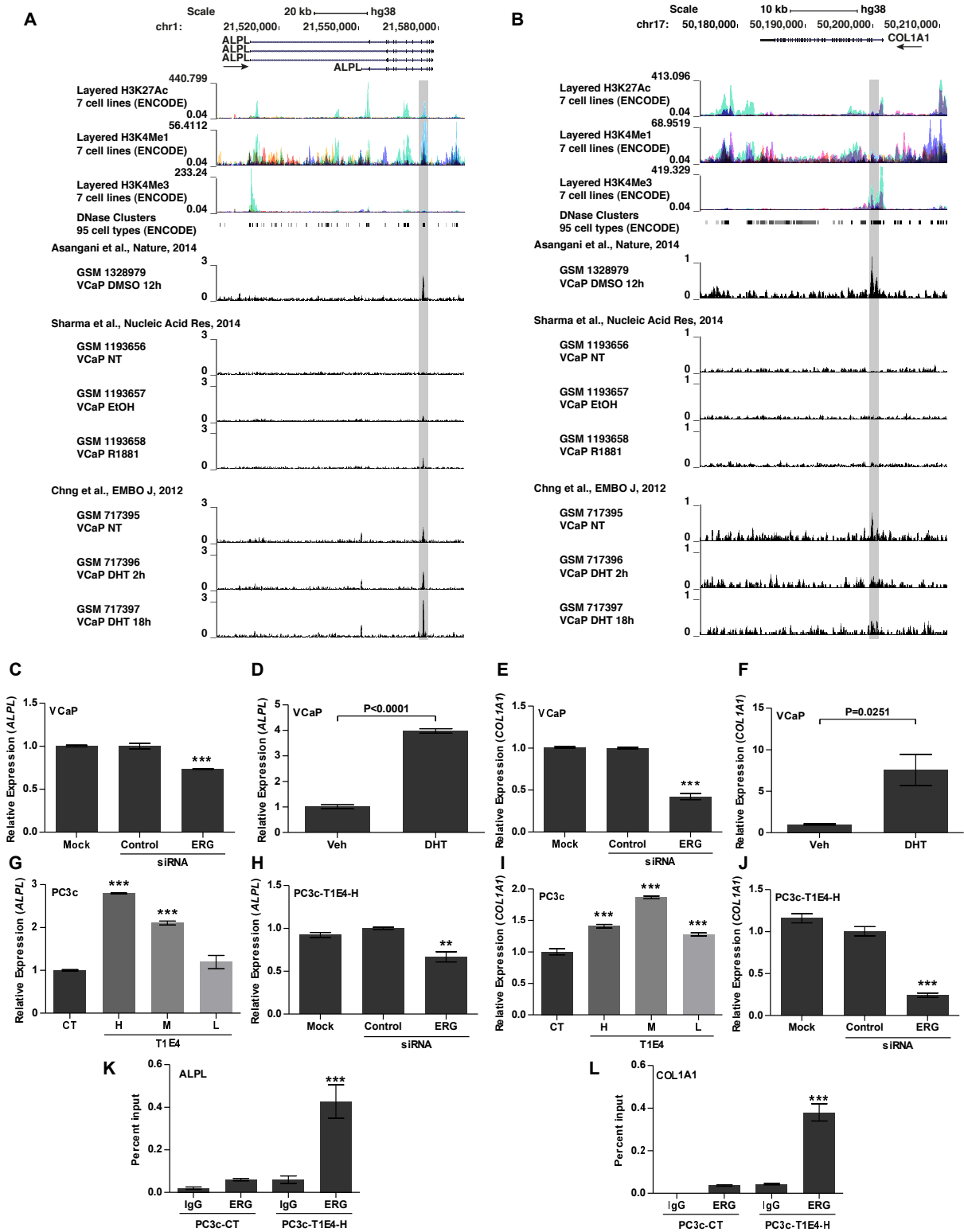


Figure 6.

ERG directly controls the expression of *ALPL* and *COL1A1* in prostate cancer cells.

A-B, Analysis of ChIP-seq datasets for the binding of ERG to the *ALPL* (**A**) and *COL1A1* (**B**) loci in VCaP cells using UCSC Browser. The ChIP-seqs of H3K27Ac, H3K4Me1, and H3K4Me3 marks, as well as of DNase-1 hypersensitivity peak clusters are from the human ENCODE project. ERG binding sites are highlighted by grey bars. Tracks are shown for H3K27Ac and H3K4Me1 marks (often found near regulatory elements), H3K4Me3 marks (often found near promoters), DNase-1 hypersensitivity peak clusters, and for ERG ChIP derived from untreated, R1881-treated, or DHT-treated VCaP cells as indicated. **C-J**, The expression of *ALPL* and *COL1A1* were analyzed using RT-qPCR in fusion-positive VCaP cells treated with either control or ERG siRNA (**C** and **E**; n=3, ***P<0.001, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test), in fusion-positive VCaP cells treated with either ethanol vehicle (Veh) or dihydrotestosterone (DHT) to enhance ERG expression (**D** and **F**; n=3, P<0.0001 and P=0.0251, unpaired t test), in the control PC3c-CT cells and PC3c-T1E4 cells expressing distinct levels (H: high; M: medium; L: low) of T1E4 fusion (**G** and **I**; n=3, ***P<0.001, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test), and in PC3c-T1E4-H cells treated with either control or ERG siRNA (**H** and **J**; n=3, **P<0.01 and ***P<0.001, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test). The expression levels of *ALPL* and *COL1A1* found in cells treated with control siRNA were normalized to 1. **K-L**, ERG binding to the *ALPL* (**K**) and *COL1A1* (**L**) loci was analyzed using ChIP-qPCR in PC3c-T1E4-H and control PC3c-CT cells. The ERG binding sites identified in VCaP cells by ChIP-seq (as shown in the figure 6A and 6B) were analyzed. Non-specific rabbit-IgG antibody was used as a negative control. (n=3, ***P<0.001, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test).

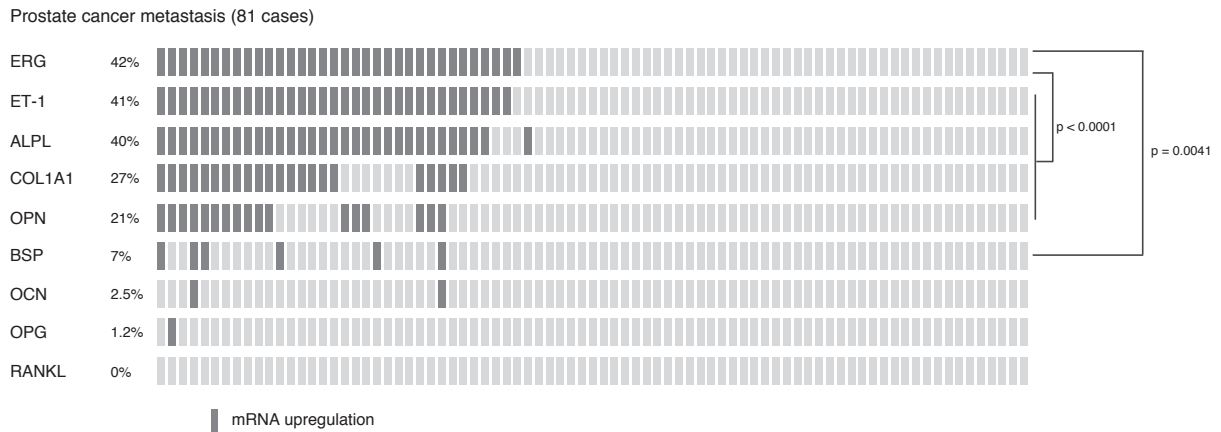
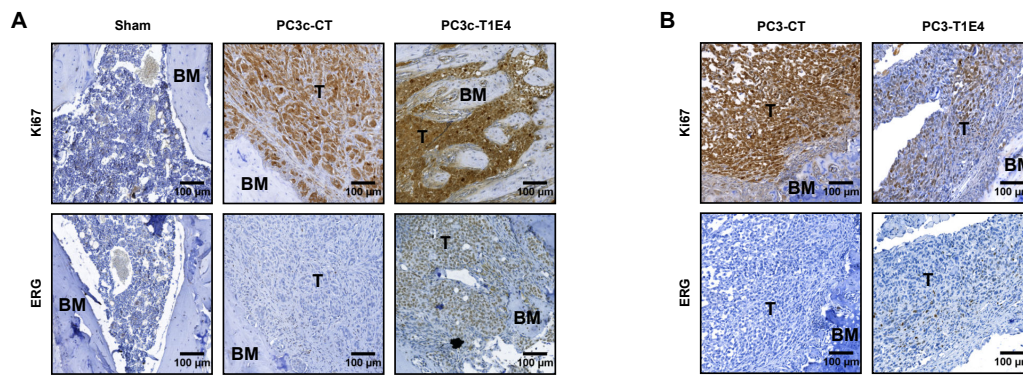


Figure 7.

The expression of *ERG* positively correlates with osteogenic marker expression in human prostate cancer samples.

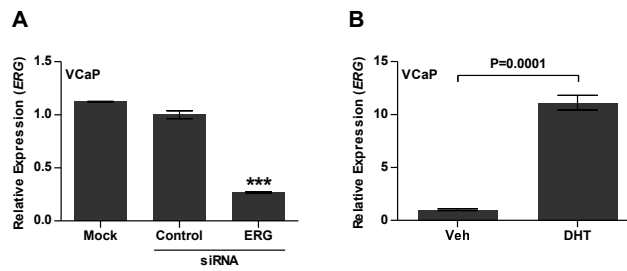
cBioPortal platform analysis of a dataset of human prostate cancer metastasis samples (n=81) from (38). The upregulation of *ERG* correlates with the osteogenic markers *ET-1* ($P < 0.0001$), *ALPL* ($P < 0.0001$), *COL1A1* ($P < 0.0001$), *OPN* ($P < 0.0001$) and *BSP* ($P = 0.0041$) (Fisher's exact test). Each vertical lane represents one patient, and those shaded in dark-grey highlight the presence of mRNA upregulation.



Supplementary Figure S1.

Tumor cell detection in bone lesions.

A-B, Immunohistochemistry detection of Ki67 and ERG in tumors induced by PC3c-CT and PC3c-T1E4 cells (**A**) and PC3c-CT and PC3-T1E4 cells (**B**). BM, Bone Matrix; T, Tumor.



Supplementary Figure S2.

ERG gene expression in VCaP prostate cancer cell line.

A-B, ERG gene expression was analyzed in VCaP cells treated with control or ERG siRNA (**A**) and in VCaP cells treated with EtOH vehicle or DHT (P=0.0001, two-tailed Mann Whitney t test) (**B**) using RT-qPCR. The expression level in cells treated with control siRNA or vehicle was normalized to 1. ***P<0.001, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test.

Supplementary Table S1: Human Oligonucleotide Primers

Primer	Direction	Sequence	Reference
<i>ALPL</i> (qPCR)	Forward	5'-AACACCAATGCCCAGGTCCC-3'	(1)
	Reverse	5'-CACAGATTTCCAGCGTCC-3'	
<i>BSP</i> (qPCR)	Forward	5'-CAGCTTCCCAAGAAGGCTGG-3'	This study
	Reverse	5'-CTCCTCCGCTGCTGCCGTTG-3'	
<i>COL1A1</i> (qPCR)	Forward	5'-TCGTGGAAATGATGGTGCTA-3'	(1)
	Reverse	5'-ACCAGGTTACCGCTGTTAC-3'	
<i>OCN</i> (qPCR)	Forward	5'-CCACCGAGACACCATGAGAGCCC-3'	(1)
	Reverse	5'-GGGGACTGGGGCTCCCAGC-3'	
<i>OPG</i> (qPCR)	Forward	5'-CACGACAACATATGTTCCGG-3'	(1)
	Reverse	5'-TGTCCAATGTGCCGCTGCACGC-3'	
<i>OPN</i> (qPCR)	Forward	5'-CGCCGACCAAGGAAACTCA-3'	(1)
	Reverse	5'-AACGGGGATGGCCTGTATG-3'	
<i>RANKL</i> (qPCR)	Forward	5'-CACTATTAATGCCACCGAC-3'	(2)
	Reverse	5'-GGGTATGAGAACTTGGGATT-3'	
<i>ERG</i> (qPCR)	Forward	5'-AACGAGCGCAGAGTTATCGT-3'	(3)
	Reverse	5'-GTGAGCCTCTGGAAGTCGTC-3'	
<i>ET-1</i> (qPCR)	Forward	5'-GCCAAGGAGCTCCAGAAACAGCAG-3'	This study
	Reverse	5'-AGCAGGAGCAGCGCTTGGAC-3'	
<i>18S</i> (qPCR)	Forward	5'-CAGCTTCCGGGAAACCAAAGTC-3'	(4)
	Reverse	5'-AATTAAGCCGCAGGCTCCACTC-3'	
<i>L32</i> (qPCR)	Forward	5'-CAAGGAGCTGGAAGTGCTGC-3'	(1)
	Reverse	5'-CAGCTCTTCCACGATGGC-3'	
p <i>ET-1</i> (1) (ChIP)	Forward	5'-CCTGTACAGTAACTGCCCTGTG-3'	This study
	Reverse	5'-CGAACAAGGAATCAGATAATACTTCA-3'	
p <i>ET-1</i> (2) (ChIP)	Forward	5'-ACAAAGGCAACAGACCGTGA-3'	This study
	Reverse	5'-TAGGAAGGAGTTCAGGAGGCT-3'	
p <i>ET-1</i> (3) (ChIP)	Forward	5'-CTAGGTCCTCTGCCACAAAGC-3'	This study
	Reverse	5'-GCAAGGAAGATTCTCGAGGG-3'	
p <i>ALPL</i> (ChIP)	Forward	5'-AGGCGGGAACAATAGGAAGT-3'	This study
	Reverse	5'-TACCGATGTTAGCAGGGCAA-3'	
p <i>COL1A1</i> (ChIP)	Forward	5'-AGAGGGGCGTTGTCAGTAGT-3'	This study
	Reverse	5'-GAGGAGCAGGCGAGCTTTTA-3'	
p <i>GAPDH</i> (ChIP)	Forward	5'-GCGTGCCAGTTGAACCA-3'	(5)
	Reverse	5'-CGCCCCTAAAACCGCTAGT-3'	

1. Fradet A, Sorel H, Depalle B, Serre CM, Farlay D, Turtoi A, et al. A new murine model of osteoblastic/osteolytic lesions from human androgen-resistant prostate cancer. *PloS one*. 2013;8(9):e75092.
2. Kwan Tat S, Amiable N, Pelletier JP, Boileau C, Lajeunesse D, Duval N, et al. Modulation of OPG, RANK and RANKL by human chondrocytes and their implication during osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(12):1482-90.
3. Tian TV, Tomavo N, Huot L, Flourens A, Bonnelye E, Flajollet S, et al. Identification of novel TMPRSS2:ERG mechanisms in prostate cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2. *Oncogene*. 2014;33(17):2204-14.
4. Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, et al. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer research*. 2010;70(3):1225-35.
5. Boulay G, Dubuissez M, Van Rechem C, Forget A, Helin K, Ayrault O, et al. Hypermethylated in cancer 1 (HIC1) recruits polycomb repressive complex 2 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human polycomb-like (hPCL) proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(13):10509-24.

10.2 Publication N°2

**Estrogen related receptor alpha in castration-resistant prostate cancer cells
promotes tumor progression in bone.**

FRADET A.*, BOUCHET M.*, **DELLIAUX C.**, GERVAIS M., KAN C., BENETOLLO C.,
PANTANO F., VARGAS G., BOUAZZA L., CROSET M., BALA Y., LEROY X.,
ROSOL J.T., RIEUSSET J., BELLAHCÈNE A., CASTRONOVO V., AUBIN E.J.,
CLÉZARDIN P., DUTERQUE-COQUILLAUD M., BONNELYE E.

*Co-first authors

Accepted for publication in *Oncotarget* on 20th October 2016.

Estrogen related receptor alpha in castration-resistant prostate cancer cells promotes tumor progression in bone

Anais Fradet^{1,2*}, Mathilde Bouchet^{1,2*}, Carine Delliaux^{3,4}, Manon Gervais^{1,2}, Casina Kan^{1,2}, Claire Benetollo^{2,5}, Francesco Pantano⁶, Geoffrey Vargas^{1,2}, Lamia Bouazza^{1,2}, Martine Croset^{1,2}, Yohann Bala^{1,2}, xavier Leroy⁷, Thomas J Rosol⁸, Jennifer Rieusset⁹, Akeila Bellahcène¹⁰, Vincent Castronovo¹⁰, Jane E Aubin¹¹, Philippe Clézardin^{1,2}, Martine Duterque-Coquillaud^{3,4}, Edith Bonnelye^{1,2}

¹InsermUMR1033, F-69372 Lyon, France

²Université-Lyon1, F-69008 Lyon, France

³CNRS-UMR8161, F-59021 Lille, France

⁴Université-Lille, F-59000 Lille, France

⁵InsermU1028-CNRS-UMR5292, Lyon, France

⁶University-Campus-Bio-Medico, 00128 Rome, Italy

⁷Centre Hospitalier Lille, F-59037 Lille, France

⁸College of Veterinary Medicine, Columbus-OH 43210, USA

⁹InsermUMR-U1060, F-69921 Oullins, France

¹⁰University Liege, B-4000 Liege, Belgium

¹¹Department of Molecular Genetics, University-Toronto, Toronto ON M5S 1A8

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Edith Bonnelye, **email:** edith.bonnelye@inserm.fr

Keywords: *ERRα*, bone, prostate cancer, microenvironment

Received: July 04, 2016

Accepted: October 13, 2016

Published: October 20, 2016

ABSTRACT

Bone metastases are one of the main complications of prostate cancer and they are incurable. We investigated whether and how estrogen receptor-related receptor alpha (*ERRα*) is involved in bone tumor progression associated with advanced prostate cancer. By meta-analysis, we first found that *ERRα* expression is correlated with castration-resistant prostate cancer (CRPC), the hallmark of progressive disease. We then analyzed tumor cell progression and the associated signaling pathways in gain-of-function/loss-of-function CRPC models *in vivo* and *in vitro*. Increased levels of *ERRα* in tumor cells led to rapid tumor progression, with both bone destruction and formation, and direct impacts on osteoclasts and osteoblasts. *VEGF-A*, *WNT5A* and *TGFβ1* were upregulated by *ERRα* in tumor cells and all of these factors also significantly and positively correlated with *ERRα* expression in CRPC patient specimens. Finally, high levels of *ERRα* in tumor cells stimulated the pro-metastatic factor *periostin* expression in the stroma, suggesting that *ERRα* regulates the tumor stromal cell microenvironment to enhance tumor progression. Taken together, our data demonstrate that *ERRα* is a regulator of CRPC cell progression in bone. Therefore, inhibiting *ERRα* may constitute a new therapeutic strategy for prostate cancer skeletal-related events.

INTRODUCTION

Bone metastases are a frequent complication of cancer occurring in up to 80% of patients with advanced prostate cancer (PCA) and castration-resistance (CRPC

“castration-resistant prostate cancer”) with associated poor five-year survival rate [1, 2]. They are not curable and result in impaired mobility and pathological fractures [3]. To grow in bone, tumor cells alter bone formation and resorption by secreting proteins that

directly affect osteoblasts (bone-forming cells) and osteoclasts (bone-resorbing cells) resulting in the development of mixed lesions [1, 4]. These signaling proteins may include RANKL (receptor activator of the NF- κ B ligand) which stimulates osteoclast differentiation [1, 5] and osteoprotegerin (OPG) which acts as a decoy receptor for RANKL receptor and inhibits osteoclastogenesis [5]. Therefore, the balance between RANKL and OPG is critical in controlling osteoclast activity and osteolysis in bone metastases. PCa cells also express factors such as TGF β (transforming growth factor beta), WNT family members such as Wnt5a and the pro-angiogenic factor VEGFA that promote an aggressive tumor phenotype and bone metastases by directly affecting osteoclast and osteoblast formation [6, 7]. The induction of stromal niche signals by tumor cells, for example expression of extracellular matrix proteins such as PERIOSTIN (POSTN) in the tumor microenvironment, also contributes to the expansion of the metastatic niches [8–11].

Nuclear receptors are transcription factors that comprise ligand-dependent molecules, such as estrogen receptors (ERs), and a large number of so-called orphan receptors for which no ligand has yet been determined [12]. Estrogen receptor-related receptor alpha (ERR α) (NR3B1) shares structural similarities with ER α and ER β (NR3A1/NR3A2) [13] but does not bind estrogen [14]. Since very recently, ERR α was considering as the oldest orphan receptor but Wei *et al.* just described the cholesterol as a potential ERR α agonist [15]. Synthetic molecules like the inverse agonist XCT-790 were also designed to block ERR α activity by preventing its interaction with the co-activators peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC1) [16].

ERR α is expressed in a range of cancer cell types and ERR α -positive tumors (breast and prostate) are associated with more invasive disease and higher risk of recurrence [17, 18]. Indeed in prostate cancer, ERR α is significantly higher in cancerous lesions compared to benign foci and high level of ERR α correlates with Gleason score and poor survival [18]. Moreover, in androgen receptor (AR)-positive models, ERR α has been implicated in AR signaling pathways and shown to increase HIF-1 signaling and to promote hypoxic growth adaptation of prostate cancer cells [19, 20]. ERR α is also expressed in bone where it regulates differentiation and activity of osteoblasts and osteoclasts, both of which are implicated into the mixed osteolytic and osteoblastic lesions observed in advanced prostate cancer patients [15] [21]. Based on our previous data in bone metastases from breast cancer [22], and on the fact that bone metastases are the hallmark of progressive disease and CRPC, mainly characterized by AR alterations [23], we investigated whether and how ERR α is involved in bone progression of CRPC (AR-negative) models.

RESULTS

ERR α is more highly expressed in CRPC patients and their associated bone metastases than normal prostate and non-metastasizing PCa

To determine whether ERR α is involved in PCa bone lesions, we first assessed *ERR α* mRNA expression (*ESRRA*) levels during disease progression by performing a meta-analysis of data from the gene expression omnibus (GEO; GSE69129, GSE21034 and GSE32269) (Figure 1A–1C, Supplementary Table S1)[24, 25, 26]. We found that *ERR α* expression was significantly higher in CRPC compared to normal prostate ($P = 0.0172$)(Figure 1A) and ($P = < 0.05$, $n = 22$ (normal) vs $n = 41$ (CRPC)) (Figure 1B). Higher *ERR α* expression was also observed in primary tumors from CRPC patients who had developed bone metastases compared to androgen-sensitive PCa patients ($P < 0.005$, (PCa) vs (CRPC bone Mets))(Figure 1B) and ($P = 0.0178$, (PCa) vs (CRPC who all developed bone metastases)) (Figure 1C). In the dataset GSE21034, we also found that *ERR α* mRNA was significantly higher in primary cancerous prostate lesions from CRPC who developed bone metastatic lesions ($n = 5$) compared to patients with had developed other types of metastases (brain, lung, bladder, colon or lymph nodes) ($n = 41$) ($P < 0.05$; Figure 1B) suggesting that *ERR α* is associated with advanced prostate cancer and bone metastases. Immunohistochemistry also revealed that ERR α protein expression in human PCa cells was maintained in the associated bone metastases (Figure 1D), suggesting that ERR α is an overall poor prognostic factor for bone metastases from CRPC.

ERR α in PCa cells promotes tumor cells progression *in vivo* in bone microenvironment

To address ERR α function in PCa bone progression, we used three CRPC pre-clinical models, two human models (PC3 and PC3c) and one canine model (ACE-1). Specifically, a full-length *ERR α* cDNA was stably transfected into PC3 cells, which are known for their capacity to form osteolytic lesions *in vivo* [27]. Three independent PC3-ERR α clones (overexpressing ERR α) and three PC3-CT clones (harboring empty vector) were generated (Figure 1E, 1F). In parallel, to validate further the human PC3 model, human PC3c and canine ACE-1 PCa cells that both induce mixed bone lesions (with both osteolysis and osteoformation) were stably transfected with full-length *ERR α* cDNA (Figure 1H, 1J) [28] [29]. ACE-1 cells were also transfected with cDNA containing a truncated form of ERR α lacking the co-activator binding domain AF2 (AF2) (Figure 1J) [22]. Western blotting confirmed higher ERR α expression in PC3-ERR α , PC3c-ERR α and ACE-1-ERR α than in their respective control

cells (Figure 1E, 1H, 1J). The presence of a slightly lower molecular weight band in AF2 in ACE-1 cells expressing the ERR α -AF2 deletion mutant corresponded well with its expected smaller size (AF2; Figure 1J) [22]. As expected, expression of mRNA for *VEGF-A*, a known ERR α target gene [30] was higher in all of the ERR α overexpressing clones (ERR α ; PC3, PC3c and ACE-1) but not in the AF2 ACE-1 clone, confirming the increased activity and the dominant negative functions of both wild-type ERR α and the truncated ERR α -AF2 constructs respectively (Figure 1G, 1I, 1K). To assess whether and how levels of ERR α in tumor cells affected progression of bone lesions, PC3, PC3c and ACE-1 clones were inoculated via intra-tibial injections into SCID male mice (Figure 2). Three

weeks (for PC3 (pool of the 3 clones for CT and ERR α respectively) and ACE-1 clones) (Figure 2 (PC3 (A-E), ACE-1 (K-Q)) and six weeks (for PC3c clones) (Figure 2 PC3c (F-J)) after tumor cell injections, radiographs revealed that animals bearing ERR α overexpressing tumors had increased bone lesion surfaces whereas ACE-AF2 tumors had decreased bone lesion surface compared to CT tumors (Figure 2 -PC3 (A-B), (Mann-Whitney, $P = 0.011$) (bone lesion surface mm²)(E), -PC3c (F-G), (Mann-Whitney, $P = 0.0175$)(J) -ACE-1 (K-M) (Mann-Whitney, $P = 0.0079$, $P = 0.0304$) (Q)). The stimulatory effect of ERR α on PCa-induced bone lesion surface was confirmed by three-dimensional micro-computed tomographic reconstruction (%BV/TV) (cortical and

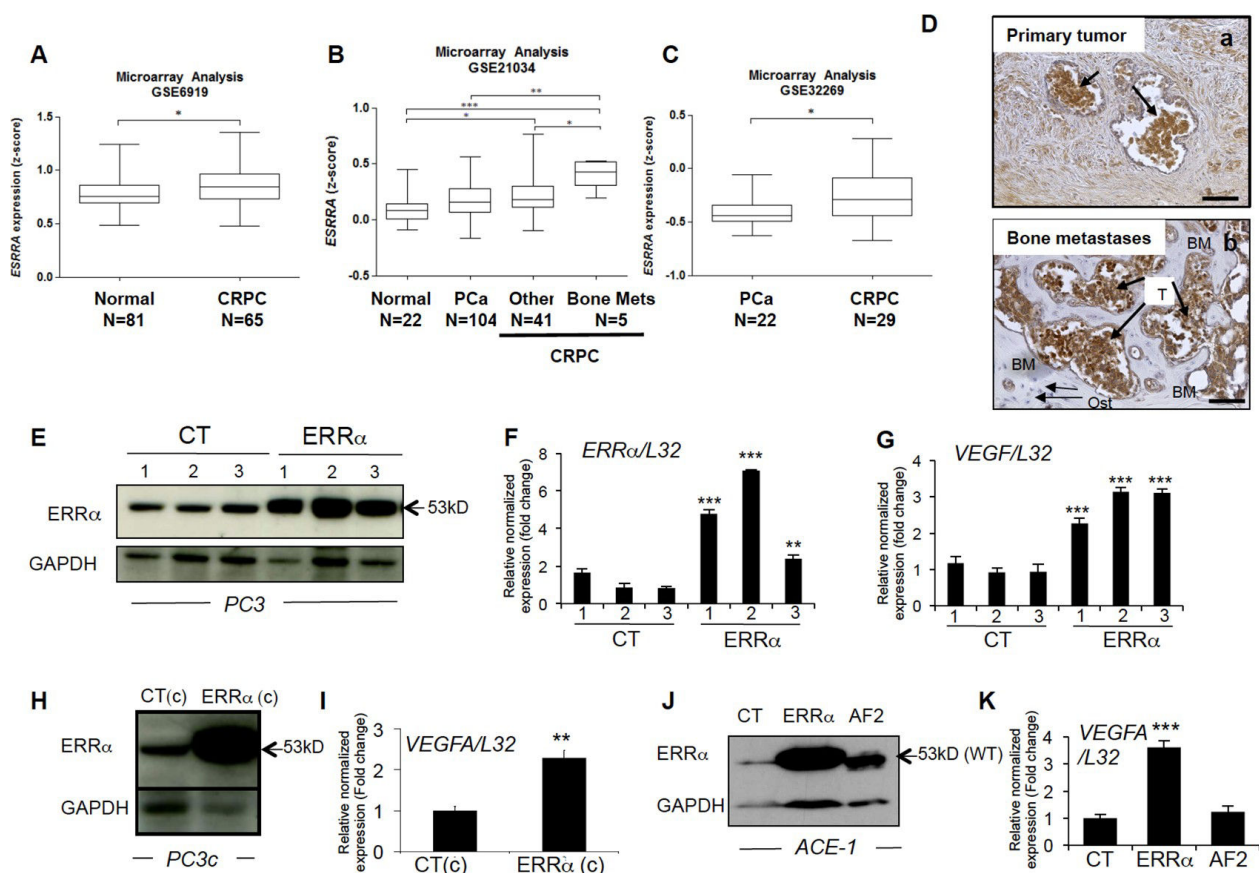


Figure 1: ERR α expression and CRPC from PCa patients. (A) Meta-analysis using public datasets showed that ERR α mRNA expression is higher in CRPC patients in GSE6919 (Student's t -test $P = 0.0172$). (B) ERR α was also found to be higher in CRPC compared to androgen-sensitive PCa, as well as in primary tumors from CRPC patients that developed metastases to bone compared to other sites or normal prostate tissues in GSE21034 (One way ANOVA, bonferri post-hoc test : $P < 0,05$, normal ($n = 22$) versus CRPC ($n = 41$); $P < 0.0005$, normal ($n = 22$) versus CRPC bone mets ($n = 5$); $P < 0.005$, PCa ($n = 104$) versus CRPC bone mets ($n = 5$)) and (C) PCa versus CRPC (that all had developed bone metastases) in GSE32269 (Student's t -test $P = 0.0178$): * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$. (D) Visualization of ERR α protein expression by IHC on sections of prostate primary tumor (a) and the associated bone metastatic lesions (b) from the same patient. (E) Assessment of ERR α expression by Western blotting and (F) real-time RT-PCR on triplicate samples and normalized against the ribosomal protein gene L32 (ANOVA, Student's t -tests $P < 0.0001$) in PC3 control (CT-1-3) and PC3-ERR α (ERR α -1-3) overexpressing ERR α clones. (G) Increased expression of *VEGF-A* mRNA in PC3-ERR α (ANOVA, Student's t -tests $P < 0.0001$). (H) Increase of ERR α protein expression in PC3c-ERR α (ERR α (c)) overexpressing ERR α shown by Western blot and (I) by real-time RT-PCR for *VEGF-A* expression (Student's t -tests $P = 0.001$). (J) Assessment of ERR α expression by Western blotting in an ACE-1 empty-vector CT clone, an ACE-ERR α and a clone overexpressing the dominant negative ERR α with AF2 domain deletion (AF2). (K) *VEGF-A* mRNA expression was also increased in ACE-ERR α cells (Student's t -tests $P = 0.0001$). Bar = 200 μ m, T: Tumor; Ost: osteocytes; BM: Bone Matrix

trabecular bone), with a decrease in bone volume in animals bearing PC3-ERR α and ACE-1-ERR α tumors (%BV/TV, Mann-Whitney, PC3 $P = 0.022$ and, ACE-1 $P = 0.0411$) suggesting an increase in bone destruction in both ERR α overexpression models (Figure 2E and 2Q, %BV/TV). The stimulatory effect of ERR α on PCA-induced bone lesion surface was also evident by histology (Figure 2 PC3(C,D)) and histomorphometric analysis (TB/STV) with an increase of skeletal tumor burden (Figure 2E and 2Q). Since the osteoblastic region is highly stimulated in the PC3c model (Figure 2H, 2I) (see the increased of

the %BV/TV: (Mann-Whitney, $P = 0.022$)), the surface of the tumor (TB/STV) decreased in animals bearing PC3c-ERR α (Figure 2J (Mann-Whitney, $P = 0.0023$)) (asterisks showing bone formation). Similarly, 70% of mice bearing PC3-ERR α tumors exhibited small new bone formation compared to mice bearing PC3-CT tumors (Figure 2E). New bone formation was also seen in animals bearing ACE-1-ERR α versus ACE-1-CT tumors (Figure 2Q: extra-bone-new spicules surface formation/ tissue volume; Figure 2 (N-P) (asterisks mark extra-new spicules bone formation). The bone lesion surface and bone volume-new

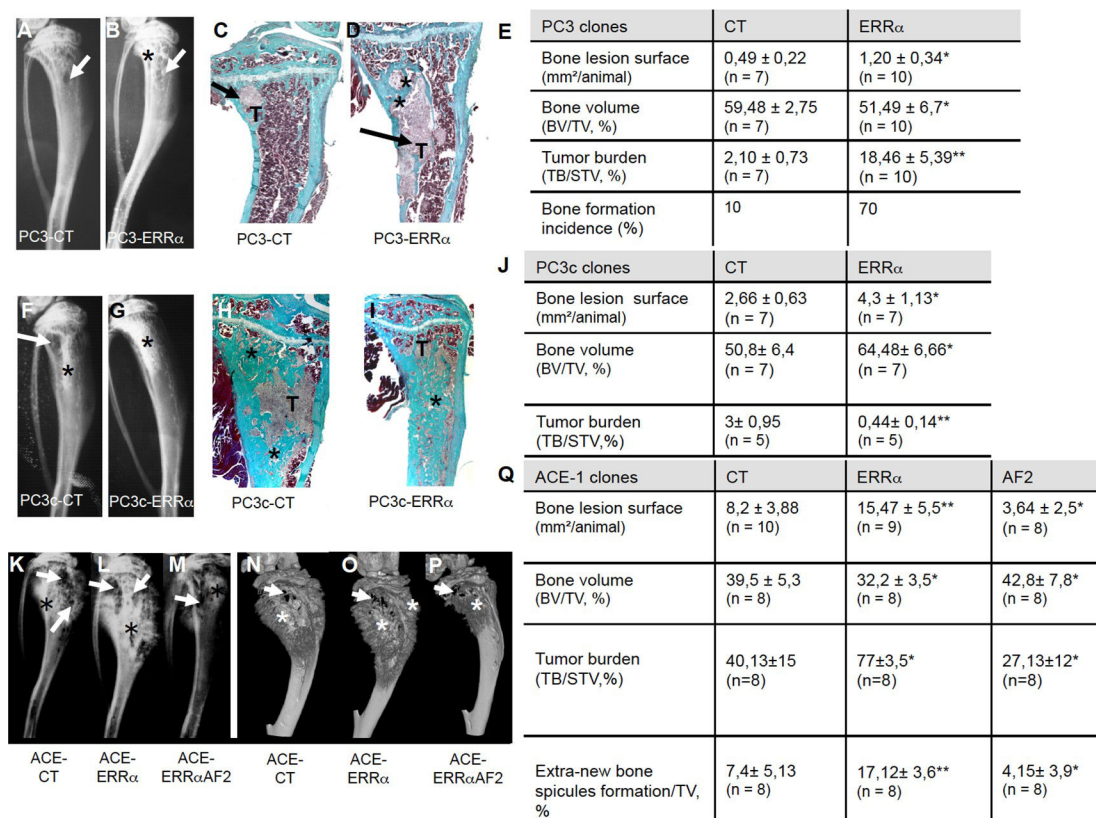


Figure 2: Over-expression of **ERR α** in prostate cancer cells induced bone lesions development. Radiography revealed larger lesions in mice injected with (A, B) PC3-ERR α versus PC3-CT, and (F, G) with PC3c-ERR α versus PC3c-CT. Histology after Goldner's trichrome staining confirmed the radiography results in mice injected with (C, D) PC3-ERR α versus PC3-CT (H, I) with PC3c-ERR α versus PC3c-CT (bone matrix in green). (E) Induction -of larger bone lesions surface in mice injected with PC3-ERR α (ERR α) (Mann-Whitney, $P = 0.011$), -of a decrease in %BV/TV (Mann-Whitney, $P = 0.022$) and an increase of %TB/STV (Mann-Whitney, $P = 0.008$) compared with mice injected with PC3-CT (CT). Bone formation incidence show that 70% of mice injected with PC3-ERR α (ERR α) developed some bone formation as opposed to 10% of mice injected with PC3-CT (CT). (J) Increased -of bone lesions surface in mice injected with PC3c-ERR α (Mann-Whitney, $P = 0.0175$), -of the %BV/TV (Mann-Whitney, $P = 0.022$) and decrease of the %TB/STV (Mann-Whitney, $P = 0.0023$) compared with mice injected with PC3c-CT (CT). Radiography (K–M) and 3D micro-tomography reconstructions (N–P) showed larger bone lesions in mice injected with ACE-ERR α versus ACE-CT with an abrogation of the bone lesion effects seen with ERR α overexpression in tumors bearing the dominant negative AF2-truncated ERR α . (Q) After 3 weeks post inoculation of ACE-ERR α , ACE-CT and ACE-AF2 cells, radiography revealed larger and smaller bone lesions surface in mice injected with ACE-ERR α and ACE-AF2 respectively compared to CT (Mann-Whitney, $P = 0.0079$, $P = 0.0304$) and microtomographic reconstructions of tibiae show a decrease in mice injected with ACE-ERR α compared to CT (%BV/TV: Mann-Whitney, $P = 0.0411$), an increase in %TB/STV (Wilcoxon, $P = 0.034$) compared to CT, and an increase in % new bone formation/TV (extra-bone spicules formation): (Mann-Whitney, $P = 0.0025$). The increase in bone lesion surface (Mann-Whitney, $P = 0.0011$), in the %TB/STV (Mann-Whitney, $P = 0.0052$), in the extra-bone spicules formation (Mann-Whitney, $P = 0.0012$) and the decrease in %BV/TV (Wilcoxon, $P = 0.0273$) effects seen with ERR α overexpression were markedly abrogated in tumors bearing the dominant negative AF2-truncated ERR α . * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.001$; *** = $P < 0.0001$. T: Tumor; * bone formation; Arrow: bone degradation.

bone formation effects seen with $ERR\alpha$ overexpression were markedly abrogated in tumors bearing the dominant negative AF2-truncated $ERR\alpha$ (Figure 2K, 2M and 2N, 2P, 2Q). Taken together, our results indicate that overexpression of $ERR\alpha$ in PCa cells stimulates both new bone formation and destruction suggesting that it may be associated with mechanisms mediating mixed lesions *in vivo*.

Modulation of $ERR\alpha$ expression in cancer cells affects the bone microenvironment

Since our *in vivo* data suggested an impact of $ERR\alpha$ expression levels on PCa-induced bone destruction and formation, we next assessed whether PCa overexpressing $ERR\alpha$ cells affected osteoclasts (bone-resorbing cells) and osteoblasts (bone-forming cells). A 40% increase in TRAP-positive osteoclast surface (%Oc.S/BS) was seen at the bone-tumor cell interface in PC3- $ERR\alpha$ tumors (Figure 3A). Consistent with these *in vivo* data, the number of TRAP-positive cells (Figure 3B) and the expression of osteoclast markers (*trap*, *ck*, *call* and *rank*) (Figure 3C) were higher in co-cultures of primary mouse bone marrow cells with PC3- $ERR\alpha$ cells compared to PC3-CT cells

[5]. Moreover, treatment of bone marrow cells by the conditioned medium obtained from parental PC3 cells treated with the inverse agonist XCT-790, which blocks $ERR\alpha$ activity, inhibited osteoclast formation (Figure 3D). Similarly, PC3c- $ERR\alpha$ cells co-cultured with primary mouse bone marrow cells also stimulated osteoclast formation compared to PC3c-CT cells (Figure 3E), as did ACE-1- $ERR\alpha$ compared to ACE-1-CT cells while ACE-1-AF2 inhibited osteoclastogenesis compared to ACE-1- $ERR\alpha$ (Figure 3F) suggesting that cancerous cells expressing $ERR\alpha$ increase osteoclastogenesis.

The increased bone formation observed *in vivo* suggests that changes in $ERR\alpha$ expression in PCa cells also alters the differentiation of osteoblasts. Consistent with this hypothesis, a higher number of bone nodules formed in primary mouse calvaria cells cultured with PC3- $ERR\alpha$ versus PC3-CT conditioned medium (Figure 4A). Similarly, the expression of the osteoblastic markers alkaline phosphatase (*alp*), bone sialoprotein (*bsp*) and osteocalcin (*ocn*) increased (Figure 4C) in co-cultures of MC3T3-E1 and PC3- $ERR\alpha$ cells ($ERR\alpha$) (Figure 4C) [31]. The pro-osteoclastic factors *rankl* but not *opg*, was increased in MC3T3-E1 cells co-cultured with PC3- $ERR\alpha$

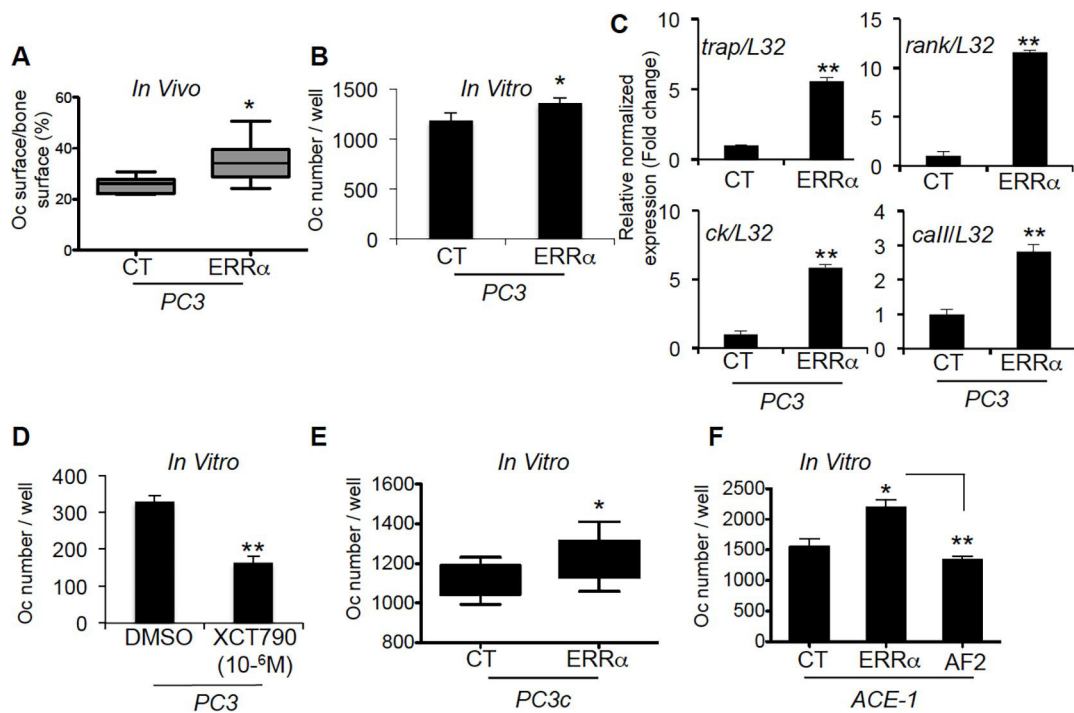


Figure 3: $ERR\alpha$ overexpression in PCa- $ERR\alpha$ cells modified bone-resorbing cells. (A) Increase in osteoclast (Oc) surface in bone lesions induced by PC3- $ERR\alpha$ cells *in vivo* (%Oc.S/BS: Mann-Whitney, $P = 0.0062$; $n = 7$ (CT) and $n = 10$ ($ERR\alpha$)). (B) PC3- $ERR\alpha$ cells increase the number of TRAP+ osteoclasts *in vitro* (Oc number/well: paired t -test, $P = 0.0275$). (C) mRNA was extracted from co-cultures on day 7. The expression of *trap* (Tartrate Resistant Acid Phosphatase), *ck* (Cathepsin K), *rank* and *call* (Carbonic Anhydrase II) was assessed by real-time RT-PCR on triplicate samples; all markers were higher in Oc/PC3- $ERR\alpha$ ($ERR\alpha$) versus Oc/PC3-CT (Student's t -tests, $P = 0.0026$; $P = 0.0055$, $P = 0.0057$; $P = 0.008$). (D) Conditioned medium obtained from parental PC3 cells treated with the inverse agonist XCT-790 decreased Oc formation, confirming the results obtained with PC3- $ERR\alpha$ (Student's t -tests, $P = 0.0023$). (E-F) PC3c- $ERR\alpha$ (E) and ACE-1- $ERR\alpha$ (F) increased the number of TRAP+ osteoclasts *in vitro* compared to the respective controls (Oc number/well: paired t -test, $P = 0.022$ (PC3c- $ERR\alpha$ versus PC3c-CT) and ANOVA $p = 0.0048$, $P < 0.05$ (ACE-1- $ERR\alpha$ versus ACE-1-CT) while ACE-1-AF2 inhibited Oc formation $P < 0.005$ (ACE-1-AF2 versus ACE-1- $ERR\alpha$). Oc results are representative of two independent experiments, each performed in triplicate samples.

cells (Figure 4D). Consistent with this, we observed a trend towards an increase in the number of bone nodules formed in primary mouse calvaria cells cultured with PC3c-ERR α conditioned medium (Figure 4B) and an increase in osteoblastic markers *bsp* and *ocn* expression in co-cultures of MC3T3-E1 and ACE-1-ERR α cells (ERR α) (Figure 4E). In contrast, no change in expression of either osteoblastic markers was detected in co-cultures of MC3T3-E1 with ACE-1-AF2 cells (Figure 4E). Also no regulation of *rankl* and *opg* expression was noticed (Figure 4F). Taken together, our results suggest that ERR α expression in PCa cells induces changes in osteoblast lineage cells.

Identification of two factors regulated in PCa cells that couple bone resorption and formation: VEGFA and Wnt5a

Since both osteoclasts and osteoblasts are stimulated by PCa cells overexpressing ERR α , we next sought to identify factors secreted by PCa cells that may stimulate both lineages. As shown earlier, PC3, PC3c and ACE-1

cells overexpressing ERR α stimulate expression of *VEGF-A* (Figure 1G, I, K), a known ERR α target and stimulator of osteoblasts and osteoclasts [32, 33]. By immunohistochemistry, ERR α (Figure 5A, 5B) and *VEGF-A* (Figure 5C, 5D) expression was observed in PCa cells and higher in PC3-ERR α -induced bone lesions *in vivo* (Figure 5B and 5D respectively) compared to PC3-CT lesions (Figure 5A and 5C respectively). Regulation of *VEGF-A* by ERR α was confirmed *in vitro* in PC3 cells transfected with a pool of three ERR α -siRNA sequences (Si) compared to control sequences (Sc) (Figure 5E–5G). Blocking ERR α activity by treating PC3-ERR α cells with the ERR α inverse agonist XCT-790 also demonstrated a statistical down-regulation of *VEGF-A* (Figure 5H). That ERR α regulates *VEGF-A* in both non-bone and bone microenvironments was determined by assessing subcutaneous (SC) tumors obtained by injecting PC3-ERR α and PC3-CT clones in male SCID mice. *VEGF-A* expression was higher in PC3-ERR α (ERR α) -tumors compared to PC3-CT (CT)-induced SC tumors *in vivo* (Figure 5I–5J). The correlation of increased ERR α and increased *VEGF-A* expression was confirmed in PC3c-ERR α -induced bone

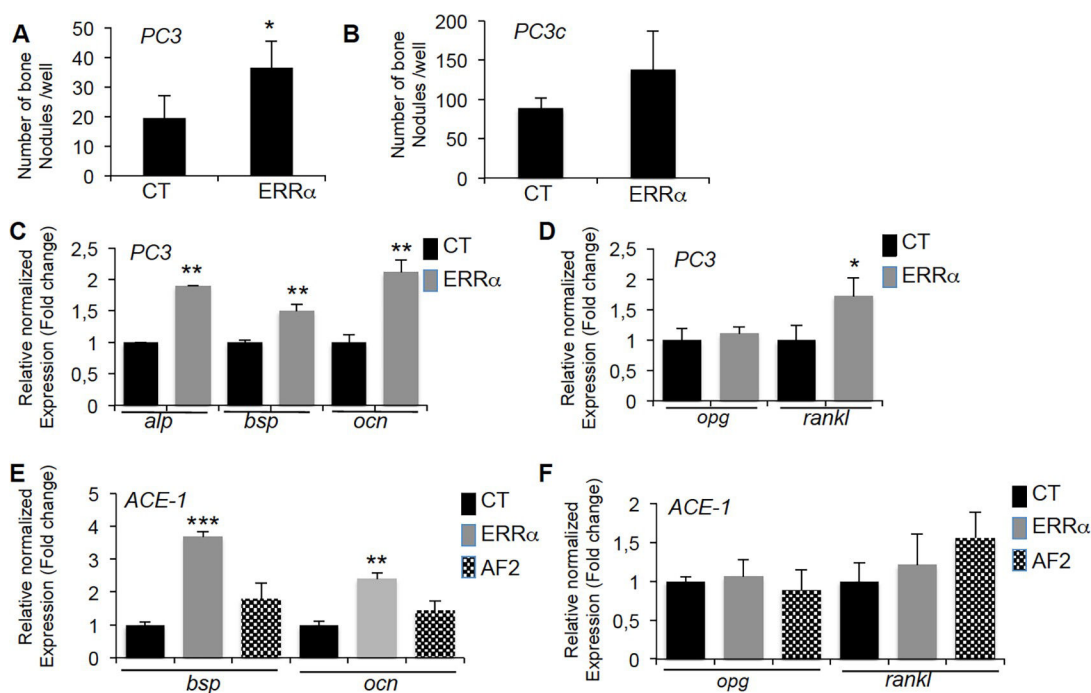


Figure 4: ERR α overexpression in PCa-ERR α cells stimulates bone-forming cells. (A) Osteoblasts (Ob) from primary mouse calvaria cell cultures were treated with conditioned medium of PC3-ERR α (ERR α) or PC3-CT (CT) cells. Bone nodule number was higher in co-cultures with PC3-overexpressing ERR α (Ob-ERR α) (Mann-Whitney, $P = 0.0118$). (B) When treated with conditioned medium of PC3c-ERR α (ERR α), bone nodule number was increased but not significantly compared to PC3c-CT (CT). (C) Confirming mouse calvaria results, co-cultures of PC3-ERR α (ERR α) or PC3-CT (CT) cells with the MC3T3-E1 osteoblastic cell line for 2 weeks stimulated expression of osteoblastic markers *alp* (Alcalin Phosphatase), *bsp* (bone sialoprotein) and *ocn* (osteocalcin) (ANOVA, $P < 0.0001$; Student's *t*-tests, $P = 0.0031$; $P = 0.0098$; $P = 0.0017$) (D) Expression of *rankl* mRNA was also higher (ANOVA, $P < 0.0001$, Student's *t*-tests, $P = 0.0279$) while *opg* expression was not altered. (E) Co-cultures of ACE-1-ERR α (ERR α) or ACE-1-CT (CT) cells with the MC3T3-E1 osteoblastic cell line for 2 weeks also stimulated *bsp* and *ocn* mRNA expression (ANOVA *bsp*, $P = 0.004$; Student's *t*-tests, $P = 0.0003$ (ACE-1-CT versus ACE-1-ERR α); ANOVA *ocn*, $P = 0.0069$; Student's *t*-tests, $P = 0.0067$ (ACE-1-CT versus ACE-1-ERR α)) while no regulation was observed with ACE-1-AF2 cells (AF2). (F) Expression of *rankl* and *opg* mRNA was not regulated. Ob results are representative of two independent experiments, each performed in triplicate samples.

lesions *in vivo* (Figure 5L, 5N) compared to PC3c-CT lesions (Figure 5K, 5M). It is interesting to mention that beside tumor mass, *vegfa* was also highly expressed in peritumoral cells in PC3c-CT and PC3c-ERR α (Figure 5M, 5N) compared to PC3-CT and PC3-ERR α - induced bone lesions *in vivo* (Figure 5C, 5D). This peri-tumoral *vegfa* expression that probably contributes to the formation of the mixed phenotype observed in PC3c cells, was not modulated in PC3-ERR α - induced bone lesions *in vivo* compared to CT. Finally, in line with our pre-clinical models, we found that *VEGF-A* positively correlated with ERR α expression levels in primary CRPC tumor samples from combined microarray datasets GSE1034, GSE6919 and GSE2269 ($n = 140$, $r = 0.364$, $P < 0.0001$) and in bone metastases (GSE29650, GSE41619 and GSE74685) [34–36] ($n = 64$, $r = 0.646$, $P < 0.0001$) (Table 1; Supplementary Table S1).

The second factor that was found upregulated by ERR α in our human preclinical models is *WNT5A*, a factor also known to stimulate osteoblasts and osteoclasts

[37] and previously linked to ERR α in osteoblasts [38]. Thus, *WNT5A* expression was higher in ERR α -overexpressing PC3 cells (PC3-ERR α) compared to PC3-CT clones (Figure 6A), and down-regulating ERR α levels in PC3 cells with ERR α -SiRNA (pool of three sequences) decreased *WNT5A* expression compared to control sequences (Sc, Figure 6B). *WNT5A* expression was also upregulated in PC3-ERR α - versus PC3-CT-induced bone lesions *in vivo* (Figure 6C, a versus b). XCT-790 treated PC3-ERR α cells also demonstrated a down-regulation of *WNT5A* expression (Figure 6D). Stimulation of *WNT5A* expression by ERR α was also confirmed in PC3-ERR α - versus PC3-CT-induced SC tumors *in vivo* (Figure 6E), and in PC3c-ERR α -versus PC3c-CT clones *in vitro* (Figure 6F) as well as in PC3c-ERR α versus PC3c-CT-induced bone lesions *in vivo* (Figure 6G, a versus b). Notably, *WNT5A* expression also positively correlated with ERR α expression levels in bone metastases microarray datasets (GSE29650, GSE41619

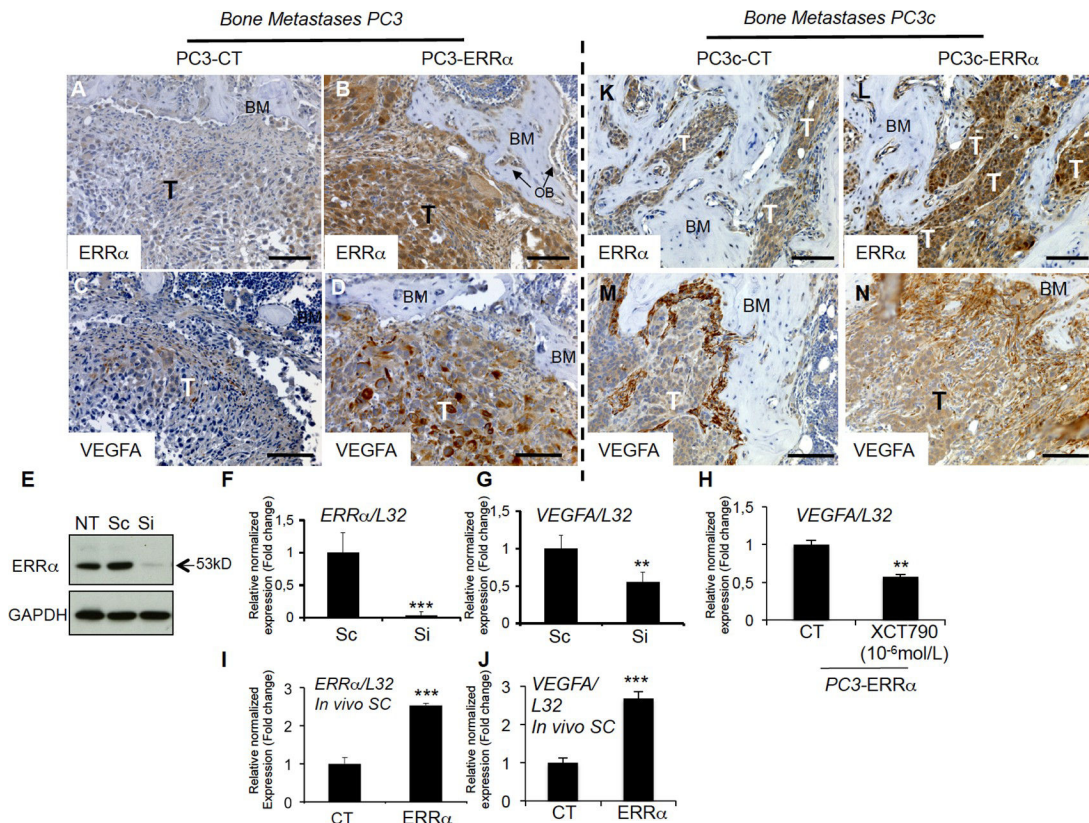


Figure 5: Stimulation of *VEGF-A* expression in PCa cells by ERR α . (A–B) Visualization of the overexpression of ERR α protein expression in tumor by IHC on bone lesions *in vivo* induced by PC3-ERR α (ERR α)(B) compared PC3-CT (CT)(A). (C–D) Paralleling the overexpression of ERR α , VEGF-A expression in tumor was also stimulated *in vivo* in bone lesions induced by PC3-ERR α (ERR α) (D) compared PC3-CT (CT) cells (C). (E) Decreased ERR α protein expression by transfection of three pooled siRNA sequences in parental PC3 cells shown by Western blot and (F–G) by real-time RT-PCR for ERR α and *VEGF-A* expression (Student’s *t*-tests $P = 0.0002$; $P = 0.0027$). (H) Decreased *VEGF-A* mRNA expression was also observed after XCT-790 treatment at 10^{-6} M for 48 h in PC3-ERR α cells (Student’s *t*-tests $P = 0.006$). (I–J) Real-time RT-PCR was performed on triplicate samples and normalized against the ribosomal protein gene L32 to evaluate ERR α ($P = 0.0001$) and VEGF-A ($P = 0.0001$) expression within subcutaneous (SC) tumors *in vivo* (pool of $n = 3$ for each condition). (K–N) Similarly, to the PC3 model, IHC revealed that ERR α and *VEGF-A* protein levels in tumors were increased in mixed lesions induced by PC3c-ERR α (ERR α) (L and N concomitantly) compared to PC3c-CT (CT) (K and M concomitantly) *in vivo*. Bar = 200 μ m, T: Tumor; OB: osteoblasts; BM: Bone Matrix.

and GSE74685) ($n = 64$, $r = 0.342$, $P = 0.00572$). Contrary to bone metastases specimens, a negative correlation with a weak Pearson R value was observed in primary CRPC tumor samples from combined microarray datasets GSE1034, GSE6919 and GSE2269 ($n = 140$, $r = -0.178$, $P < 0.0001$) (Table 1; Supplementary Table S1).

Stimulation of stromal *POSTN* expression by tumor cells overexpressing *ERRα*

Given that WNT signaling is known to be recruited by the extracellular matrix protein PERIOSTINE (*POSTN*) in the stroma of at least certain tumor types and to participate in the steps required for cancer cell colonization and tumor progression [8], we next analyzed *postn* expression in our tumor models. By real time PCR, we found mouse *postn* expression up-regulated in PC3-*ERRα* versus PC3-CT SC tumors (Figure 7A). Immunostaining confirmed the stimulation of *postn* in peri-tumoral infiltrating cells in PC3-*ERRα* bone lesions (Figure 7B, a versus b), in PC3c-*ERRα* bone lesions (Figure 7C, a versus b) and in peri-tumoral cells in PC3-*ERRα* SC tumor versus PC3-CT SC tumors (Supplementary Figure S1A a versus b). Vimentin expression was also addressed to show the stromal phenotype of the peri-tumoral cells expressing *postn* (Figure 7Cc). Importantly, *ERRα* and

postn expression levels were significantly positively correlated in bone metastases specimens ($n = 44$, $r = 0.528$, $P = 0.00023$) (Table 1; Supplementary Table S1). A positive correlation was also found in adjacent normal tissue of primary CRPC tumors ($n = 184$, $r = 0.401$, $P = < 0.0001$) confirming the stimulation of *POSTN* in peri-tumoral cells (Table 1; Supplementary Table S1).

Postn has been shown to be stimulated in infiltrating stromal cells by factors secreted by breast cancer cells such as $TGFβ$ [8, 9]. By real-time PCR, we found higher human *TGFβ1* expression in PC3-*ERRα* clones compared to PC3-CT (Figure 7D). Regulation of *TGFβ1* expression by *ERRα* in PCa cells was also confirmed by the lower levels of *TGFβ1* expression in *ERRα*-SiRNA versus control sequences-transfected PC3 cells (Si versus Sc, Figure 7E), in XCT-790 treated PC3-*ERRα* cells versus DMSO (Figure 7F) and by its stimulation in PC3-*ERRα* versus PC3-CT SC tumors *in vivo* (Figure 7G). Immunohistochemistry also confirmed higher *TGFβ1* staining in tumor cells in PC3-*ERRα* (Figure 7Hb) compared to PC3-CT-induced (Figure 7Ha) bone lesions *in vivo* and in PC3c-*ERRα* (Supplementary Figure S1Bb) compared to PC3c-CT-induced bone lesions *in vivo* (Supplementary Figure S1Ba). Finally, *ERRα* and *TGFβ1* expression levels were significantly positively correlated in primary CRPC tumor samples ($n = 140$, $r = 0.684$,

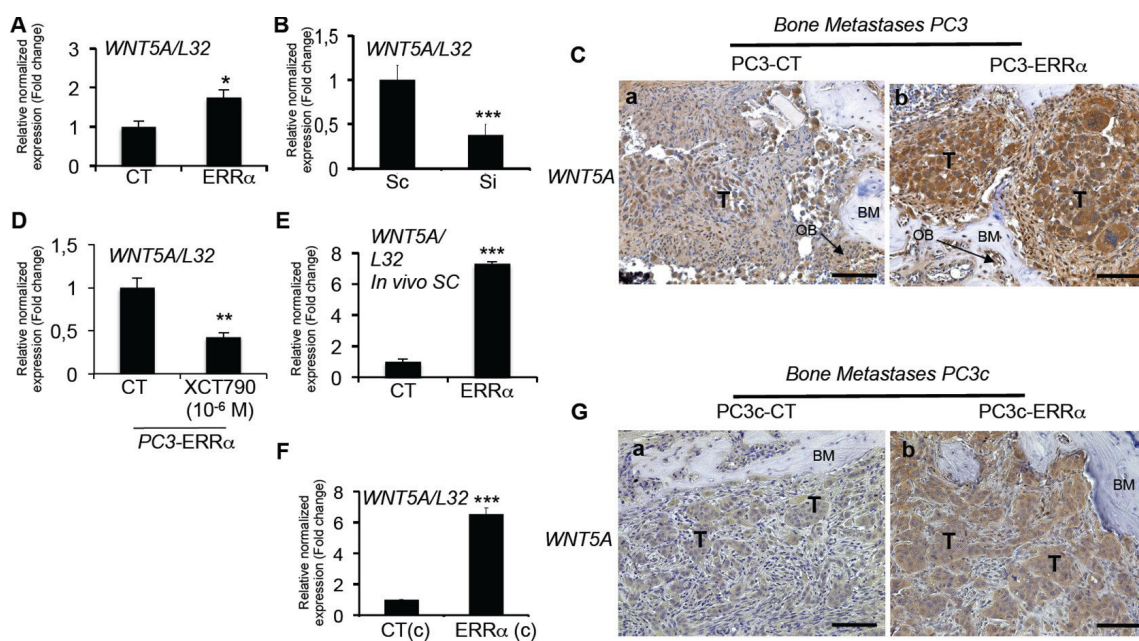


Figure 6: Stimulation of *WNT5A* expression in PCa cells by *ERRα*. (A) Assessment of *WNT5A* expression by real-time RT-PCR on triplicate samples and normalized against the ribosomal protein gene L32. *WNT5A* (Student's *t*-tests $P = 0.0305$) was higher in PC3-*ERRα* versus PC3-CT (CT) cells *in vitro*. (B) *WNT5A* (Student's *t*-tests $P = 0.0007$) mRNA expression was decreased in Si-*ERRα* (pooled of three SiRNA sequences) transfected cells compared to control-transfected (Sc) cells. (C) Paralleling the overexpression of *ERRα*, *WNT5A* protein level expression was also stimulated in tumor *in vivo* in bone lesions induced by PC3-*ERRα* (*ERRα*)(b) compared PC3-CT (CT) cells (a). (D) Decreased *WNT5A* mRNA expression was also observed after XCT-790 treatment at 10^{-6} M for 48 h in PC3-*ERRα* cells (Student's *t*-tests $P = 0.0077$). (E) By real-time RT-PCR, we also found *WNT5A* mRNA expression (Student's *t*-tests $P = 0.0001$) increased in PC3-*ERRα* SC tumors *in vivo* compared to PC3-CT SC tumors (F) *WNT5A* (Student's *t*-tests $P = 0.0026$) mRNA expression was also upregulated in the PC3c-*ERRα* (*ERRα*)(c) clone compared to the PC3c-CT (CT(c)) *in vitro* and (G) in tumor *in vivo* in bone lesions induced by PC3c-*ERRα* (*ERRα*)(b) compared PC3c-CT (CT) cells (a). Bar = 200 $μ$ m, T: Tumor; OB: osteoblasts; BM: Bone Matrix.

Table 1: Meta-analysis using public datasets showing correlation between *ERRα* and *VEGFA*, *WNT5A*, *POSTN* and *TGFβ1* expression levels in bone metastases (GSE29650, GSE41619 and GSE74685) and/or in primary CRPC tumor (GSE1034, GSE6919 and GSE2269)

Genes names	Database	Correlations	Number of samples (N)	
			Primary tumour	Bone Metastases
VEGFA/ERRA	GSE21034/ GSE6919/ GSE32269	Pearson R = 0.364 <i>P</i> = 0.00001	140 CRPC	N/A
	GSE29650/ GSE41619/GSE74685	Pearson R = 0.646 <i>P</i> = 0.000001	N/A	64
WNT5A/ERRA	GSE21034/ GSE6919/ GSE32269	Pearson R = -0.178 <i>P</i> = 0.035	140 CRPC	N/A
	GSE29650/ GSE41619/GSE74685	Pearson R = 0.342 <i>P</i> = 0.00572	N/A	64
POSTN/ERRA	GSE21034/ GSE6919/ GSE32269	Pearson R = 0.401 <i>P</i> = 0.000001	184 in adjacent normal tissue	N/A
	GSE29650/ GSE41619	Pearson R = 0.528 <i>P</i> = 0.00023	N/A	44
TGFβ1/ERRA	GSE21034/ GSE6919/ GSE32269	Pearson R = 0.684 <i>P</i> = 0.000001	140 CRPC	N/A
	GSE29650/ GSE41619	Pearson R = -0.365 NS	N/A	14

To obtain z-scores, normalized data were \log_2 transformed and calculated by subtracting the population mean from individual expression values for each gene and then dividing the difference by the population standard deviation. Correlation scores were calculated using the Pearson correlation coefficient. *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

P < 0.0001) (Table 1; Supplementary Table S1). On the contrary, no significant correlation was observed in bone metastases (Table 1; Supplementary Table S1). The data suggest that the upregulation of stromal cell *POSTN* may be the initial step through which *ERRα* induces rapid bone lesion progression.

DISCUSSION

Our findings indicate that *ERRα* is a stimulator of prostate cancer cell progression in bone. In addition to confirming the regulation of the previously identified *ERRα*-regulated gene, *VEGF-A* [30] we identified *WNT5A* and *TGFβ1* as new *ERRα*-regulated genes. Together with our observation that *ERRα* expression is higher in CRPC patients with bone metastases than without, and that *ERRα* in PCa alters molecular signaling in the stroma via the regulation of *POSTN* expression in infiltrating fibroblasts [10], our data provide new mechanistic insights into *ERRα*-regulated pathways mediating PCa progression in bone.

ERRα-positive prostate tumors have been associated with more invasive disease and a higher risk of recurrence [18]. For example, *ERRα* immunoreactivity score has been linked with Gleason scores [18]. *ERRα* was also recently associated with hypoxia adaptation in PCa cells (AR+ (LNCaP) and AR-(PC3) pre-clinical models), suggesting that *ERRα* might be involved in advanced progression

of PCa [19]. Advanced PCa has a propensity of 90% to metastasize to bone, of 25% to metastasize to liver and to develop CRPC, all of which are associated with poor five-year survival rate [2].

Since we had shown that *ERRα* may be involved in bone metastases from breast cancer [22] that prompted us to determine if and how *ERRα* could contribute to malignant growth of PCa in bone. Interestingly, *ERRα* stimulation of PCa-induced bone lesion progression is different from what we observed in breast cancer [22]. *ERRα* plays a dual role in the progression of breast cancer -by promoting local tumor growth but by decreasing osteolytic lesions in bone, the latter due to the inhibition of osteoclast differentiation. The opposite activity of *ERRα* in PCa versus breast cancer on bone resorbing-cells may explain the differences in tumor progression in bone between breast and prostate cancers [22] and suggests distinct clinical management of prostate versus breast cancer patients with bone metastases.

ERRα expression levels in primary tumors and bone metastases associated with PCa patients correlated well with our results in three CRPC preclinical mouse models. At the cellular level, we found that *ERRα* directly stimulates both osteoclasts and osteoblasts, as well as factors in PCa cells thought to stimulate osteoclasts and osteoblasts, *i.e.*, *VEGF-A* [33] [39]; *WNT5A* [37, 40, 41] and *TGFβ1* [1, 6, 42] (Figure 8, pathways 1 and 2). Notably, all these factors were also found to correlate

with $ERR\alpha$ expression in our meta-analysis studies of human PCa datasets.

Previously, $WNT11$ was shown to be regulated by $ERR\alpha$ in PCa cells and implicated in cancer cell invasion [43]. Our data on $WNT5A$ and $ERR\alpha$ expression in both *in vivo* and *in vitro* experiments and meta-analysis of human PCa datasets reinforces the link between $ERR\alpha$ activity and Wnt signaling. Interestingly, analysis of circulating tumor cells (CTC) from patients had indicate that $WNT5A$ is activated, in keeping with a role for $WNT5A$ in cell polarization and cancer cell invasion [44, 45, 46]. Indeed, analysis of CTCs from patients progressing on AR inhibitor compared with untreated case indicates activation of $WNT5A$ [46]. Moreover, Miyamoto D *et al.* show that ectopic expression of $WNT5A$ inhibits the anti-proliferative effect of AR inhibition suggesting that it may participate in the acquisition of resistance to androgen deprivation and to treatment failure [46].

However, $WNT5A$ has variously been described as a pro or an inhibitor of tumor growth in bone [47, 48]. Our results suggest that $ERR\alpha$ -mediated $WNT5A$ is associated with advanced PCa metastatic disease in bone, but to fully understand the molecular mechanisms and determine direct versus indirect regulation by $ERR\alpha$ in tumor cells, additional studies are required. Nevertheless, the identification of $WNT5A$ as an $ERR\alpha$ -regulated gene may represent implications for its potential use as a prognostic marker in prostate cancer.

With respect to PCa-induced osteolysis, we found that $rankl$ expression was stimulated in MC3T3-E1 cells co-cultured with PC3- $ERR\alpha$ but not with the ACE-1 cell model, which is a mixed lesion model, whether or not $ERR\alpha$ levels were modified in the latter. These data suggest indirect regulatory effects on osteoclasts that participate in the resorption observed in bone lesions in animals bearing $ERR\alpha$ osteolytic tumors but not mixed

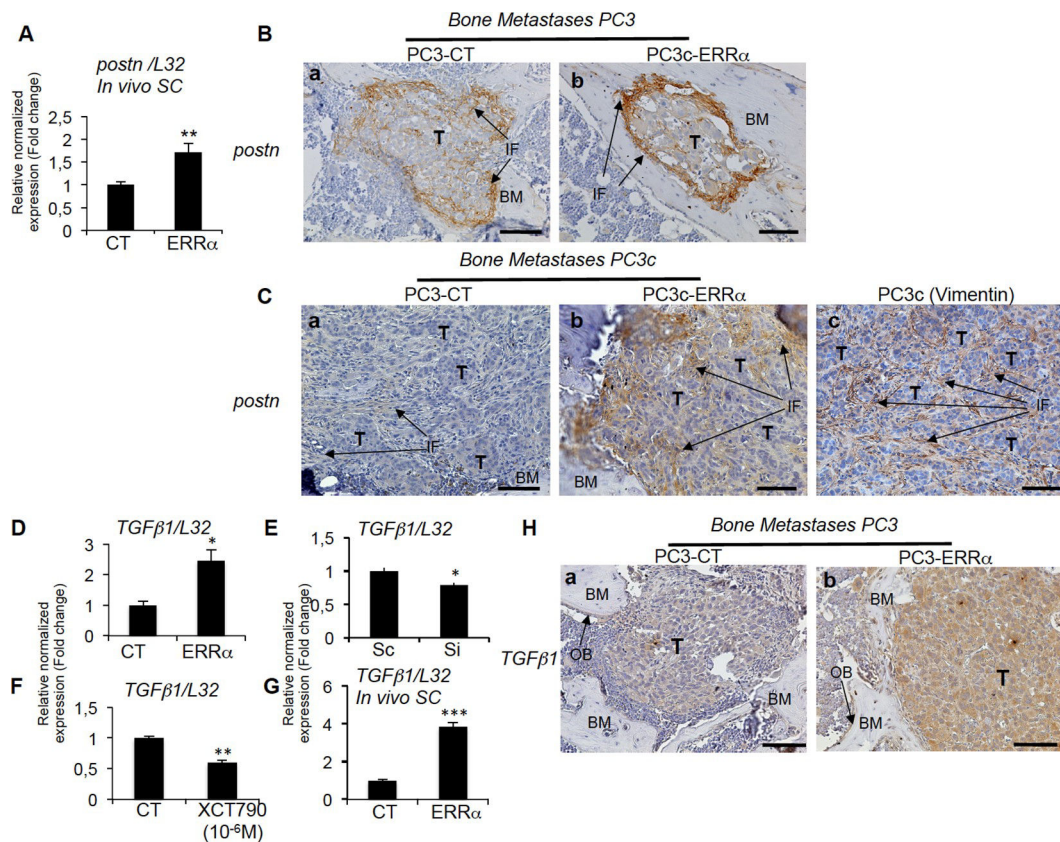


Figure 7: Regulation of stromal *postn* by $ERR\alpha$. (A) Assessment of the mouse *postn* expression by real-time RT-PCR on triplicate samples and normalized against the mouse ribosomal protein gene L32. Real-time RT-PCR showed increased *postn* mRNA expression (Student's *t*-tests $P = 0.0026$) in PC3- $ERR\alpha$ -induced SC tumors *in vivo*. (B) Increased expression of *postn* in peri-tumoral and infiltrating fibroblasts was visualized by IHC on PC3- $ERR\alpha$ -induced bone lesions (b) compared to PC3-CT (a). (C) Similarly, *postn* protein was upregulated in the infiltrating fibroblasts *in vivo* in bone lesions induced by PC3c- $ERR\alpha$ ($ERR\alpha$)(b) compared PC3c-CT (CT) cells (a). Vimentin antibody was used to show the fibroblastic type of the *postn* expressing cells (c) (D) Real-time RT-PCR showed that *TGFβ1* mRNA expression (Student's *t*-tests $P = 0.0246$) was higher in PC3- $ERR\alpha$ versus PC3-CT (CT) cells *in vitro* while (E) *TGFβ1* (Student's *t*-tests $P = 0.022$) mRNA expression was decreased in Si- $ERR\alpha$ (pooled of three sequences) transfected cells compared to control-transfected (Sc) cells. (F) Real-time RT-PCR also showed decreased *TGFβ1* mRNA expression (Student's *t*-tests $P = 0.0033$) in XCT790 treated PC3- $ERR\alpha$ cells and (G) increased *TGFβ1* mRNA expression (Student's *t*-tests $P = 0.0002$) in PC3- $ERR\alpha$ -induced SC tumors *in vivo*. (H) *TGFβ1* staining was higher in PC3- $ERR\alpha$ (b) compared to PC3-CT (a) in tumor-induced bone lesions *in vivo*. Bar = 200 μm . T: Tumor; OB: osteoblasts; BM: Bone Matrix; IF: infiltrating fibroblasts.

lesions (Figure 8, pathway 3).

Our data suggest that $ERR\alpha$ may also have an impact on the stromal microenvironment. The reciprocal interaction between cancer cells and tissue-specific stroma is known to be critical for primary and metastatic tumor growth progression and *POSTN* is one of the extracellular matrix molecules known to participate in tumor proliferation and invasion when secreted from stromal cells infiltrating tumors [8, 10, 11]. Here, we confirm that *postn* is not only expressed in the stromal cells infiltrating tumors of bone xenografts but also in orthotopic PCa xenografts [10]. However, we also show for the first time that mouse *postn* expression can be stimulated by PCa cells overexpressing $ERR\alpha$ in bone and in SC tumors *in vivo*. Our data also suggest that $ERR\alpha$ may participate in the initial expansion of cancer cells by regulating the extracellular matrix component *postn* in stromal cells infiltrating tumors at least in part through the regulation of *TGFb1* in prostate cancer cells (Figure 8, pathway 4) [8]. The link between $ERR\alpha$ /*POSTN* in the clinical models was confirmed by our meta-analyses of bone metastases and in tumor adjacent tissues in primary tumors, which suggests that *POSTN* may constitute a new prognostic marker in association with $ERR\alpha$. The data also suggest that this is may be the initial step by which $ERR\alpha$ induces rapid bone lesion progression. Consequently, targeting the tumor

microenvironment may also constitute a new therapeutic approach for prostate cancer patients with high levels of $ERR\alpha$ [49]

Very recently, the $ERR\alpha$ coactivator *PGC1 α* has been described as a suppressor of PCa metastasis [50]. *PGC1 α* is expressed at very low levels (*i.e.*, CT: 33) in our PC3, PC3c models, suggesting that the $ERR\alpha$ -*PGC1 α* mechanisms described by Torrano *et al.* are unlikely to occur in these models. Taken together, these data suggest that $ERR\alpha$ is a suppressor when *PGC1 α* is highly expressed and as an activator when *PGC1 α* expression is low, in turn strongly suggesting that, depending on the expression of $ERR\alpha$ cofactors in PCa cells, $ERR\alpha$ can have opposite activities. Thus, it will be important to take into account not only the expression of $ERR\alpha$ but also its cofactors in tumors specimens.

In conclusion, we report for the first time on the involvement of $ERR\alpha$ in the steps of PCa initiation and tumor progression in bone, which results from $ERR\alpha$ modifications of signaling molecules and the microenvironment. Our findings contribute to a new understanding of mechanisms underlying the overall negative clinical outcome associated with $ERR\alpha$ in prostate cancer and provide a rationale for the investigation of $ERR\alpha$ as a therapeutic target to treat primary prostate cancers and their associated bone metastases.

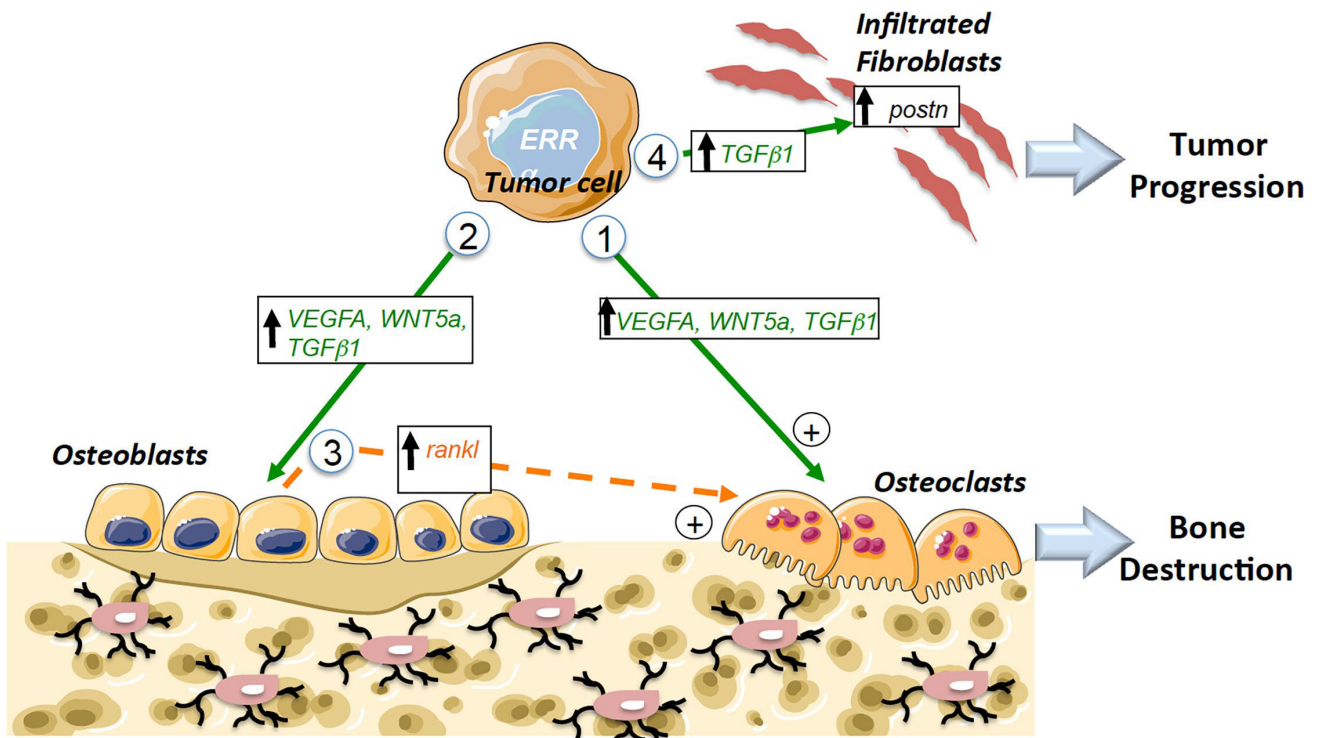


Figure 8: Schematic diagram showing $ERR\alpha$ pathways that can mediate tumor progression in bone. Pathway 1: Increased expression of pro-resorption factors (*VEGF-A*, *WNT5A*, *TGF β 1*) in PCa tumors overexpressing $ERR\alpha$ leads to direct stimulation of Oc formation. Pathway 2: Increased expression of pro-osteoblastic factors (*VEGF-A*, *WNT5A*, *TGF β 1*) in PCa tumors overexpressing $ERR\alpha$ that leads to direct stimulation of Ob formation. Pathway 3: Indirect stimulation of osteoclasts through osteoblasts (via the regulation of *rankl* in Ob for the osteolytic model). Pathway 4: Stimulation of the metastatic niche through the stimulation of *postn* in fibroblasts infiltrating tumors by *TGF β 1* secreted by tumor cells. Ob: osteoblast; Oc: osteoclast; direct signaling (in green), indirect signaling (in orange).

MATERIALS AND METHODS

Ethics approval

SCID male mice were purchased from Charles River and handled according to the French Ministerial Decree No.87-848 of 19 October 1987. Experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Université Lyon-1 (France) (CEEA-55 Comité d'Ethique en Expérimentation Animale DR2014-32). Studies involving human primary prostate tumors were carried out according to the principles embodied in the Declaration of Helsinki.

PCa patient primary and bone metastases specimens for IHC

Autopsy files (dating from 1991 to 1998) from the Department of Pathology (Tumor Tissue Bank, Centre Hospitalier Universitaire de Liège, Belgium) were screened for diagnosis of disseminated prostate cancer with histologically proven bone metastases [51]. For immunohistochemistry (IHC) analysis, we selected a prostate cancer patient who died with disseminated disease, including bone metastases. We retrieved patient slides and their clinical history. Tumors were fixed and paraffin-embedded.

Meta-analysis

For correlation analysis in clinical samples, gene expression data and corresponding clinical annotations for previously published datasets on normal prostate tissue, adjacent prostate tissue, primary and bone metastases were downloaded from the Gene-Expression-Omnibus (GSE6919-GSE29650-GSE32269-GSE41619-GSE21034-GSE74685) (Supplementary Table S1). To obtain z-scores, normalized data were \log_2 transformed and calculated by subtracting the population mean from individual expression values for each gene and then dividing the difference by the population standard deviation. Correlation scores were calculated using the Pearson correlation coefficient. *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical significance was determined by GraphPad Prism v 5.02 using the two-sided student *t*-test.

Animal studies

SCID male mice, 6 weeks of age, were housed in barrier conditions under isolated laminar flow hoods. Mice bearing tumor xenografts were closely monitored for established signs of distress and discomfort and were humanely euthanized.

PC3 cells induce osteolytic lesions, PC3c cells induce mixed lesions with lytic and osteoblastic regions in

the bone marrow cavity [28] while ACE-1 mainly induce lytic lesions in the bone marrow cavity and osteoblastic region outside the bone (spicules) [29].

Intra-osseous tumor xenograft experiments were performed as previously described [28] as for technical reason, we could not obtain bone lesions after intra-arterial and intra-cardiac injections. PC3, PC3c and ACE-1 cells (6×10^5 in 15 μ L PBS) were injected in the bone marrow cavity [28]. Mice were sacrificed after 3 weeks (PC3 and ACE-1) and 6 weeks (PC3c). Radiographs (LifeRay HM Plus, Ferrania) of animals were taken at that time after inoculation using X-ray (MX-20; Faxitron X-ray Corporation). Animals were sacrificed, hind limbs were collected for histology and histomorphometrics analyses. The bone lesion surface, that includes lytic and osteoblastic regions, was measured using the computerized image analysis system MorphoExpert (Exploranova). The extent of bone lesions for each animal was expressed in mm^2 . Tibiae were scanned using microcomputed tomography (Skyscan1174, Skyscan) with an 8.1 μm voxel size and an X-ray tube (50 kV; 80 μA) with 0.5 μm aluminum filter. Three-dimensional reconstructions and rendering were performed using the manufacturer's suite (Respectively, NRecon&CTVox, and Skyscan). Bone Volume/Tissue Volume: (%BV/TV) includes residual trabecular and remaining cortical bone for PC3 and ACE-1 models, plus new bone formation into the bone marrow cavity for PC3c model. For the ACE-1 model, since the osteoblastic lesions is outside the cortical bone, the percent (%) of extra-new bone spicules formation (only spicules surface) with respect to total volume (trabecular, cortical and spicule) (for the ACE model) were quantified. %BV/TV and % of extra-new bone spicules formation were carried out with CTAn (version 1.9, Skyscan) and CTVol (version 2.0, Skyscan) software. Dissected bones were then processed for histological and histomorphometric analysis (tumor burden-to-soft tissue volume (%TB/STV)) and TRAP-positive trabecular bone surface (Oc.S) to the total bone surface (BS) as described previously for the PC3 model [22]. Results were plotted as the mean \pm SD.

Subcutaneous injections of PC3 cells (10^6 in 100 μL PBS) were also performed in 6- to 8-week-old SCID mice. Mice were sacrificed after 6 weeks and tumors were fixed and embedded in paraffin.

Cell lines and transfection

The PC3 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (cell line authentication was performed). The PC3c cells, a subculture cell line of PC3 was isolated in our laboratory *in vitro* after single cell population culture. Consequently to spontaneous derivation of the cells, we finally obtained a subculture cell line named PC3c which was chosen based on its epithelial phenotype [28]. Osteoprotegerin (OPG) and endothelin-1 (ET1) are highly expressed by PC3c while

dikkopf-1 (DKK1) expression is decreased. Finally, PC3c highly expressed bone associated markers osteopontin, Runx2, alkaline phosphatase, bone sialoprotein and produced mineralized matrix *in vitro* in osteogenic conditions showing a strong osteomimetic phenotype of PC3c cells compared to PC3 [28]. ACE-1 were obtained from Dr T Rosol [29]. PC3 and ACE-1 stably transfected clones were routinely cultured in F12K (Gibco/Life Technologies) and PC3c clones were cultured in DMEM. All cultures were supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Perbio/Thermo Scientific) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Life technologies) at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

Human *ERRα* cDNA (*ERRα*) and the dominant negative form mutated into the co-activator domain AF2 (AF2) was obtained previously [22]. Cells were cultured under clonal selection for 4 weeks in the presence of puromycin (1 µg/mL) (Life Technologies). PC3 cells were also transfected (100 pmol) with *ERRα*-siRNA sequences specific to human (ON-TARGET plus Human *ESRR1* SMART pool of three sequences: GGCCUUCGCUGAGGACUUA / GCGAGAGGAGUAUGUUCUA/GGGUGGGCAUGC UCAAGGA) and control sequences (ON-TARGET plus Human Non-targeting pool of three sequences: UGGUUUACAUGUCGACUAA/UGGUUUACAUGUUGUGUGA/UGGUUUACAUGUUUUCUA) (Dharmacon) and mRNA were extracted at 72 h after transfection. Conditioned medium from PC3 and PC3c clones (used on primary calvaria cells culture) and PC3 parental cells treated with the XCT-790 at 10⁻⁶ M (Sigma) was obtained after 48 hours in α -MEM supplemented with 0.5% of serum, then filter sterilized and proteins quantified to use equal concentration of proteins for each conditions (25 µg). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (CT). PC3-*ERRα* cells (pool of three clones) were treated with the inverse agonist XCT-790 at 10⁻⁶ M (Sigma) for 48 h. DMSO was used as control (CT).

Osteoclastogenesis assay

Bone marrow cells from 6-week-old OF1 male mice were cultured for 7 days as previously described [22]. Pools of PC3-CT/PC3-*ERRα* clones or PC3c-CT/PC3c-*ERRα* or ACE-1-CT/ *ERRα* /AF2 were plated (10⁴ cells) on day 1 on bone marrow cells culture in presence of *rankl* and *m-csf*. Mature osteoclasts were stained for TRAP activity (Sigma-Aldrich). Multinucleated TRAP-positive cells containing three or more nuclei were counted as osteoclasts. Results were plotted as the mean \pm SD of three wells for each condition and were representative of two independent experiments.

Osteoblastogenesis assay

Cells were enzymatically isolated from the calvaria as described previously [31]. Mouse calvaria cells were

continuously exposed (21 days) to conditioned medium isolated from cultures of PC3 pooled clones or PC3c clones. Wells were stained with von Kossa stain for ALP and bone nodules were counted on a grid [31]. Results were plotted as the mean number of nodules \pm SD of three wells and were representative of two independent experiments. The murine osteoblastic MC3T3-E1 cell line was cultured for 2 weeks with pooled PC3-CT versus PC3-*ERRα* clones or ACE-1-CT/*ERRα*/AF2 that were plated (10⁴ cells) on day 1 for 2 weeks. mRNA were then extracted and osteoblastic markers expression addressed by real-time PCR.

Immunohistochemistry

Tibia bearing metastases were fixed and embedded in paraffin. IHC analysis was performed by incubating sections overnight with rabbit monoclonal against human and mouse anti-*VEGF-A* (1/50) (Abcam), rabbit polyclonal antibodies against human and mouse *WNT5a* (1/70)(Abcam), goat anti-mouse *postn* (1/200)(R&D), mouse monoclonal anti- human/mouse *TGFβ1* (1/40) (R&D), rabbit polyclonal anti-mouse vimentin(1/50) (Biovision) and mouse monoclonal anti-human/mouse *ERRα* antibody (1/50)(Santa Cruz) [22]. Sections were then incubated with HRP-conjugated anti-mouse (Dako), anti-rabbit (Dako) or the anti-goat (Jackson) antibodies for 1 hour and stained using 3,3'-diaminobenzidine (Dako). Counterstaining was performed using Mayer's hematoxylin (Merck).

Immunoblotting

Protein extraction and immunoblotting were performed as described previously [22]. As the mouse monoclonal anti-human/mouse *ERRα* antibody (Santa Cruz) did not work in Western-blots, we used a rabbit monoclonal antibody against *ERRα* (Epitomics) (1:400) [22] and a rabbit polyclonal antibody against *GAPDH* (Abcam) (1:10,000) (Amersham) as a protein loading control.

Real time RT-PCR

Total RNA was extracted with Trizol reagent (Life Technologies) and 2 µg was reverse-transcribed using Superscript[™]II (Life Technologies) [22]. Real-time PCR was performed on a Mastercycler-ep-Realplex (Eppendorf) with primers specific to human and mouse genes (Supplementary Table S2) using Quantifast SYBR Green (Life Technologies). PCR was carried out according to the manufacturer's instructions. Melting curve analysis was used to verify that a single peak was obtained for each product with a 95–100% PCR efficiency (Roche software). Relative gene expression levels were normalized according to the Ct value of the housekeeping gene encoding the ribosomal protein L32 and results were expressed as fold differences equal to 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (San Diego, USA). Pairwise comparisons were tested using a non-parametric Mann-Whitney *U* test for bone metastases. *In vitro* data were analyzed using ANOVA and Student's *t*-tests to assess the differences between groups. Results of $P < 0.05$ were considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the *Animalerie Lyon Est Conventionnelle* (ALECS) and to D. Sahay for discussion.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed.

GRANT SUPPORT

This work was supported by the *Association pour la recherche sur les tumeurs de la prostate* (ARTP), the National Center for Scientific Research (CNRS) to EB and by the National Institute of Health and Medical Research (INSERM) and the University of Lyon1. AF was supported by the *Ligue nationale contre le cancer* and the *Fondation pour la recherche médicale* (FRM), MB, MG by the French National Cancer Institute (INCa), CD by the Institut Pasteur/Région Nord-Pas-de-Calais, GV by the Labex DEVweCAN and AB from the Belgian National Fund for Scientific Research. CK is a recipient of the H2020 Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowship under agreement number (655777-miROMeS).

REFERENCES

1. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:411–25.
2. Park JC, Eisenberger MA. Advances in the Treatment of Metastatic Prostate Cancer. *Mayo Clin Proc*. 2015; 90:1719–33.
3. Coleman R GM, Morgan G, Clezardin P. Effects of bone-targeted agents on cancer progression and mortality. *J Natl Cancer Inst*. 2012; 104:1059–67.
4. Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5:21–8.
5. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423:337–42.
6. Tang YS and Allistona, T. Regulation of postnatal bone homeostasis by TGF β . *Bonekey Rep*. 2013; 2(255).
7. Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res*. 2005; 65:7554–60.
8. Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, Peng H, Lehr H, Delaloye J, Huelsken J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. 2011; 481:85–9.
9. Liu AY, Zheng H, Ouyang G. Periostin, a multifunctional matricellular protein in inflammatory and tumor microenvironments. *Matrix Biol*. 2014; 37:150–6.
10. Özdemir B, Hensel J, Secondini C, Wetterwald A, Schwaninger R, Fleischmann A, Raffelsberger W, Poch O, Delorenzi M, Temanni R, Mills IG, van der Pluijm G, Thalmann GN, et al. The molecular signature of the stroma response in prostate cancer-induced osteoblastic bone metastasis highlights expansion of hematopoietic and prostate epithelial stem cell niches. *PLoS One*. 2014; 9.
11. Ghajar CM PH, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H, Almeida D, Koller A HK, Stainier DY, Chen EI, Lyden D, Bissell MJ. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol*. 2013; 15:807–17.
12. Benoit G, Cooney A, Giguere V, Ingraham H, Lazar M, Muscat G, Perlmann T, Renaud TJ, Schwabe J, Sladek F, Tsai MJ, Laudet V. International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacol Rev*. 2006; 58:798–836.
13. Giguere V, Yang N, Segui P, Evans RM. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*. 1988; 331:91–4.
14. Kallen J, Schlaeppi JM, Bitsch F, Filipuzzi I, Schilb A, Riou V, Graham A, Strauss A, Geiser M, Fournier B. Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem*. 2004; 279:49330–7.
15. Wei W, Schwaib A, Wang X, Wang X, Chen S, Chu Q, Saghatelian A, Wan Y. Ligand Activation of ERR α by Cholesterol Mediates Statin and Bisphosphonate Effects. *Cell Metab*. 2016; 23:479–91.
16. Busch BB, Stevens WC Jr, Martin R, Ordentlich P, Zhou S, Sapp DW, Horlick RA, Mohan R. Identification of a selective inverse agonist for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *J Med Chem*. 2004; 47:5593–6.
17. Ariazi EA, Clark GM, Mertz JE. Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res*. 2002; 62:6510–8.
18. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Inoue S. Increased expression of estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Int J Cancer*. 2007; 120:2325–30.
19. Zou C, Yu S, Xu Z, Wu D, Ng C, Yao X, Yew DT, Vanacker JM, Chan FL. ERR α augments HIF-1 signalling by directly interacting with HIF-1 α in normoxic and hypoxic prostate cancer cells. *J Pathol*. 2014; 233:61–73.

20. Teyssier C, Bianco S, Lanvin O, Vanacker JM. The orphan receptor ERRalpha interferes with steroid signaling. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36:5350–61.
21. Bonnelye E, Aubin JE. An energetic orphan in an endocrine tissue: a revised perspective of the function of estrogen receptor-related receptor alpha in bone and cartilage. *J Bone Min Res.* 2013; 28:225–33.
22. Fradet A, Sorel H, Bouazza L, Goehrig D, Depalle B, Bellahcene A, Castronovo V, Follet H, Descotes F, Aubin JE, Clezardin P, Bonnelye E. Dual function of ERRalpha in breast cancer and bone metastasis formation: implication of VEGF and osteoprotegerin. *Cancer Res.* 2011; 71:5728–38.
23. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, Montgomery B, Taplin ME, Pritchard CC, Attard G, Beltran H, Abida W, Bradley RK, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell.* 2015; 161:1215–28.
24. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell.* 2010; 18:11–22.
25. Chandran U, Ma C, Dhir R, Bisceglia M, Lyons-Weiler M, Liang W, Michalopoulos G, Becich M, Monzon FA. Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC Cancer.* 2007; 12:64.
26. Cai C, Wang H, He HH, Chen S, He L, Ma F, Mucci L, Wang Q, Fiore C, Sowalsky AG, Loda M, Liu XS, Brown M, et al. ERG induces androgen receptor-mediated regulation of SOX9 in prostate cancer. *J Clin Invest.* 2013; 123:1109–23.
27. Akech J, Wixted JJ, Bedard K, van der Deen M, Hussain S, Guise TA, van Wijnen AJ, Stein JL, Languino LR, Altieri DC, Pratap J, Keller E, Stein GS, et al. Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene.* 2010; 29:811–21.
28. Fradet A SH, Depalle B, Serre CM, Farlay D, Turtoi A, Bellahcene A, Follet HCV, Clézardin P, Bonnelye E. A new murine model of osteoblastic/osteolytic lesions from human androgen-resistant prostate cancer. *PLoS One.* 2013; 8:e75092.
29. LeRoy BE, Thudi NK, Nadella MV, Toribio RE, Tannehill-Gregg SH, van Bokhoven A, Davis D, Corn S, Rosol TJ. New bone formation and osteolysis by a metastatic, highly invasive canine prostate carcinoma xenograft. *Prostate.* 2006; 66:1213–22.
30. Stein RA, Gaillard S, McDonnell DP. Estrogen-related receptor alpha induces the expression of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 114:106–12.
31. Bonnelye E, Merdad L, Kung V, Aubin JE. The orphan nuclear estrogen receptor-related receptor alpha (ERRalpha) is expressed throughout osteoblast differentiation and regulates bone formation *in vitro*. *J Cell Biol.* 2001; 153:971–84.
32. Zelzer E OB. Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Curr Top Dev Biol.* 2005; 169–87.
33. Hu K, Olsen BR. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest.* 2016; 126:509–26.
34. Larson S, Zhang X, Dumpit R, Coleman I, Lakely B, Roudier M, Higano CS, True LD, Lange PH, Montgomery B, Corey E, Nelson PS, Vessella RL, et al. Characterization of osteoblastic and osteolytic proteins in prostate cancer bone metastases. *Prostate.* 2013; 73: 932–40.
35. Haider M, Zhang X, Coleman I, Ericson N, True LD, Lam HM, Brown LG, Ketchanji M, Nghiem B, Lakely B, Coleman R, Montgomery B, Lange PH, et al. Epithelial mesenchymal-like transition occurs in a subset of cells in castration resistant prostate cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis.* 2016; 33:239–48.
36. Hornberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, Widmark A, Bergh A, Wikstrom P. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One.* 2011; 6:e19059.
37. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med.* 2012; 18:405–12.
38. Auld KL, Berasi SP, Liu Y, Cain M, Zhang Y, Huard C, Fukayama S, Zhang J, Choe S, Zhong W, Bhat B.M, Bhat RA, Brown EL, et al. Estrogen-related receptor alpha regulates osteoblast differentiation via Wnt/beta-catenin signaling. *J Mol Endocrinol.* 2012; 48:177–91.
39. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature.* 2014; 507:323–8.
40. Bellon M, Ko N, Lee M, Yao Y, Waldmann T, Trepel J, Nicot C. Adult T-cell leukemia cells overexpress Wnt5a and promote osteoclast differentiation. *Blood.* 2013; 121:5045–54.
41. Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. *J Biochem.* 2016; 159:387–92.
42. Fournier PGJ, Juárez P, Jiang G, Clines GA, Niewolna M, Kim HS, Walton HW, Peng XH, Liu Y, Mohammad KS, Wells CD, Chirgwin JM, Guise TA. The TGF- β Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone. *Cancer Cell.* 2015; 27:809–21.
43. Dwyer MA, Joseph JD, Wade HE, Eaton ML, Kunder RS, Kazmin D, Chang CY, McDonnell DP. WNT11 expression is induced by estrogen-related receptor alpha and beta-

- catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration. *Cancer Res.* 2010; 70:9298–308.
44. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. 2012; *Acta Physiol*(204):1.
 45. Weeraratna A, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell.* 2002; 1:279–88.
 46. Miyamoto D, Zheng Y, Wittner BS, Lee RJ, Zhu H, Broderick KT, Desai R, Fox DB, Brannigan BW, Trautwein J, Arora KS, Desai N, Dahl DM, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. 2015; 349:1351–6.
 47. Lee G, Kang DI, Ha YS, Jung YS, Chung J, Min K, Kim TH, Moon KH, Chung JM, Lee DH, Kim WJ, Kim IY. Prostate cancer bone metastases acquire resistance to androgen deprivation via WNT5A-mediated BMP-6 induction. *Br J Cancer.* 2014 18; 110:1634–44.
 48. Thiele S, Göbel A, Rachner TD, Fuessel S, Froehner M, Muders MH, Baretton GB, Bernhardt R, Jakob F, Glüer CC, Bornhäuser M, Rauner M, Hofbauer LC. WNT5A has anti-prostate cancer effects *in vitro* and reduces tumor growth in the skeleton *in vivo*. *J Bone Min Res.* 2015; 30:471–80.
 49. Nuzzo PV, Buzzatti G, Ricci F, Rubagotti A, Argellati F, Zinoli L, Boccardo F. Periostin: a novel prognostic and therapeutic target for genitourinary cancer? *Clin Genitourin Cancer.* 2014; 12:301–11.
 50. Torrano V, Valcarcel-Jimenez L, Cortazar AR, Liu X, Urosevic J, Castillo-Martin M, Fernández-Ruiz S, Morciano G, Caro-Maldonado t A, Pandya P, LA, Guiu M, Zúñiga-García P, et al. The metabolic co-regulator PGC1 α suppresses prostate cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* 2016; 18:645–56.
 51. Waltregny D BA, de Leval X, Florkin B, Weidle U, Castronovo V. Increased expression of bone sialoprotein in bone metastases compared with visceral metastases in human breast and prostate cancers. *J Bone Min Res.* 2000; 15:834–43.

Supplementary Table S1: General information on the public datasets used for meta-analysis on *ERRα* in CRPC (Figure 1A–1C) and to obtain correlation between *ERRα* and *VEGFA*, *WNT5A*, *POSTN* and *TGFβ1* expression levels in bone metastases (GSE29650, GSE41619 and GSE74685) and/or in primary CRPC tumor (GSE1034, GSE6919 and GSE2269)

Database	Description	Analysis Platform	Number of samples (N)			
			Primary tumour	Adjacent/stroma	Normal Prostate	Bone Metastases
GSE21034	Human primary and metastatic prostate cancer samples and control normal adjacent benign prostate. CRPC samples are defined by biochemical recurrence and metastases. ²⁴	Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array	150	29	N/A	N/A
GSE6919	Patients with androgen-insensitive prostate cancer and normal prostate tissue from organ donors and adjacent tissue. ²⁵	Affymetrix Human Genome U95C Array and Version 2 Array	65	63	18	N/A
GSE32269	Primary prostate cancer tissue from patients with bone metastatic and localised disease. PCa samples are defined as AR positive (PCa) or AR negative (CRPC) based on the presence of (bone) metastases. No bone metastases were collected, only primary tumour tissue available. ²⁶	Affymetrix Human Genome U133A Array	51	N/A	4	N/A
GSE29650	Bone metastases were obtained from CRPC patients. ³⁴	Illumina HumanHT-12 V3.0 expression beadchip	N/A	N/A	N/A	30
GSE41619	Osteoblastic and osteolytic bone metastases from patients with CRPC. ³⁵	Agilent-016162 PEDB Whole Human Genome Microarray 4x44K	N/A	N/A	N/A	14
GSE74685	Metastases collected from autopsies of patients who died from metastatic CRPC. ³⁶	Agilent-016162 PEDB Whole Human Genome Microarray 4x44K	N/A	N/A	N/A	20

Supplementary Table S2: SiRNA sequences and human and mouse primers and PCR using conditions

ERRa-SiRNA	GGCCUUCGCGAGGACUUA – GCGAGAGGAGUAUGUUCUA - GGGUGGGCAUGCUC AAGGA				
Control	UGGUUUACAUGUCGACUAA – UGGUUUACAUGUUGUGUGA - UGGUUUACAUGUUUCCUA				
Gene	Primers (PCR)	PCR cycles	T (°C)	Size (bp)	Reference
Human					
L32	CAAGGAGCTGGAAGTGCTGC CAGCTCTTTCCACGATGGC	25	64	100	NM_000994.3
ERRa	GGAGGCCCCCGGAAGACAGC TCACAGAGGGTAGCCACGGCT	40	65	134	NM_001282451.1
WNT5A	GCAGGACGGTGTACAACCTGGC AGCCGCATGGCCGCCGCGCTG	40	62	153	NM_003392.4
VEGF-A	AGGAGGAGGGCAGAATCA TCTATCTTTCTTTGGTCTGCATT	30	60	315	NM_001025366.2
TGFb1	AGAAGCGGTACCTGAACCCG GCCGGTAGTGAACCCGTTG	30	57	303	NM_000660.5
Mouse					
L32	CAAGGAGCTGGAGGTGCTGC CTGCTCTTTCTACAATGGC	30	59	100	NM_172086
rankl	GTGGTCTGCAGGATCGCTCTG CGCTGGGCCACATCCAACC	40	63	286	NM_011613.3
opg	TGTGTGACAAATGTGCTCC GTCTCACCTGAGAAGAACCC	35	59	340	NM_008764.3
trap	TTCCTCCAGGATGGATTCATGG CTGAAGATACTGCAGTTGTGG	40	61	760	NM_001102405.1
ck	TTAATTTGGGAGAAAAACCT AGCCGCCTCCACAGCCATAAT	40	56	400	NM_007802.4
caII	GCTCATCTGATGGCCAGGG TAGCGGCTGAGCTGGACGCC	40	59	489	NM_009801.4
rank	TGCTCCTCTTCATCTCTGTGGTAGTAGTGG TGGAGTGAAGTCTGCGCCCCACCCTGCTCC	40	61	1995	NM_009399.3
alp	CCCGAATCCTTAAGGGCCAG TATGCGATGCCTTGCAGC	35	59	409	NM_007431.3
bsp	TGCCTACTTTTATCCTCCTCTG ACCCGAGAGTGTGGAAAGTG	40	59	201	XM_011252013
ocn	TGACAAAGCCTTCATGTCCA GAGAGGACAGGGAGGATCAA	40	59	276	NM_007541.3
postn	AATGCTGCCCTGGCTATATG GTAGTGGCTCCCACAATGC	40	55	103	NM_015784.3

10.3 Publication N°3

TMPRSS2-ERG fusion promotes prostate cancer metastases in bone.

DEPLUS R., **DELLIAUX C.**, MARCHAND N., FLOURENS A., VANPOUILLE N.,
LEROY X., DE LAUNOIT Y., DUTERQUE-COQUILLAUD M.

Accepted for publication in *Oncotarget* on 31st December 2016.

TMPRSS2-ERG fusion promotes prostate cancer metastases in bone

Rachel Deplus¹, Carine Delliaux¹, Nathalie Marchand¹, Anne Flourens¹, Nathalie Vanpouille¹, Xavier Leroy², Yvan de Launoit¹, Martine Duterque-Coquillaud¹

¹Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T – Mechanisms of Tumorigenesis and Target Therapies, F-59000 Lille, France

²Institut de Pathologie-Centre de Biologie-Pathologie-Centre Hospitalier Régional et Universitaire, F-59037 Lille, France

Correspondence to: Martine Duterque-Coquillaud, **email:** Martine.Duterque@ibl.cnrs.fr
Rachel Deplus, **email:** rdeplus@ibl.cnrs.fr

Keywords: TMPRSS2-ERG, prostate cancer, bone metastasis, bone tropism

Received: March 10, 2016

Accepted: December 16, 2016

Published: December 31, 2016

ABSTRACT

Bone metastasis is the major deleterious event in prostate cancer (PCa). TMPRSS2-ERG fusion is one of the most common chromosomic rearrangements in PCa. However, its implication in bone metastasis development is still unclear. Since bone metastasis starts with the tropism of cancer cells to bone through specific migratory and invasive processes involving osteomimetic capabilities, it is crucial to better our understanding of the influence of TMPRSS2-ERG expression in the mechanisms underlying the bone tropism properties of PCa cells. We developed bioluminescent cell lines expressing the TMPRSS2-ERG fusion in order to assess its role in tumor growth and bone metastasis appearance in a mouse model. First, we showed that the TMPRSS2-ERG fusion increases cell migration and subcutaneous tumor size. Second, using intracardiac injection experiments in mice, we showed that the expression of TMPRSS2-ERG fusion increases the number of metastases in bone. Moreover, TMPRSS2-ERG affects the pattern of metastatic spread by increasing the incidence of tumors in hind limbs and spine, which are two of the most frequent sites of human PCa metastases. Finally, transcriptome analysis highlighted a series of genes regulated by the fusion and involved in the metastatic process. Altogether, our work indicates that TMPRSS2-ERG increases bone tropism of PCa cells and metastasis development.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the most commonly diagnosed disease and the second cause of cancer-related deaths affecting men in Western world [1]. Bone metastases affect more than 80% of advanced stage PCa patients and constitute the major injurious events [2] with severe pain, nerve compression and pathologic fracture. PCa that has metastasized to bone remains incurable and more likely to lead to a fatal outcome than a primary tumor. Metastatic prostate cancer cells acquire a bone cell-like phenotype by a process called osteomimicry, which allows their survival and their proliferation in the bone marrow microenvironment [3, 4]. At this stage, the tightly-controlled balance between osteoblastic bone formation and osteoclastic bone resorption is aberrantly modified, thereby altering bone metabolism [5–7]. Contrary to osteolytic

lesions observed in breast cancers, PCa bone metastases are mainly osteoblastic or mixed [8]. A major challenge for PCa treatment is to identify factors controlling tumor growth and metastases.

Gene fusions resulting from chromosomal rearrangements are known to play an important role in tumorigenesis and particularly in PCa [9, 10]. Tomlins *et al.* first described a gene fusion between the regulatory element of TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2) gene and ETS (*ERG*, *ETV1*, *ETV4* or *ETV5*) genes in PCa [11, 12]. TMPRSS2 is a prostate-specific androgen-regulated gene and its rearrangement leads to an increased in the expression of the ETS members in response to the androgen. ETS factors are a family of 27 transcription factors in mammals and sharing a conserved DNA binding domain recognizing 5'-GGAA/T-3' sequence in promoters or regulation regions. ETS transcription factors

play an important role in a variety of biological processes, including cell proliferation, apoptosis, differentiation, angiogenesis and invasiveness [13].

TMPRSS2-ERG gene fusions are one of the most predominant genetic events in PCa [10, 12]. More than 20 TMPRSS2-ERG transcripts were described as result of alternative splicing or different recombination mechanisms (deletions, insertions or translocations) [10, 14]. The most common rearrangement, involving exons 1 of TMPRSS2 fused to exon 4 of ERG (T1E4), is present in 50% of PCa cases [10]. Transcriptomic studies have revealed that ERG overexpression in TMPRSS2-ERG-positive PCa cell lines leads to the deregulation of key genes for cell migration and invasiveness [15–17].

The prognostic implications of TMPRSS2-ERG gene fusion in PCa are still unclear. Since its discovery in 2005, a large number of studies have been published in this field. Some teams found a correlation between the presence of this fusion and poor prognosis [18–22], but several others report a correlation between the presence of this fusion and good prognosis [23–25] or no correlation at all [26–28]. Moreover, several studies have demonstrated the presence of TMPRSS2-ERG gene fusion, in most cases of metastatic PCa [29, 30], and that positive tumors have a greater proclivity for developing metastases. On the other hand, metastases arising from tumors without rearrangement were also found [31]. This discrepancy could come from clinical settings, the size of the patients' cohort, the difference in sample collection or conservation, but also from PCa heterogeneity, fusion variant or ethnical differences.

Understanding the mechanisms of bone metastasis formation remains a challenge to improve PCa prognosis and treatment. This research field is a challenging area to explore because of the difficulty in obtaining bone metastatic tissues from patients. Animal models then become essential tools in exploring the pathogenesis of PCa. However very few cell lines reflect tumor colonisation, quiescence and subsequent growth in the bone following injection in the circulation [32].

In this paper, we used a luciferase expressing cell lines derivatives from PC3M, PC3M-luc-C6 (PC3M-luc), in a mouse model in order to evaluate the consequences of TMPRSS2-ERG fusion on tumor development using dynamic monitoring with bioluminescence imaging (BLI). New PC3M-luc TMPRSS2-ERG cells stably expressing the fusion showed increased migration ability and a higher subcutaneous tumor development. Moreover, we demonstrated that the presence of TMPRSS2-ERG results in a greater number of tumors in bone after intracardiac injection. In particular, site-specific patterns of spread are influenced by more lesions at hind limbs and spine for fusion positive cells. Finally, the TMPRSS2-ERG positive tumors harbour more osteoblastic features compared to TMPRSS2-ERG negative tumors. Our work provides new elements in the knowledge of bone metastasis development in PCa.

RESULTS

TMPRSS2-ERG fusion increases migration in prostate cancer cell lines

In order to assess the role of TMPRSS2-ERG fusion in PCa development, we generated cell lines stably overexpressing the fusion using retroviral translocation from luciferase expressing cells PC3M-luc. The expression of ERG was confirmed by RT-qPCR and immunoblotting (Figure 1A). Equivalent luciferase activity for both cell lines (PC3M-luc Ctrl and PC3M-luc TMPRSS2-ERG) was also checked to eliminate a possible bias in the further bioluminescence measurements (Supplementary Figure S1). Previously, it has been shown by our team and others that no significant cell proliferation changes were observed in TMPRSS2-ERG PC3c cells compared with control cells, but that TMPRSS2-ERG promotes PC3c cell migration [15–17]. To assess this influence in PC3M-luc cell line, we performed proliferation and migration assays in the xCELLigence system. This instrument monitors cellular events in real time without exogenous labelling through impedance-based technology [33]. Compared with control PC3M-luc cells (Ctrl), TMPRSS2-ERG overexpressing PC3M-luc cells exhibit comparable proliferation profiles (Figure 1B, right panel). The histograms presented in the left panel of Figure 1B show rates of estimated cell proliferation similar to the mean slope of the cell growth curves for four independent experiments. We then evaluated the effect of TMPRSS2-ERG on the migration behavior of PC3M-luc prostate cancer cells. As usual, we performed the migration assays using foetal bovine serum (FBS) as a chemoattractant. Cell migration was measured every 15 min for approximately 24h. We found that the TMPRSS2-ERG cells migrate faster than the control cells (Figure 1C, left part). The rates of cell migration as the means of four independent experiments is presented in Figure 1C (right part). Our data confirmed previous observations [15–17] and thus demonstrate that TMPRSS2-ERG fusion also promotes cell migration in PC3M-luc.

TMPRSS2-ERG fusion increases subcutaneous tumor growth

The influence of TMPRSS2-ERG fusion on subcutaneous tumor growth has already been reported [14, 34, 35]. In an effort to characterize our new cell lines and to evaluate whether TMPRSS2-ERG could influence tumor development in an animal model system, we inoculated in PC3M-luc control or TMPRSS2-ERG cells the right flank of male SCID mice. Tumor development was monitored weekly by measuring bioluminescence with IVIS Lumina system (Figure 2A and Supplementary Figure S2). The growth rate was relatively rapid. Measurable tumors began to form 7 days after tumor cell inoculation in all the injected mice. At the end of the experiment, the presence

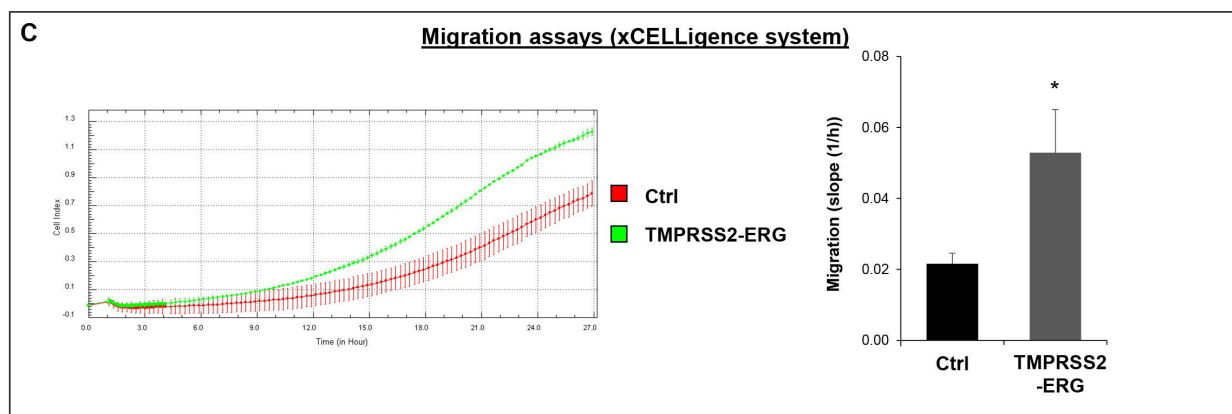
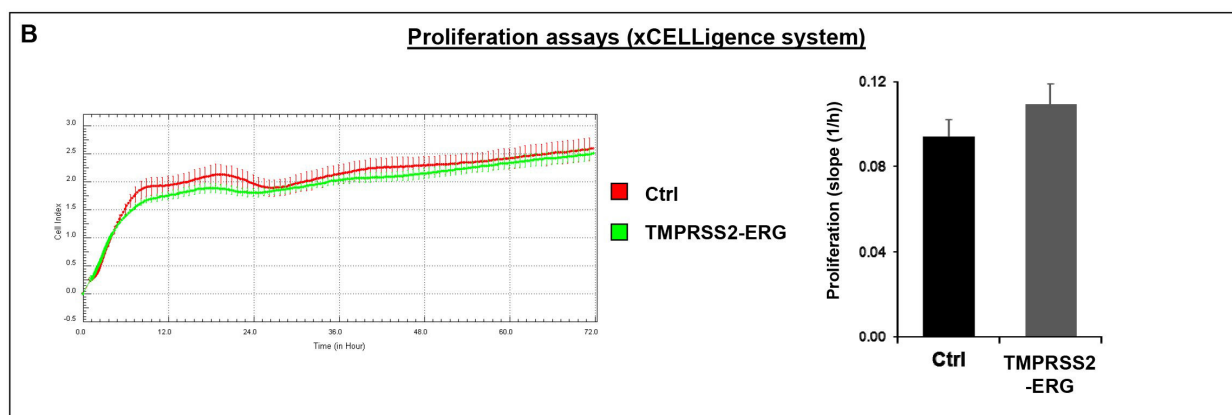
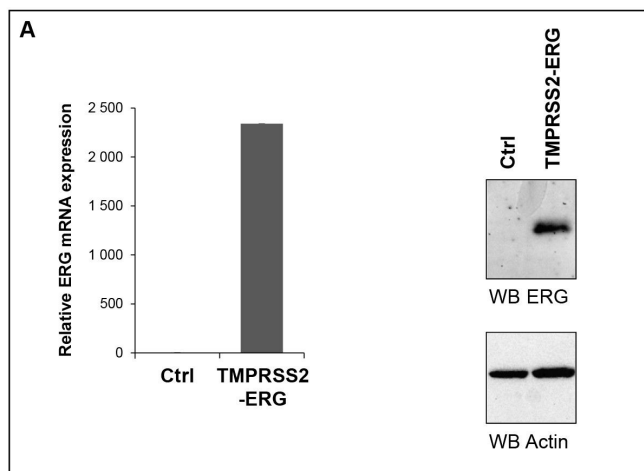


Figure 1: TMPRSS2-ERG fusion increases migration in prostate cancer cell line. **A.** ERG expression in PC3M-luc cell lines. Left panel: ERG expression was evaluated by RT-qPCR analysis. Transcript levels were measured following infection of PC3M-luc with pLPCX empty vector (Ctrl) or pLPCX TMPRSS2-ERG (TMPRSS2-ERG). Results are normalized with respect to endogenous control GAPDH. Immunoblot analysis of ERG protein levels in PC3M-luc Ctrl or TMPRSS2-ERG. Actin was used as a loading control. Primer used are available in Supplementary Table S1. **B.** Left panel: Representative cell index (mean \pm standard deviation) as a measure of PC3M-luc cell proliferation. Measurements were automatically collected by the RTCA DP analyser every 15 min for up to 3 days (n=2). Red: PC3M-luc cells infected with pLPCX empty vector (Ctrl); Green: PC3M-luc cells infected with pLPCX TMPRSS2-ERG vector (TMPRSS2-ERG). Right panel: Results of the cell proliferation assays represented as slopes (changes in cell index/hour) (n=4) (*= p<0,05). **C.** Left panel: Migration kinetics PC3M-luc cells assessed by continuous monitoring of live cell migration for approximately 24 hours. Red: PC3M-luc cells infected with pLPCX empty vector (Ctrl); Green: PC3M-luc cells infected with pLPCX TMPRSS2-ERG vector (TMPRSS2-ERG) (n=2). Right panel: Results of the cell migration assays represented as slopes (changes in cell index/hour) (n=4) (*= p<0,05).

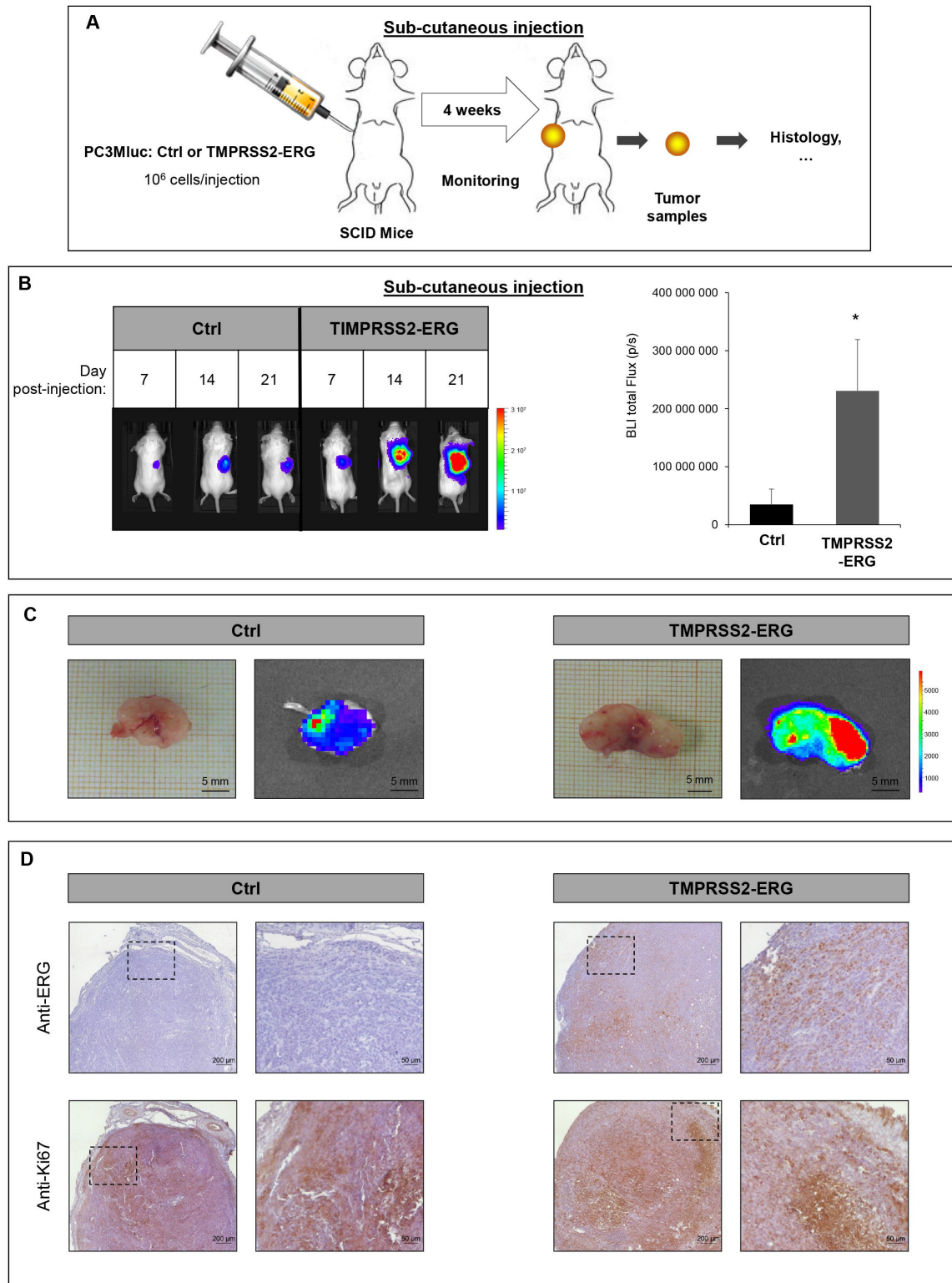


Figure 2: TMRSS2-ERG fusion increases subcutaneous tumor growth. **A.** Schematic representation of subcutaneous injection experiments. **B.** Bioluminescence imaging of SCID mice bearing PC3M-luc tumor cells (Ctrl or TMRSS2-ERG). Left panel: Representative pictures on the indicated days after subcutaneous injections. Luminescence is expressed in radiance (p/sec/cm²/sr) and represented by the color scale. Right panel: Quantitative analysis of the luciferase expression as a measure of tumor growth at the end of the experiment (day 24). Data represents the means of 6 mice in Ctrl group and 5 mice in TMRSS2-ERG group. * indicated p<0,05. **C.** Picture of excised (up) subcutaneous tumor at day 24 and bioluminescence (BLI, bottom) **D.** Histologic analysis of subcutaneous tumors with anti-ERG antibody (up) and anti-Ki67 antibody (bottom). Magnified insert are shown on the right.

of TMPRSS2-ERG fusion resulted in a luciferase signal six-fold higher than Ctrl cells (Figure 2B). Representative time course of tumor development in mice injected with Ctrl cells or TMPRSS2-ERG cells is presented in Figure 2B and Supplementary Figure S2. As can be seen from Figure 2C, subcutaneous tumors formed by TMPRSS2-ERG cells were much more bioluminescent than those formed by Ctrl cells. Confirmation of the TMPRSS2-ERG status was obtained on the tumor sample by immunohistochemistry with anti-ERG (Figure 2D). Using an anti-Ki67 antibody, we validated the high proliferation rate in both tumor groups (Figure 2D).

TMPRSS2-ERG fusion increases dissemination in bone mainly in hind limbs and the spine

Given that TMPRSS2-ERG increases both the migration *in vitro* and the subcutaneous tumor development, we then tested whether TMPRSS2-ERG could be taking part in the bone metastasis formation of prostate cancer cells *in vivo*. In this view, we used an experimental metastasis model involving intracardiac injections of PC3Mluc tumor cells in SCID mice. This approach mimics the haematogenous dissemination of cancer cells and allows the examination of the process of metastatic colonization at various sites. PC3M-luc Ctrl and TMPRSS2-ERG were injected in the left ventricle of male SCID mice aged of six weeks (Figure 3A and Supplementary Figure S3). The distribution of the cells in the whole body 30 minutes after injection, indicating successful injection, was apparent for 65% of the mice. Only animals with diffuse photon accumulations throughout the body were considered for further analysis. Then, images were taken twice per week to monitor the cell colonization. Mice were euthanized at day 24. These experiments were repeated twice and similar results were obtained. In total, 10 mice were used to inject PC3M-luc Ctrl cells and 9 mice with PC3M-luc TMPRSS2-ERG.

Tumor cell dissemination was rapidly detectable. Firstly, we observed a colonization of the nose and mandibles (from day 4, with high sensitivity detection). Luciferase was later detected in hind limbs and the spine (around day 14) (Figure 3B and Supplementary Figure S3). 24 days after injection 100% of both groups of mice had developed bone metastatic foci and whole body luminescent was comparable between the two groups (Supplementary Figure S3B). Nevertheless, the fusion status influences the total number of metastatic sites. Animals injected with TMPRSS2-ERG cells had 57% more bone metastases compared to the control group (Figure 3B) at the end of the experiment.

A more detailed examination revealed that TMPRSS2-ERG leads to a higher number of tumors in hind limbs and the spine (Figure 3C, 3D). Other sites, such as the mandible, nose or ribs were colonized in a similar way by both cell lines. Supplementary Figure S4 shows

the incidence of tumoral lesions per site for each mouse considered in our experiment. Macroscopic dissection and bioluminescence measurement analysis of metastatic sites confirmed luciferase detection corresponding to the presence of tumor cells (Figure 3C). Goldner coloration of the collected bone samples confirmed bone tumor localisation. A histological analysis with antibodies against ERG and Ki67 respectively confirmed the TMPRSS2-ERG status and the high rate of proliferation (Figure 3E and Supplementary Figure S5). As expected, the endothelial cells of small vessels show positive endogenous ERG and are indicated with arrows.

Altogether, these observations show that the fusion TMPRSS2-ERG plays an important role tumor cell dissemination into the bone, by increasing the incidence of bone metastases in hind limbs, in the spine and globally.

Although the clinical PCa bone metastases have the predominant osteoblastic phenotype, PCa cell lines induced mainly osteolytic lesions [36]. In order to characterize bone metastases, we compared the transcript levels of some osteoblast-specific markers (*OSTERIX* and *RUNX2*) and osteoclast-related markers (*RANK*) in PC3M-luc Ctrl or PC3M-luc TMPRSS2-ERG. Supplementary Figure S6A shows the expression levels in the spine sample of three different mice to account for inter-individual variability. These results suggest a deregulation of the bone metabolism in favour of an osteoblastic phenotype as indicated by the trend towards an increase in the expression of osteoblastic markers (*OSTERIX* and *RUNX2*) and a decrease in the expression of the osteoclastic key gene (*RANK*) (Supplementary Figure S6A). Samples were also assessed by histological analysis. In samples from mice injected with TMPRSS2-ERG cells, we noticed an increase in bone matrix as highlighted in Supplementary Figure S6B with arrows. Finally, we performed immunohistochemistry with an anti-RUNX2, which revealed more positive cells in bone samples from mice injected with TMPRSS2-ERG cells compared with Ctrl cells. To complete this histological study, we performed immunohistochemistry experiments on mouse bone lesions to detect the Cathepsin K expression, which is specific to osteoclasts. As shown in Supplementary Figure S6C, Cathepsin K was detected in both Ctrl and TMPRSS2:ERG bone lesions in a similar manner. This result suggests that, even though the fusion expression is associated with osteoblastic feature as revealed by the Goldner staining and the osteogenic Runx2 gene expression, the TMPRSS2:ERG expression does not decrease the osteoclasts number in this model.

TMPRSS2-ERG fusion expression deregulates genes involved in cell migration, adhesion and skeletal physiology

Since TMPRSS2-ERG fusion product correspond to a functional transcription factor, we speculated that its

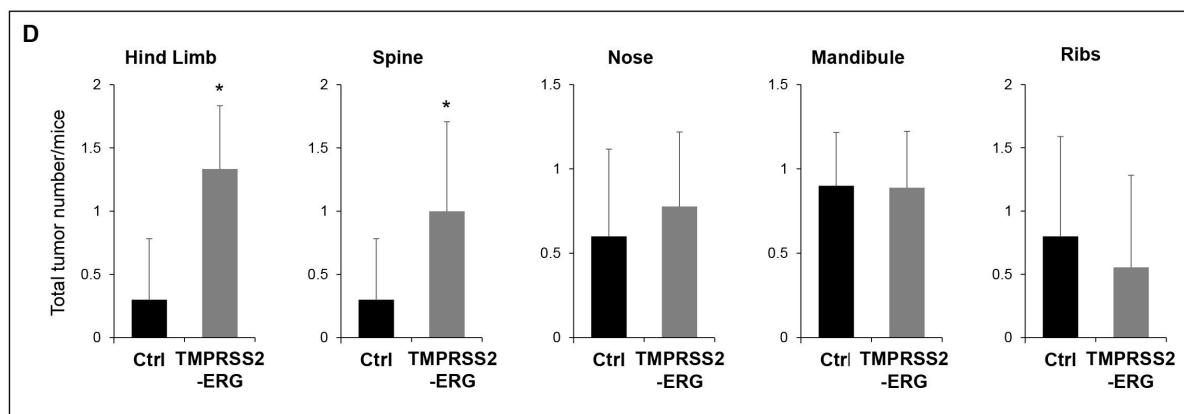
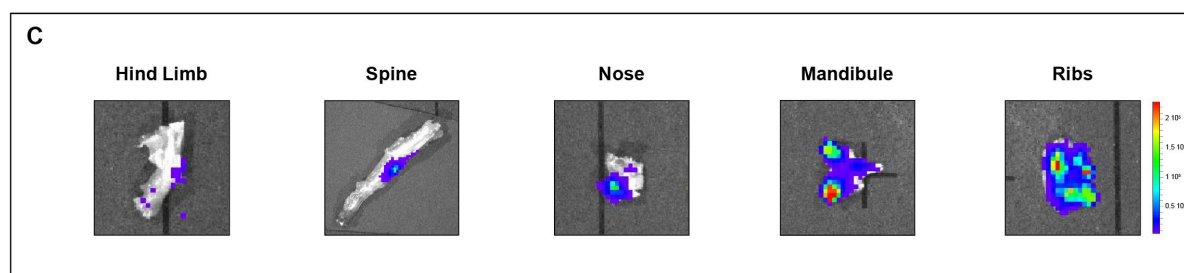
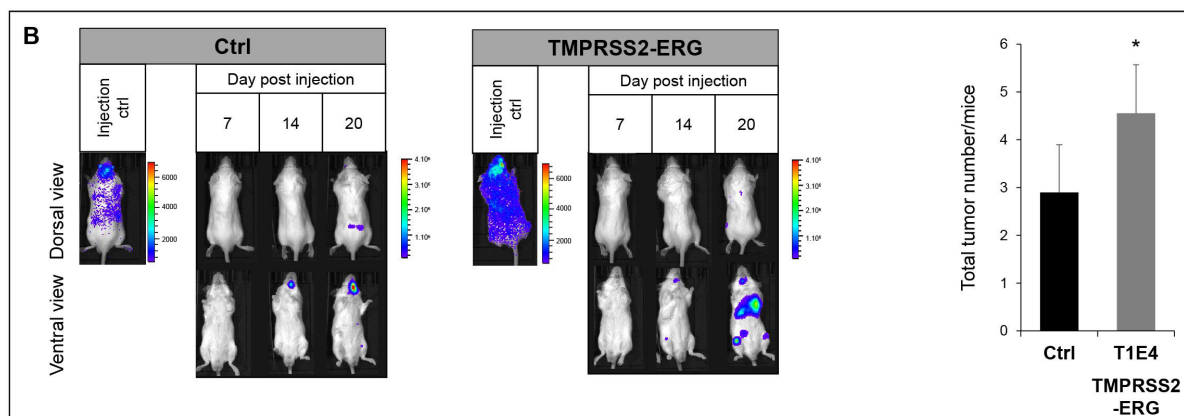
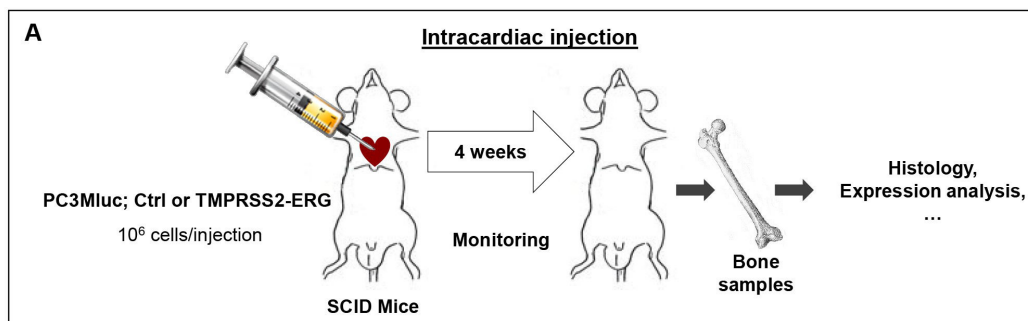


Figure 3: TMPRSS2-ERG fusion increases bone metastasis development. **A.** Schematic representation of intracardiac injection experiments. **B.** Bioluminescence imaging of SCID mice bearing PC3M-luc tumor cells (Ctrl or TMPRSS2-ERG). Left panel: Representative bioluminescence imaging of SCID mice on the indicated times after intracardiac injections. Right panel: Number of tumors per mice at indicated days after intracardiac injections. Data represents the mean of 10 mice in Ctrl group and 9 mice in TMPRSS2-ERG group. Luminescence is expressed in radiance (p/sec/cm²/sr) and represented by the color scale. * indicated p<0,05. **C.** *Ex vivo* detection of bone tumor by bioluminescence at day 24. Luminescence is expressed in radiance (p/sec/cm²/sr) and represented by the color scale. **D.** Number of tumors per mice in indicated organ sites at day 24 after intracardiac injections. Data represents the mean of 10 mice in Ctrl group and 9 mice in TMPRSS2-ERG group. * indicated p<0,05.

(Continued)

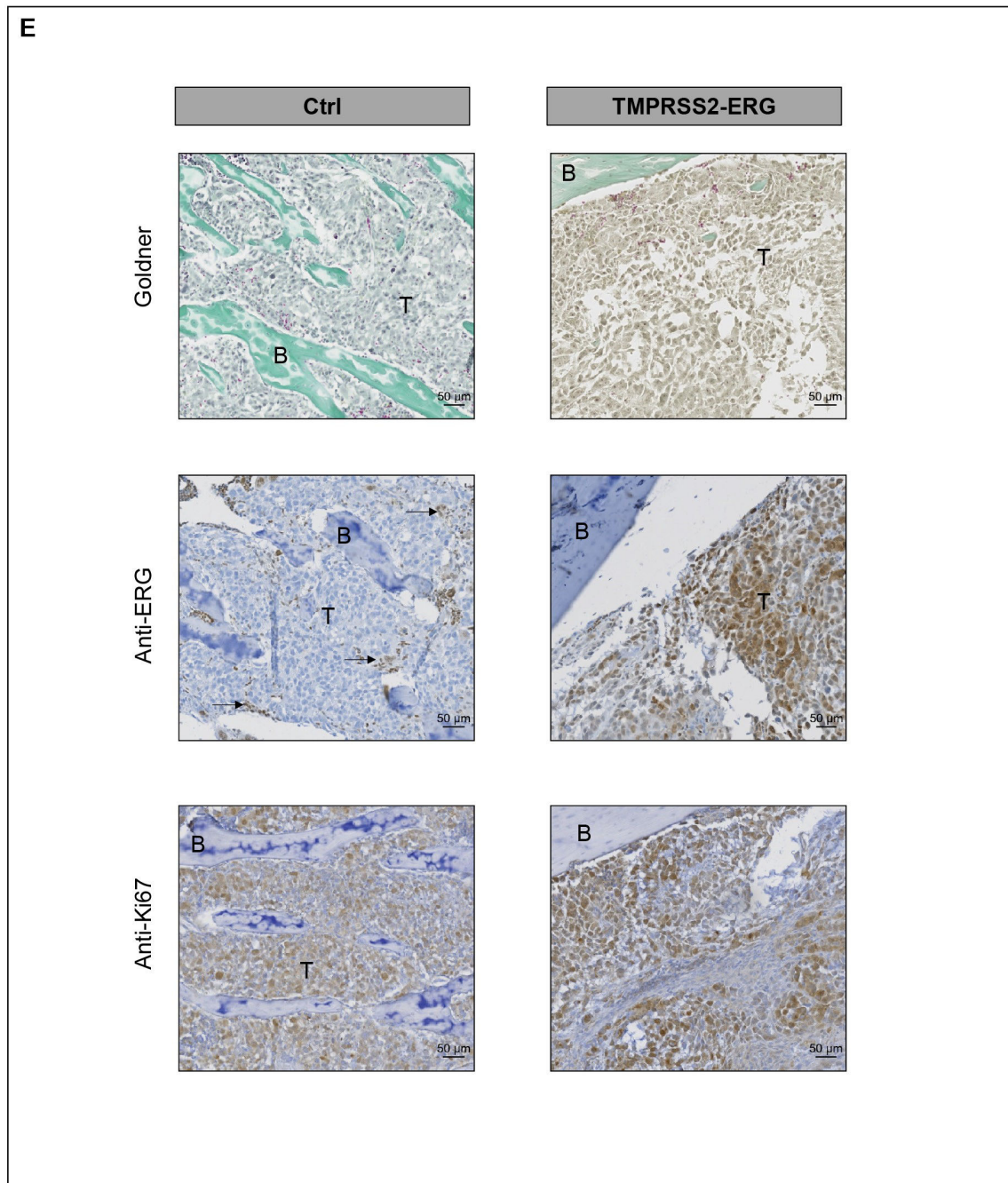


Figure 3 (Continued): E. Histologic analysis of bone tumors resulting from intracardiac injection of PC3M-luc Ctrl (left) or PC3M-luc TMPRSS2-ERG (right) by Goldner staining (top), with anti-ERG antibody (middle) and anti-Ki67 antibody (bottom). B=Bone, T= Tumor cells. Arrows indicate ERG positive vessels cells.

over-expression in PC3M-luc cells, induces differences in their transcriptome. To address the biological functions of TMPRSS2-ERG in bone metastasis formation, RNA sequencing was employed to compare the global gene expression of PC3M-luc TMPRSS2-ERG cells versus Ctrl cells (Figure 4, Supplementary Figure S7 and Supplementary Table S2-S6). Overall, the quality of the RNA-Seq data and read mapping in our current study met the requirements for the bioinformatic

analyses. Moreover, the expression levels of a set of genes in the corresponding clones were validated using qRT-PCR (Figure 4E). These data confirmed the RNA-seq results and showed the significantly up- and down-expression of the genes. In order to explore the gene function relevant to the *in vitro* and *in vivo* results obtained with the PC3M-luc TMPRSS2-ERG clones, GO analysis was conducted to group these differentially expressed genes into molecular and cellular functions,

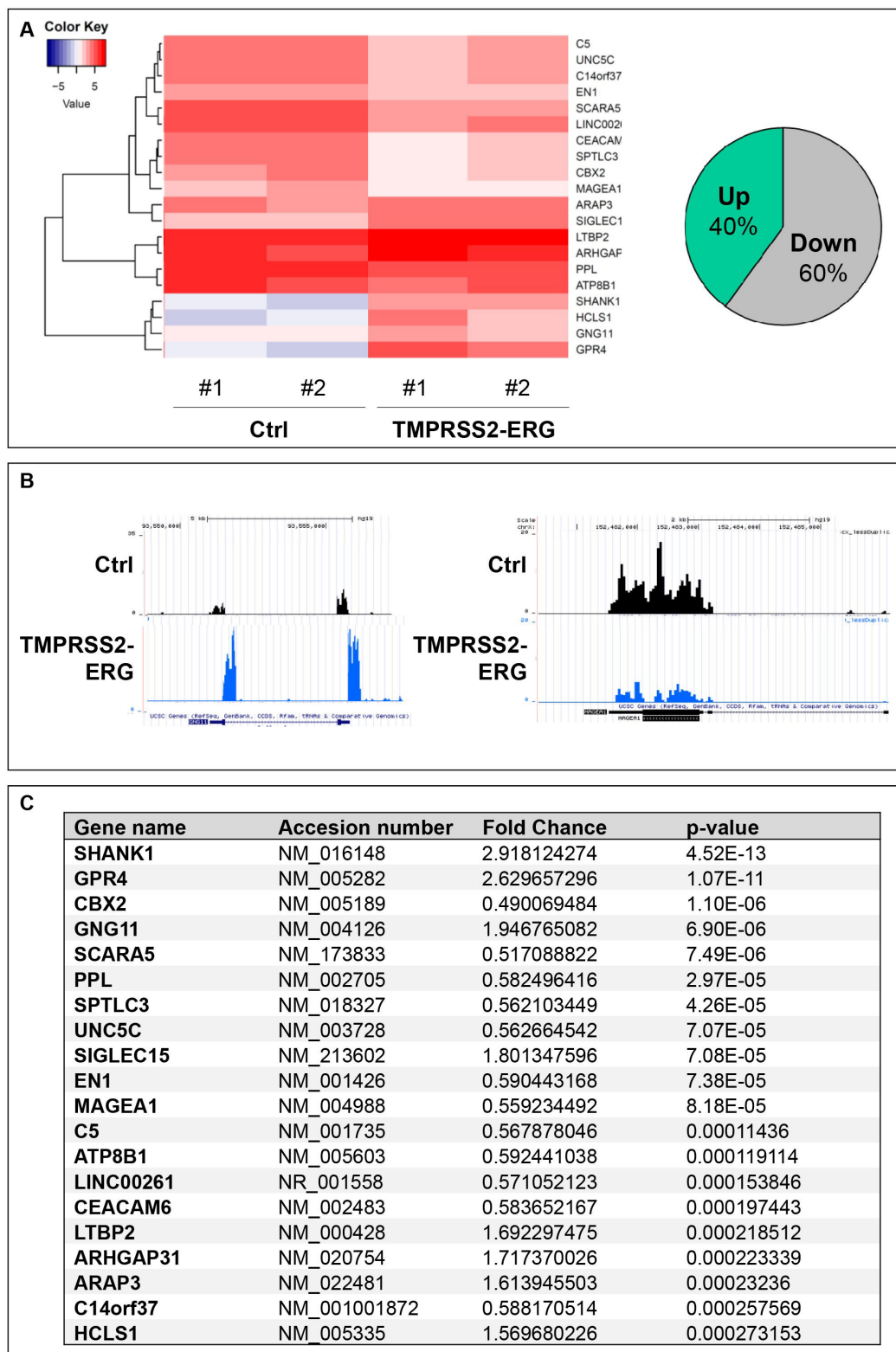


Figure 4: TMPRSS2-ERG fusion expression deregulates genes involved in cell migration, adhesion and skeletal physiology. **A.** RNA-sequencing analysis. Left panel, Heatmap showing top 20 of differentially expressed genes between PC3M-luc Ctrl and TMPRSS2-ERG cells. A technical duplicate was analysed for each sample (#1 and #2). The heatmap scale shows the range of expression level, whereby positive (red) and negative (blue) values correspond, respectively, to a higher and a lower expression. Right panel, pie chart showing the percentage of significantly (p value < 0.05) up and downregulated genes in TMPRSS2-ERG cells versus control cells. **B.** Examples of RNA-Seq peaks (UCSC tracks). **C.** Top 20 of significantly deregulated genes.

(Continued)

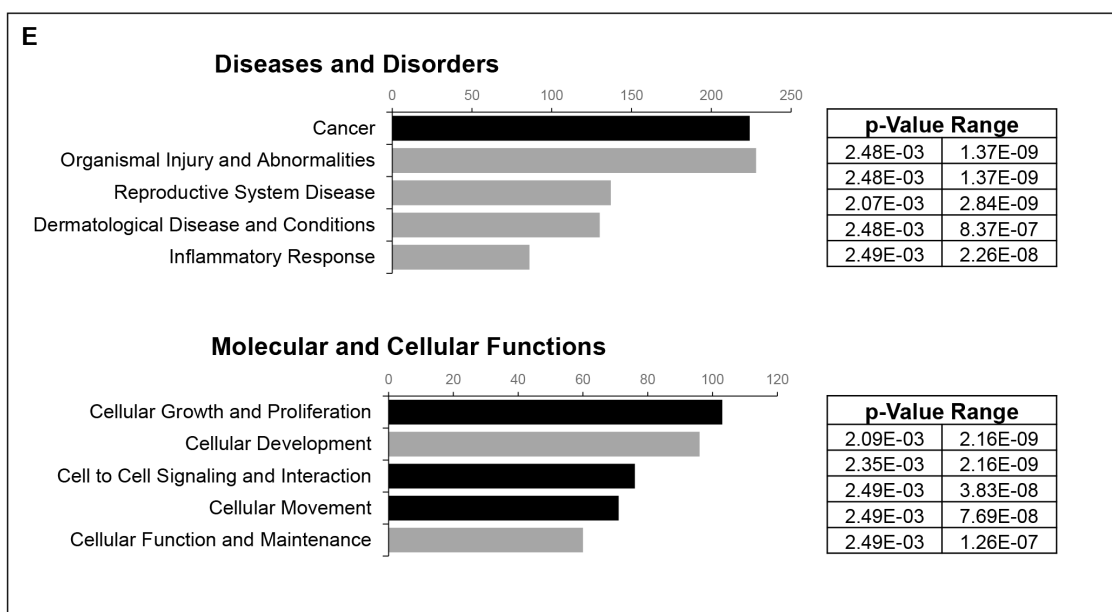
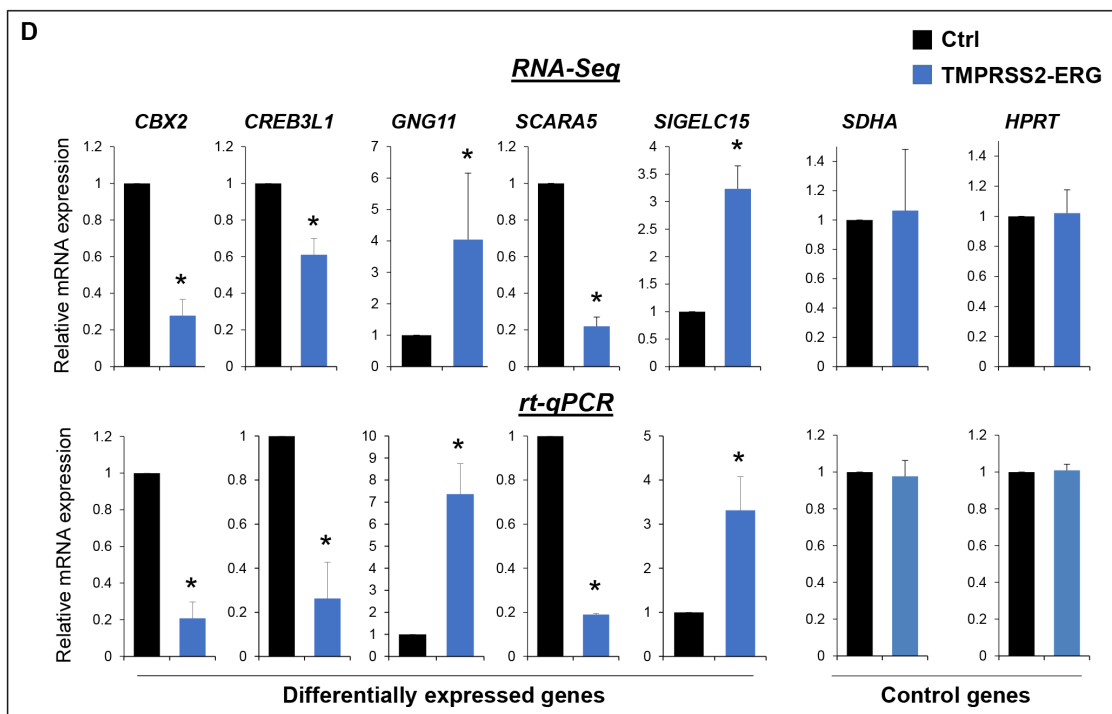


Figure 4 (Continued): D. Validation of expression changes observed in RNA-Seq by q-PCR. Results are normalized with respect to endogenous control GAPDH. E. Ingenuity pathway analysis (“Diseases and Disorders” and “Molecular and Cellular Function”) of the differentially expressed genes. The x axis represents the number of molecules per categories.

diseases and physiological system development and function (Figure 4E and supplementary Figure S7). In brief, GO analysis of genes showed that these genes are involved in cellular growth and proliferation, cell movement, tissue development, skeletal and muscular system development (Figure 4 and Supplementary Figure S7 and Table S2-5). Most of the identified genes are involved in cancer and metastasis (Supplementary

Table S2). More importantly, a large part of the deregulated genes are in the GO category “Connective tissues” (Supplementary Table S5) and involved in “Differentiation of bone cells” such as *CCL2*, *INHBA*, *ITGA5*, *NOS3*, *SIGLEC15*, *WNT7B* or in “Development of connective tissue” such as *CXCL11*, *ICAM1*, *INHBA*, *ITGA5*, *ITGB8*, *MMP13*, *PECAMI*, *PLA2G4A*, *WNT7A*, *WNT7B*. Interestingly, some

genes belong to the “Homing of cell” GO categories (20 genes), others to “Migration of cells” (60 genes) or to the “Extravasation” (6 genes) which is an important step of metastatic mechanism (Supplementary Table S3 and S4). In summary, over-expression of TMPRSS2-ERG was sufficient to modulate transcription of genes involved in cell migration/adhesion and mechanisms known to be associated with bone physiology. In particular, de-regulation of mRNAs whose gene products are involved in cancer and metastasis was observed.

DISCUSSION

PCa is a global public health problem, and in particular bone metastasis development which is responsible for main morbidity. Bone lesions are difficult to cure and are often synonym of fatal outcome. Therefore, there is an urgent need to develop therapeutic strategies that target advanced PCa and its interactions with the bone. A prerequisite for the development of new therapeutics is to improve our understanding of the fundamental mechanisms that regulate the metastatic process, including dormancy and growth of tumor cells in the bone. Previous studies failed to reach clear conclusions about the role of TMPRSS2-ERG in bone metastases. Finding good and relevant models is a real challenge in prostate cancer research. In this view, we developed PC3M-luc cells lines stably overexpressing the fusion TMPRSS2-ERG.

In this study, *in vitro* experiments showed that the TMPRSS2-ERG fusion increases cell migration. This result is in agreement with previous studies obtained with PC3 and other cell lines [15–17], confirming the validity of our PC3M-luc model. By way of subcutaneous injection, we clearly demonstrated that TMPRSS2-ERG overexpression leads to higher bioluminescent signal, which reflects the presence of more tumor cells. This last data, in addition to be in line with *in vitro* migration results, suggests that the fusion may be involved in microenvironment interactions enhancing tumor growth *in vivo*. Several previous studies have demonstrated the presence of the TMPRSS2-ERG gene fusion in the majority of metastatic PCa [29, 30, 37] and that the positive foci have a greater proclivity for metastases [29]. Nevertheless, others reported that the metastases may also arise from the tumor without ERG rearrangement [31]. Animal models are very useful tools to better understand mechanisms involved in PCa metastases. Here, we used intracardiac injections to evaluate whether the TMPRSS2-ERG fusion plays a role in tumor propagation to the bone. This technology imitates the propagation of cancer cells in blood circulation and is the method of choice to follow the homing of PCa cells in various tissues. Our work showed that PC3M-luc cells, expressing TMPRSS2-ERG, show a higher rate of colonization in bone compared to Ctrl cells. Crucially, this indicates a major involvement of the fusion in bone metastases, and therefore suggests that the

TMPRSS2-ERG fusion may play a role in bone tropism of PCa tumor cells.

Interestingly, anatomical sites presenting increased tumors are hind limbs and spine, which are two of the most affected tissues in human pathology [38, 39]. Metastatic PCa cells in the spine and hind limbs provide some of the worst symptoms of the disorder due to pathological fracture or epidural spinal cord compression [40]. The fact that these two bone lesion localisations reflect human pathologies demonstrates that the intracardiac injection of PC3M-luc cells are a good and relevant model to study PCa pathology.

It was suggested that osteotropism of PCa cells is a consequence of the development of a bone-like behavior. This theory, called osteomimicry, is the ability of cancer cells to express genes previously highly restricted to bone cells during and after metastasis in order to adapt and grow in the bone environment [3, 4, 41, 42]. We have shown here that TMPRSS2-ERG influences the transcription of bone master genes, suggesting that the fusion TMPRSS2-ERG may be a driver of osteomimicry. Moreover, TMPRSS2-ERG seems to destabilize the bone metabolism by increasing the transcript level of two osteoblastic genes, being *RUNX2* and *OSTERIX* [43, 44], and decreasing the expression of an osteoclastic gene, *RANK* [45]. However, using immunohistochemistry experiments on mouse bone lesions to detect Cathepsin K expression, which is specific to osteoclasts, we revealed that, compared to Ctrl tissue, osteoclast number was not decreased in TMPRSS2-ERG bone lesions. This result suggests that, even though the fusion expression is associated with osteoblastic feature as revealed by the Goldner staining and the osteogenic *RUNX2* gene expression (Supplementary Figure 6A-6B), the TMPRSS2-ERG expression does not decrease the osteoclast number in this model. In line with this results, Li *et al.* showed that osteoclastogenesis and bone resorption are mutually essential for prostate cancer establishment in the bone microenvironment [46]. Moreover, they demonstrated that *CCL2* (Monocyte chemoattractant protein 1) increased osteoclastic bone resorption to facilitate prostate cancer tumor growth in bone. Interestingly, as revealed by RNA-Seq analysis, *CCL2* gene is upregulated in PC3M-luc TMPRSS2-ERG clone compared with the Ctrl clones. In this respect, the TMPRSS2-ERG fusion seems to favour the development of osteoblastic lesions. Since ERG is a transcriptional factor which could act as an activator of transcription but also as a transcriptional repressor [47, 48], the effect of TMPRSS2-ERG on *RUNX2*, *OSTERIX*, *RANK* and *CCL2* expression, suggests that these genes could be potential ERG targets. Further studies should be performed to establish if these genes are directly bound by ERG factor.

Our results suggest that the TMPRSS2-ERG fusion may be a target to inhibit bone metastases. Further to our results, it would be interesting to assess if treatment with

ERG inhibitors could reduce the number of developed bone metastases. An inhibitor such as DB1255, which specifically targets the ERG DNA recognition sites [49] or ERG-specific siRNA [34] could be potential anti-metastatic compounds. Positive results could open new promising therapeutic possibilities to treat prostate cancer bone metastases.

In summary, our findings show that the TMPRSS2-ERG fusion play a role in PCa bone metastasis formation.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and retroviral infection

PC3M-luc-C6 cell line was purchased from Caliper (Perkin Elmer). PC3M-luc are derived from PC3 cell line, originally isolated from a bone metastasis of human prostatic adenocarcinoma [50] [51]. To produce highly metastatic cells, they were obtained after multiple selection cycles of orthotopic injection, after the subsequent isolation of metastatic cells and after orthotopic reinjection(s) [52].

Cells were grown in MEM (Life Technologies) medium containing 10% foetal bovine serum and glutamine (2mM final) under standard culture conditions. Retroviral infections to stably expressed the TMPRSS2-ERG fusion were realized as already described [15]. Briefly, 293 GP cells were transfected with pLPCX retroviral vectors. Supernatant were then collected and used to infect PC3M-luc-C6 target cells. For further experiments, we used a pool of several clones obtained by puromycin selection without clonal selection.

Cell proliferation and migration assays

To evaluate PCa cell proliferation, PC3M-luc-C6 cells infected with pLPCX empty vector (Ctrl) or pLPCX TMPRSS2-ERG were seeded into the xCELLigence E-plate 16 (Roche) (10000 cells/well) according to the manufacturer's instructions. Measurements were collected by the RTCA DP analyser for up to 3 days. Four replicate measurements per condition were obtained. The data were analysed with the provided RTCA software. To examine PCa cell migration, PC3M-luc-C6 cells Ctrl or TMPRSS2-ERG were seeded 24 h post-transfection into the xCELLigence CIM-plate 16 (Roche). Briefly, a 165- μ l volume of fresh medium containing 10% FBS (chemoattractant) or with serum-free medium (control) was added to the lower chambers of the CIM-plate 16. The upper chambers were filled with serum-free medium (30 μ l/well) and the plate was incubated at 37°C in 5% CO₂ for 1 h. Cells (60000 cells/well) were then added to each well of the upper chamber. After 30 min, the CIM plate was assembled onto the RTCA DP analyser and cell migration was assessed at 20 h at 37°C in 5% CO₂. Four

replicate measurements per condition were obtained. The data were analysed with the provided RTCA software.

Animal tumor models

All animal experiments were approved by the local ethics committee (CSTMT-042). Six to eight week old male SCID mice were used. PC3M-luc-C6 (3.10⁶) suspended in 200 μ l of PBS were implanted subcutaneously in the flank region of SCID mice. For intracardiac injections, mice were maintained under isoflurane anaesthesia during injection procedure. PC3M-luc-C6 (10⁶) were suspended in 200 μ l of PBS and were injected into the left ventricle using a29-G needle. Bioluminescence imaging was performed 30 minutes after intracardiac injection. Only animals with diffuse photon accumulations throughout the body of the animal were considered for further analysis. Animals were monitored for 4 weeks after injection.

Bioluminescence imaging

Mice were injected subcutaneously with D-luciferin (15 mg/ml in sterile PBS, Perkin Elmer) 10 min before being imaged. The mice were anesthetized with 2% isoflurane and were imaged in dorsal and/or ventral position using an IVIS Lumina System (Caliper) to monitor the tumor growth and metastatic dissemination. A bioluminescent image was obtained with a 12.5 cm field of view, a binning factor of 8, and a 1/f stop-and-open filter. Regions of interest were defined manually, and signal intensities were calculated with Living Image software (Caliper) and expressed as photons per second. Background photon flux was defined from a region of interest drawn over a control.

RNA-sequencing

The total RNA was purified by RNeasy kit (Qiagen) from two distinct infections (#1 and #2) of PC3M-luc ctrl and TMPRSS2-ERG was used to perform RNA sequencing. Construction of the library was done with 1 μ g of total RNA and Tru-seq stranded mRNA sample preparation kit (Illumina) according manufacturer's instructions. The reads were aligned to the hg19 reference assembly using RNA-STAR [53]. Counting reads were mapped to genes with HTSeq-count under the union-intersection mode on refSeq hg19 transcriptome annotations. PCR duplicates were filtered. A gene was considered differentially expressed at transcript level when unpaired t-test P-value <0.05.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was tested for using an unpaired Student's

t-test. $p < 0.05$ was considered to be significant and is indicated as *.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tian V. Tian, Edith Bonnelye and Olivier Morales for help and advices in mouse experiments. We thank the Microscopy-Imaging-Cytometry Facility of the BioImaging Center Lille Nord-de-France for access to instruments and technical advice. We thank also Francois Fuks for his helpful advices in manuscript redaction. This work was supported by grants from the Centre national de la recherche scientifique (CNRS), La Ligue contre le Cancer (Comité du Pas-de-Calais) and the Institut national du cancer (INCa_4419). CD is a recipient of Ph.D. fellowships from the Institut Pasteur of Lille/Nord-Pas-de-Calais Regional Council (Région Nord-Pas-de Calais) and the FRM (Fondation pour la Recherche Médicale).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *60*:277–300.
2. Sturge J, Caley MP, Waxman J. Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;*8*:357–68.
3. Croucher PI, McDonald MM, Martin TJ. Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. *Nat Rev Cancer*. 2016 May *25*;16:373–86.
4. Kan C, Vargas G, Pape F, Clézardin P. Cancer Cell Colonisation in the Bone Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct *4*;17:1674.
5. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;*2*:584–93.
6. Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jun;*11*:411–25.
7. Logothetis CJ, Lin S-H. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan;*5*:21–8.
8. Seibel MJ. Clinical use of markers of bone turnover in metastatic bone disease. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005 Oct;*2*:504–17.
9. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;*7*:233–45.
10. Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Sep *29*;29:3659–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859993>
11. Roudier MP, Morrissey C, True LD, Higano CS, Vessella RL, Ott SM. Histopathological assessment of prostate cancer bone osteoblastic metastases. *J Urol*. Elsevier; 2008 Sep *9*;180:1154–60.
12. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005 Oct *28*;310:644–8.
13. Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annu Rev Biochem*. 2011 Jan;*80*:437–71.
14. Wang J, Cai Y, Yu W, Ren C, Spencer DM, Ittmann M. Pleiotropic biological activities of alternatively spliced TMPRSS2/ERG fusion gene transcripts. *Cancer Res*. 2008 Oct *15*;68:8516–24.
15. Tian T V, Tomavo N, Huot L, Flourens A, Bonnelye E, Flajollet S, Hot D, Leroy X, Launoit Y De, de Launoit Y, Duterque-Coquillaud M. Identification of novel TMPRSS2:ERG mechanisms in prostate cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2. *Oncogene*; 2014 Apr *24*;33:2204–14.
16. Kim J, Wu L, Zhao JC, Jin H-J, Yu J. TMPRSS2-ERG gene fusions induce prostate tumorigenesis by modulating microRNA miR-200c. *Oncogene*. 2014 Oct *30*;33:5183–92.
17. Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, Alimonti A, Nardella C, Varmeh S, Scardino PT, Cordon-Cardo C, Gerald W, Pandolfi PP. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet*. 2009 May;*41*:619–24.
18. Perner S, Demichelis F, Beroukhir R, Schmidt FH, Mosquera J-M, Setlur S, Tchinda J, Tomlins SA, Hofer MD, Pienta KG, Kuefer R, Vessella R, Sun X-W, Meyerson M, Lee C, Sellers WR, Chinnaiyan AM, Rubin MA. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res*. 2006 Sep *1*;66:8337–41.
19. Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2006 Sep *1*;66:8347–51.
20. Demichelis F, Fall K, Perner S, Andrén O, Schmidt F, Setlur SR, Hoshida Y, Mosquera J-M, Pawitan Y, Lee C, Adami H-O, Mucci LA, Kantoff PW, Andersson S-O, Chinnaiyan AM, Johansson J-E, Rubin MA. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*. 2007 Jul *5*;26:4596–9.
21. Yoshimoto M, Joshua AM, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Ludkovski O, Zielenska M, Soares FA, Squire JA. Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Mod Pathol*. 2008 Dec;*21*:1451–60.

22. Attard G, Clark J, Ambroisine L, Fisher G, Kovacs G, Flohr P, Berney D, Foster CS, Fletcher A, Gerald WL, Moller H, Reuter V, De Bono JS, Scardino P, Cuzick J, Cooper CS. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene*. 2008 Jan 10;27:253–63.
23. Boormans JL, Porkka K, Visakorpi T, Trapman J. Confirmation of the association of TMPRSS2(exon 0):ERG expression and a favorable prognosis of primary prostate cancer. *Eur Urol*. 2011 Jul;60:183–4.
24. Saramäki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TLJ, Visakorpi T. TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res*. 2008 Jun 1;14:3395–400.
25. Hermans KG, Boormans JL, Gasi D, van Leenders GJHL, Jenster G, Verhagen PCMS, Trapman J. Overexpression of prostate-specific TMPRSS2(exon 0)-ERG fusion transcripts corresponds with favorable prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 15;15:6398–403.
26. Toubaji A, Albadine R, Meeker AK, Isaacs WB, Lotan T, Haffner MC, Chaux A, Epstein JI, Han M, Walsh PC, Partin AW, De Marzo AM, Platz EA, Netto GJ. Increased gene copy number of ERG on chromosome 21 but not TMPRSS2-ERG fusion predicts outcome in prostatic adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2011 Nov;24:1511–20.
27. Mao X, Yu Y, Boyd LK, Ren G, Lin D, Chaplin T, Kudahetti SC, Stankiewicz E, Xue L, Beltran L, Gupta M, Oliver RTD, Lemoine NR, Berney DM, Young BD, Lu Y-J. Distinct Genomic Alterations in Prostate Cancers in Chinese and Western Populations Suggest Alternative Pathways of Prostate Carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010 Jul 1;70:5207–12.
28. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Tennstedt P, Müller J, Scholz L, Brase JC, Liu AY, Schlüter H, Pantel K, Schumacher U, Bokemeyer C, Steuber T, Graefen M, Sauter G, Schlomm T. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res*. 2011 Sep 15;17:5878–88.
29. Perner S, Svensson MA, Hossain RR, Day JR, Groskopf J, Slaughter RC, Jarleborn AR, Hofer MD, Kuefer R, Demichelis F, Rickman DS, Rubin MA. ERG rearrangement metastasis patterns in locally advanced prostate cancer. *Urology*. 2010 Apr;75:762–7.
30. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AHM, Vickers E, A'Hern R, Levink R, Coumans F, Moreira J, Riisnaes R, Oommen NB, Hawche G, Jameson C, Thompson E, Sipkema R, Carden CP, Parker C, Deamaley D, Kaye SB, Cooper CS, Molina A, Cox ME, Terstappen LWMM, de Bono JS. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69:2912–8.
31. Guo CC, Wang Y, Xiao L, Troncso P, Czerniak BA. The relationship of TMPRSS2-ERG gene fusion between primary and metastatic prostate cancers. *Hum Pathol*. 2012 May;43:644–9.
32. Ottewell PD, Wang N, Meek J, Fowles CA, Croucher PI, Eaton CL, Holen I. Castration-induced bone loss triggers growth of disseminated prostate cancer cells in bone. *Endocr Relat Cancer*. 2014 Oct;21:769–81.
33. Mestdagh P, Bostrom AK, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, von Stedingk K, Ghesquiere B, Schulte S, Dews M, Thomas-Tikhonenko A, Schulte JH, Zollo M, Schramm A, Gevaert K, Axelson H, Speleman F, Vandesompele J. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma. *Mol Cell*. 2010/12/15. 2011;40:762–73.
34. Shao L, Tekedereli I, Wang J, Yuca E, Tsang S, Sood A, Lopez-Berestein G, Ozpolat B, Ittmann M. Highly specific targeting of the TMPRSS2/ERG fusion gene using liposomal nanovectors. *Clin Cancer Res*. 2012 Dec 15;18:6648–57.
35. Shao L, Zhou Z, Cai Y, Castro P, Dakhov O, Shi P, Bai Y, Ji H, Shen W, Wang J. Celestrol suppresses tumor cell growth through targeting an AR-ERG-NF-κB pathway in TMPRSS2/ERG fusion gene expressing prostate cancer. *PLoS One*. 2013 Jan;8:e58391.
36. Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res*. 2005 Sep 1;65:7554–60.
37. Mehra R, Tomlins SA, Yu J, Cao X, Wang L, Menon A, Rubin MA, Pienta KJ, Shah RB, Chinnaiyan AM. Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 May 15 ;68:3584–90.
38. Ulmert D, Kaboteh R, Fox JJ, Savage C, Evans MJ, Lilja H, Abrahamsson P-A, Björk T, Gerdtsson A, Bjartell A, Gjtsson P, Höglund P, Lomsky M, Ohlsson M, Richter J, Sadik M, Morris MJ, Scher HI, Sjöstrand K, Yu A, Suurküla M, Edenbrandt L, Larson SM. A novel automated platform for quantifying the extent of skeletal tumour involvement in prostate cancer patients using the Bone Scan Index. *Eur Urol*. 2012 Jul;62:78–84.
39. Kakhki VRD, Anvari K, Sadeghi R, Mahmoudian A-S, Torabian-Kakhki M. Pattern and distribution of bone metastases in common malignant tumors. *Nucl Med Rev Cent East Eur*. 2013 Jan;16:66–9.
40. Dushyanthen S, Cossigny DAF, Quan GMY. The osteoblastic and osteoclastic interactions in spinal metastases secondary to prostate cancer. *Cancer Growth Metastasis*. 2013 Jan;6:61–80. Available from:
41. Koenenman KS, Yeung F, Chung LW. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. *Prostate*. 1999 Jun 1;39:246–61.
42. Clezardin P, Teti A. Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis*. 2007 Jan;24:599–608.

43. Pratap J, Lian JB, Javed A, Barnes GL, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Dec;25:589–600.
44. Akech J, Wixted JJ, Bedard K, van der Deen M, Hussain S, Guise TA, van Wijnen AJ, Stein JL, Languino LR, Altieri DC, Pratap J, Keller E, Stein GS, Lian JB. Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene.* 2010 Feb 11;29:811–21.
45. Walsh M, Choi Y. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. - PubMed - NCBI. *Front immunol.* 2014. p. 1–11.
46. Li X, Loberg R, Liao J, Ying C, Snyder LA, Pienta KJ, McCauley LK. A Destructive Cascade Mediated by CCL2 Facilitates Prostate Cancer Growth in Bone. *Cancer Res.* 2009 Feb 3;69:1685–92.
47. Yuan L, Le Bras A, Sacharidou A, Itagaki K, Zhan Y, Kondo M, Carman C V, Davis GE, Aird WC, Oettgen P. ETS-related gene (ERG) controls endothelial cell permeability via transcriptional regulation of the claudin 5 (CLDN5) gene. *J Biol Chem.* 2012 Mar 24;287:6582–91.
48. Siddique HR, Rao VN, Lee L, Reddy ES. Characterization of the DNA binding and transcriptional activation domains of the erg protein. *Oncogene.* 1993 Jul;8:1751–5.
49. Nhili R, Peixoto P, Depauw S, Flajollet S, Dezitter X, Munde MM, Ismail MA, Kumar A, Farahat AA, Stephens CE, Duterque-Coquillaud M, David Wilson W, Boykin DW, David-Cordonnier M-H. Targeting the DNA-binding activity of the human ERG transcription factor using new heterocyclic dithiophene diamidines. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 7;41:125–38.
50. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979 Jul;17:16–23.
51. Singh AS, Figg WD. In vivo models of prostate cancer metastasis to bone. *J Urol.* 2005 Sep;174:820–6.
52. Pettaway CA, Pathak S, Greene G, Ramirez E, Wilson MR, Killion JJ, Fidler IJ. Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. *Clin Cancer Res.* 1996 Sep;2:1627–36.
53. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013 Jan 1;29:15–21.

TMPRSS2-ERG fusion promotes prostate cancer metastases in bone

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

RNA purification and quantitative real-time PCR assays

Extraction of total RNA was carried out with the TriPure reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions. DNase treatment was performed with a DNA-free DNase kit (Ambion) according to the manufacturer's protocol. Quantitative PCRs were performed using SYBR Green dye (Eurogentec) on a LightCycler 480 (Roche). Briefly, cDNA was reverse transcribed from 1 µg of RNA using random hexamers (Invitrogen) and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). To quantitatively evaluate gene expression levels, real-time PCRs were performed. The primer sequences are described in Supplementary Table S1. GAPDH was amplified as an internal control. In Figure 4A, total RNA was extracted for spine tumors of mice injected in left ventricle with PC3M-luc ctrl or TMPRSS2-ERG cells. Primer used are specific of human template. Data are shown as mean of duplicates for each mice.

Cell extracts, immunoprecipitations and western blot analyses

Whole-cell extracts were prepared using IPH lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% NP40). All procedures were performed at 4°C. Standard procedures were used for Western blotting [15]. Primary antibodies used in these experiments were anti-ERG (ab92513, Abcam) and anti-Actin (A5316, Sigma).

Cell proliferation and migration assays

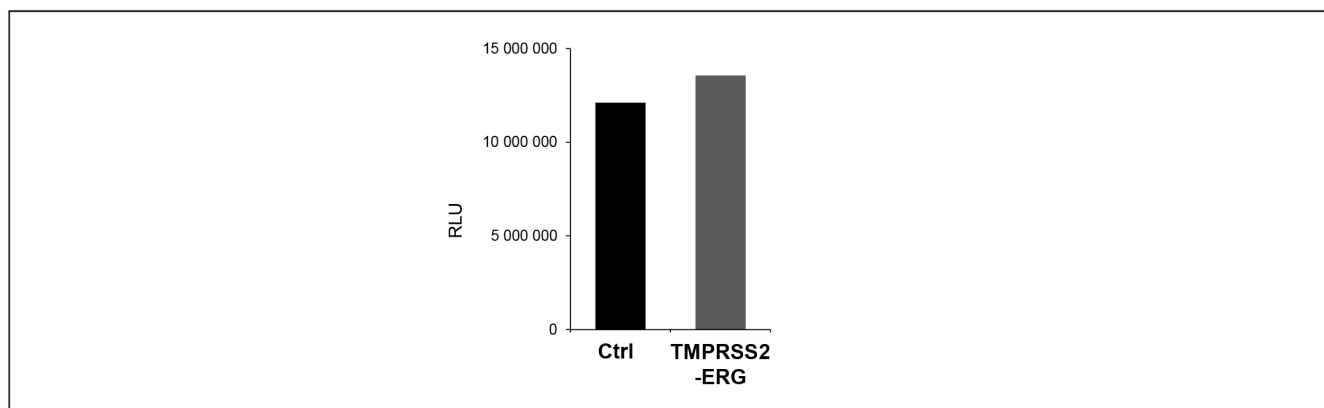
To evaluate PCa cell proliferation, PC3M-luc-C6 cells infected with pLPCX empty vector (Ctrl) or pLPCX

TMPRSS2-ERG were seeded into the xCELLigence E-plate 16 (Roche) (10000 cells/well) according to the manufacturer's instructions. Measurements were collected by the RTCA DP analyser for up to 3 days. Four replicate measurements per condition were obtained. The data were analysed with the provided RTCA software. To examine PCa cell migration, PC3M-luc-C6 cells Ctrl or TMPRSS2-ERG were seeded 24 h post-transfection into the xCELLigence CIM-plate 16 (Roche). Briefly, a 165-µl volume of fresh medium containing 10% FBS (chemoattractant) or with serum-free medium (control) was added to the lower chambers of the CIM-plate 16. The upper chambers were filled with serum-free medium (30 µl/well) and the plate was incubated at 37°C in 5% CO₂ for 1 h. Cells (60000 cells/well) were then added to each well of the upper chamber. After 30 min, the CIM plate was assembled onto the RTCA DP analyser and cell migration was assessed at 20 h at 37°C in 5% CO₂. Four replicate measurements per condition were obtained. The data were analysed with the provided RTCA software.

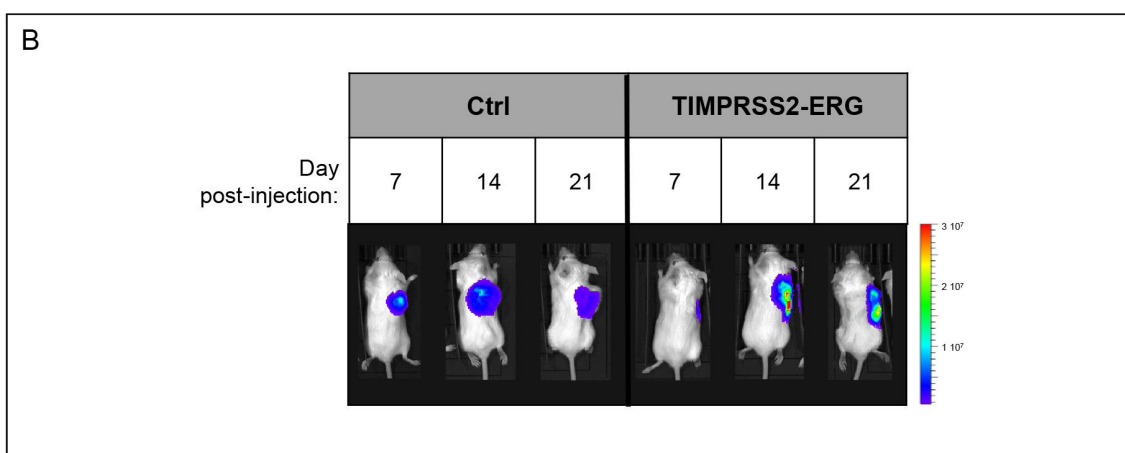
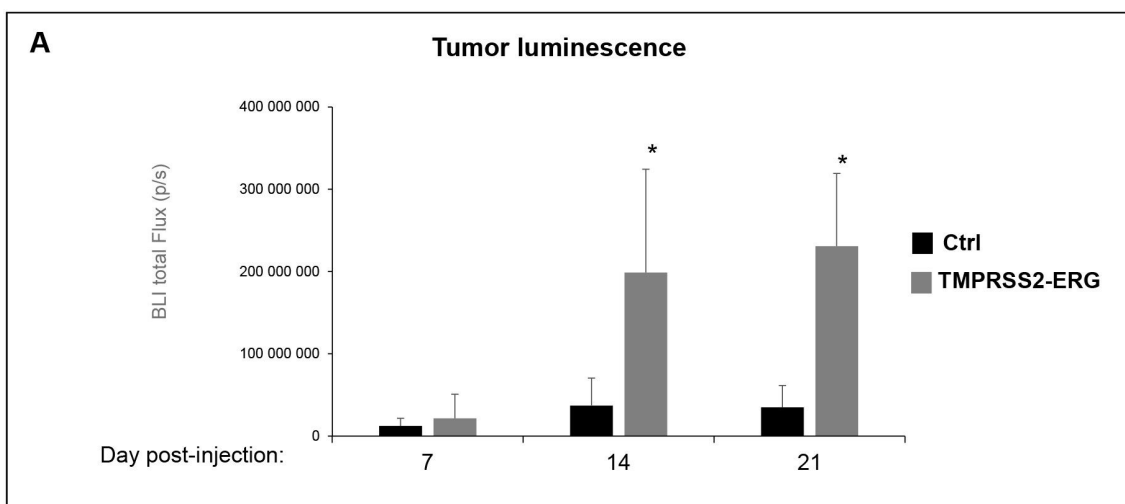
Staining and immunohistochemistry

After imaging, the samples were fixed with paraformaldehyde (4%). Bones were decalcified with Osteosoft (Merk) according manufacturer's recommendations. All sample were embedded in paraffin after tissue processing (dehydration, clearance and impregnation). Serial 7-µm paraffin sections were processed and routinely stained with Goldner trichrome. For immunohistochemistry, anti-ERG (ab92513, Abcam) was used at a concentration 1/100, anti-Ki67 (ab15580, Abcam) at 1/200, anti-Runx2 (sc 10758, Santa Cruz) at 1/100.

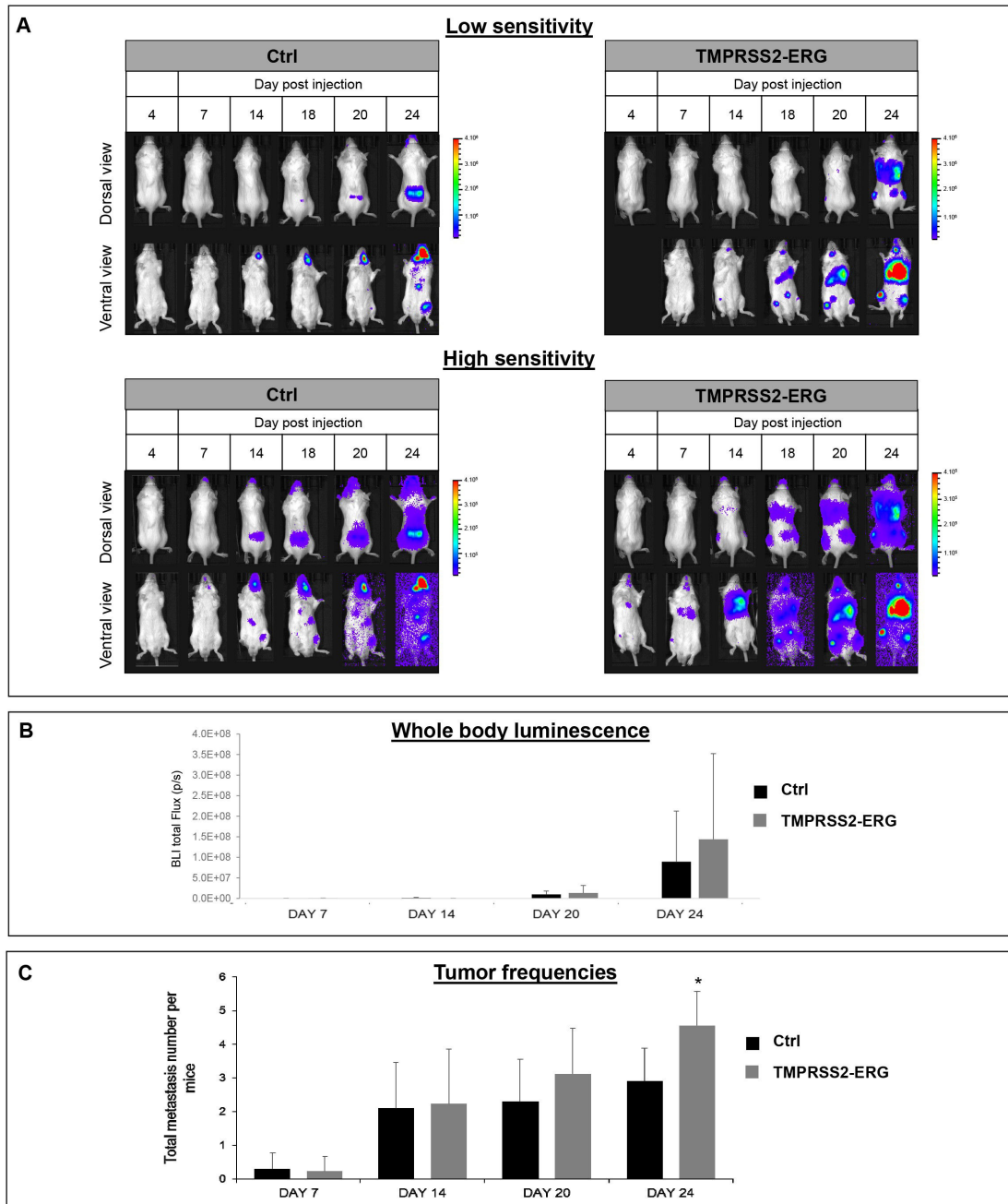
SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLES



Supplementary Figure S1 (related to Figure 1): Luciferase activity for PC3M-luc Ctrl and PC3M-luc TMPRSS2-**ERG**. Representative data are shown.



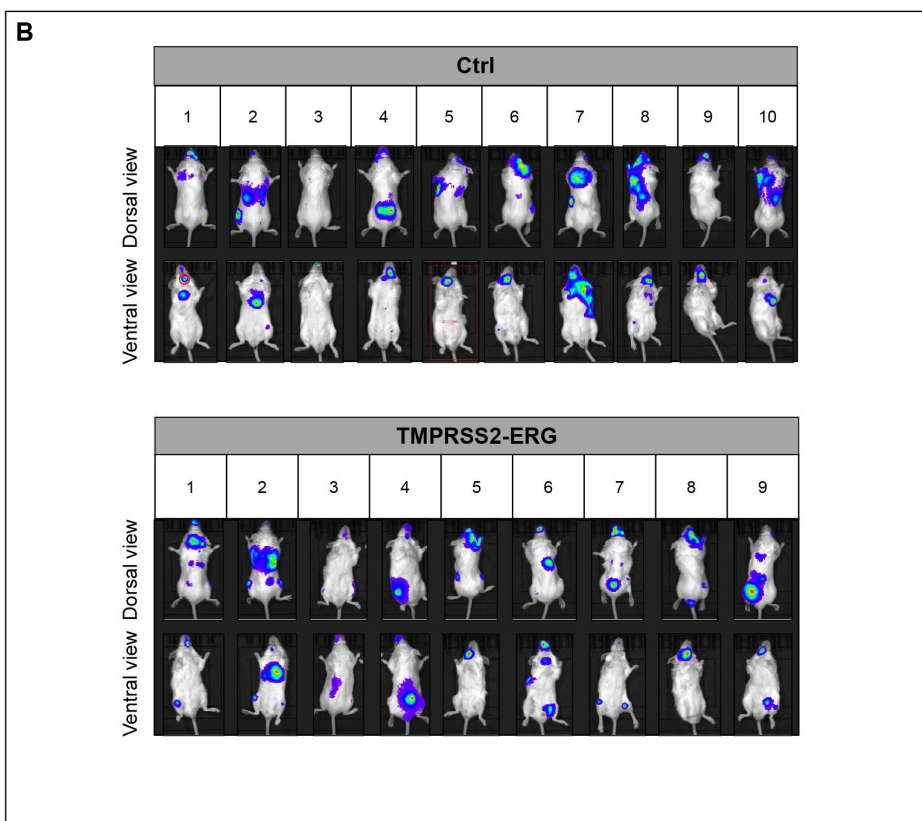
Supplementary Figure S2 (related to Figure 2): **A.** Bioluminescence imaging of SCID mice bearing PC3M-luc tumor cells (Ctrl or Tmprss2-ERG). Quantitative analysis of the luciferase expression as a measure of tumor growth at indicated time. Data represents the means of 6 mice in Ctrl group and 5 mice in Tmprss2-ERG group. * indicated $p < 0,05$. **B.** Additional example of bioluminescence imaging of SCID mice bearing PC3M-luc cells (Ctrl or Tmprss2-ERG). Luminescence is expressed in radiance (p/sec/cm²/sr) and represented by the color scale.



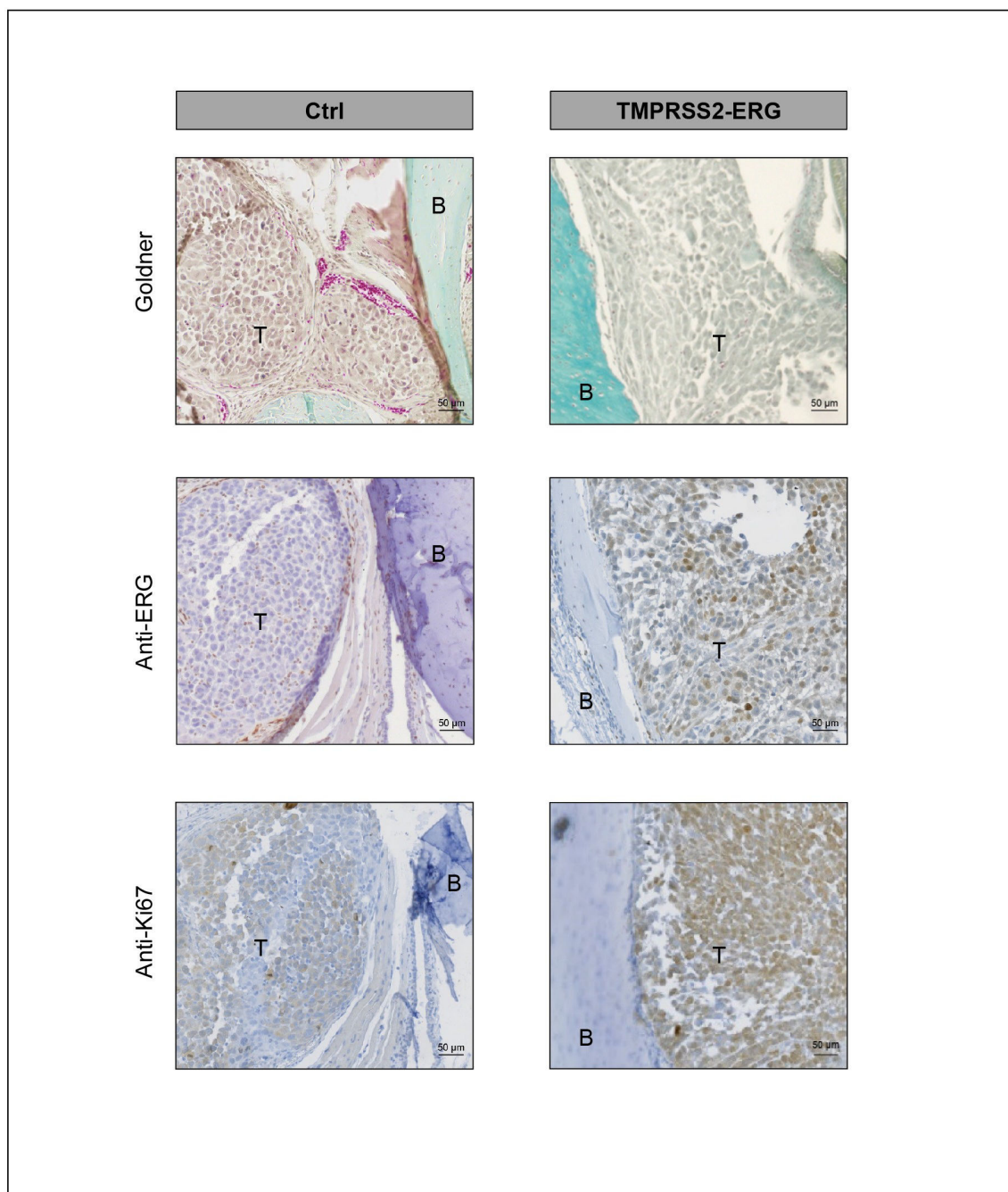
Supplementary Figure S3 (related to Figure 3B): **A**. Representative bioluminescence imaging of SCID mice bearing PC3M-luc tumor cells (Ctrl or TMPRSS2-ERG) at the indicated times after intracardiac injections with low or high sensitivity detection parameters (top and bottom, respectively). Luminescence is expressed in radiance (p/sec/cm²/sr) and represented by the color scale. **B**. Whole body luminescence of mice after intracardiac injections at indicated time. **C**. Number of tumors per mice at indicated days after intracardiac injections. Data represents the mean of 10 mice in Ctrl group and 9 mice in TMPRSS2-ERG group. * indicated p<0,05.

A

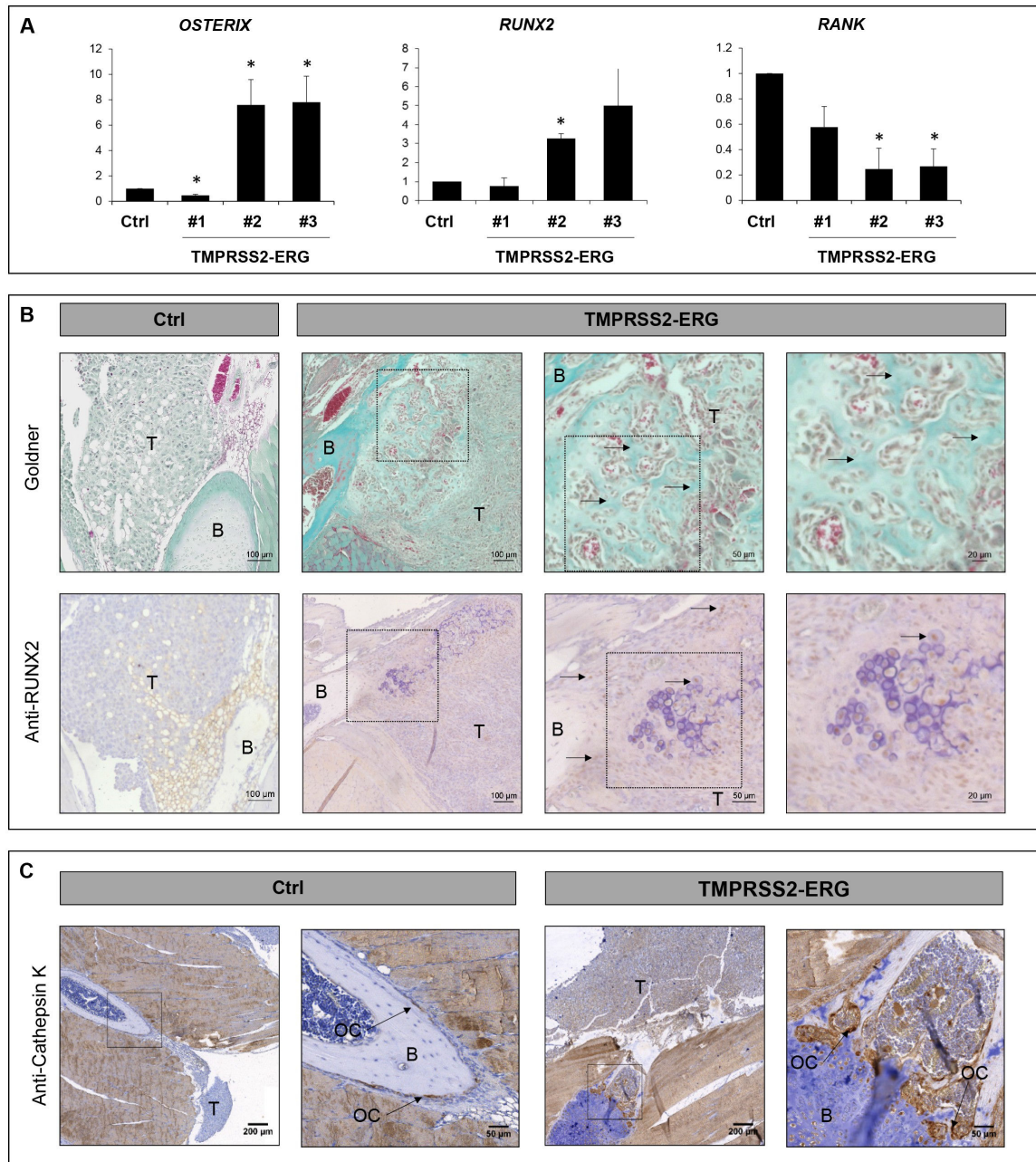
Cell line	Mouse	Nose	Mandibule	Hind Limb	Spine	Ribs	Total/ mouse
Ctrl	1	1	1			1	3
	2	1	1	1		1	4
	3	1					1
	4	1	1		1		3
	5		1			2	3
	6		1	1	1		3
	7		1			1	2
	8		1	1	1	1	4
	9	1	1				2
	10	1	1				2
	Total/ site	6	9	3	3	8	29
TMPRSS2-ERG	1	1	1	1	2		5
	2	1	1	2	1	1	6
	3	1	1	1	1		4
	4	1	1	1	1		4
	5	1	1	2			4
	6	1	1	1		1	4
	7	1		2	1	2	6
	8		1	1	1	1	3
	9		1	1	2	1	5
	Total/ site	7	8	12	9	5	41



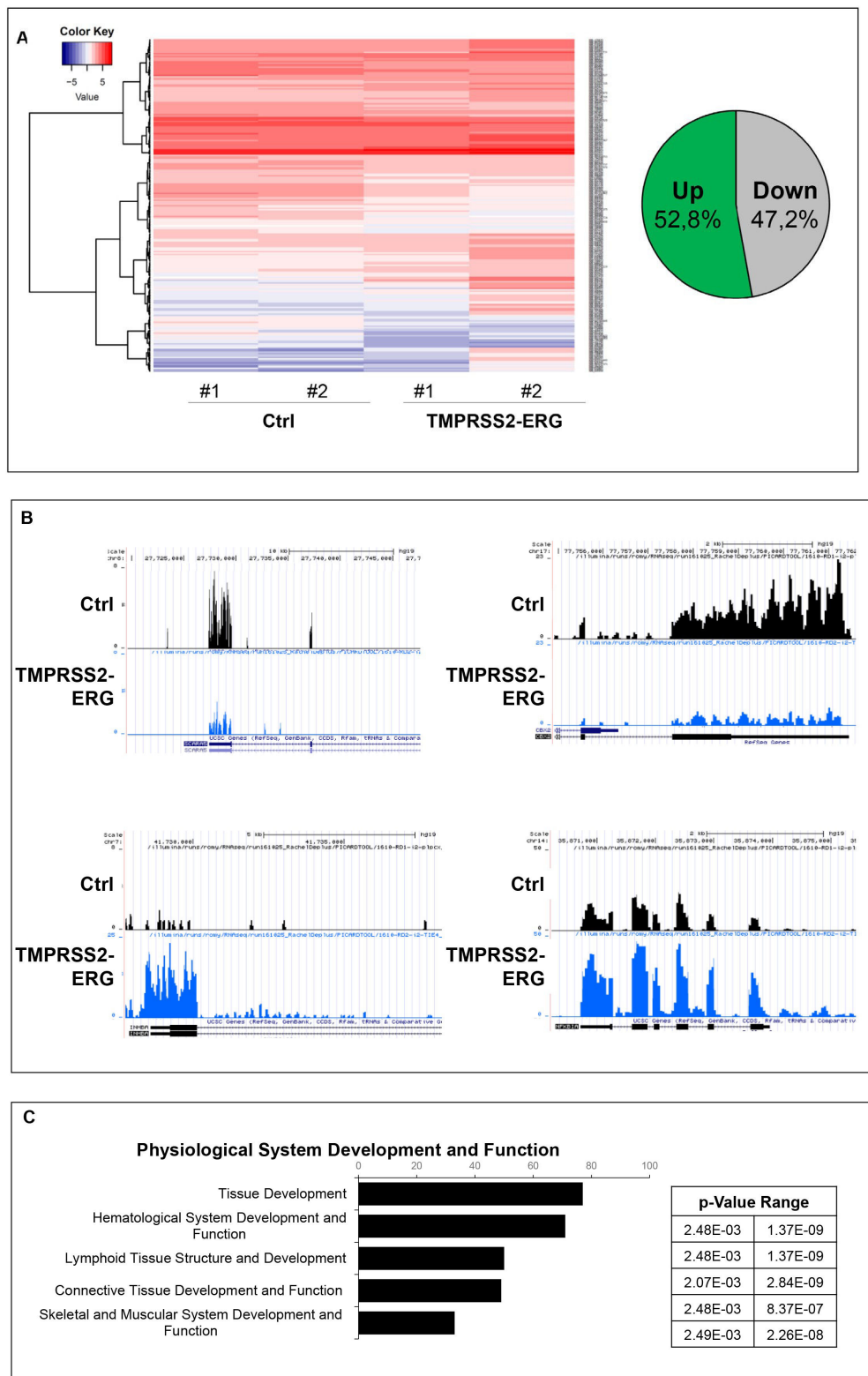
Supplementary Figure S4 (related to Figure 3): **A.** Incidence of metastasis to organ sites for mice injected in left ventricle with PC3M-luc Ctrl or TMPRSS2-ERG at the end of experiment. **B.** Bioluminescence imaging of all SCID mice bearing PC3M-luc tumor cells (Ctrl or TMPRSS2-ERG) after intracardiac injection. Automatic parameters were used to detected all tumors. Macroscopic dissection and bioluminescence measurement analysis of metastatic sites confirmed luciferase detection corresponding to the presence of tumor cells (Figure 3C).



Supplementary Figure S5 (related to Figure 3E): Additional Histologic analysis of bone tumors resulting from intracardiac injection of PC3M-luc Ctrl (left) or PC3M-luc TMPRSS2-ERG (right) by Goldner staining (top), with anti-ERG antibody (middle) and anti-Ki67 antibody (bottom). B=Bone, T= Tumor cells.



Supplementary Figure S6 (related to Figure 3): A. Real-Time PCR analysis of *Osterix*, *Runx2* and *RANK* in spine of mice injected in left ventricle with PC3M-luc Ctrl or TMPRSS2-ERG cells. Data are shown as mean of duplicates for each mice. Results are normalized with respect to endogenous control GAPDH. (*= $p < 0,05$). B-C. Histologic analysis of bone tumors resulting from intracardiac injection of PC3M-luc Ctrl (left) or PC3M-luc TMPRSS2-ERG (right) by Goldner staining (B, top), with anti-Runx2 antibody (B, bottom) or with anti-Cathepsin-K (C). Magnified insert are shown on the right. Arrows indicate Bone matrix, Runx2 or Cathepsin-K positive cells at B top or bottom and C panel respectively.



Supplementary Figure S7 (related to Figure 4): **A.** Heatmap showing differentially expressed genes between PC3M-luc Ctrl and TMPRSS2-ERG cells. A technical duplicate was analysed for each sample (#1 and #2). The heatmap scale shows the range of expression level, whereby positive (red) and negative (blue) values correspond, respectively, to a higher and a lower expression. **B.** Additional examples of RNA-Seq peaks. **C.** Ingenuity Pathway Analysis (IPA®) (“Physiological System Development and Function”) of the differentially expressed genes. The x axis represents the number of molecules per categories. Range of p-value is indicated.

Supplementary Table S1: sequences of primers used for RT-qPCR

Name	Sequence 5'-3'	Application
ERG-Fwd	AACGAGCGCAGAGTTATCGT	RT-qPCR
ERG-Rev	GTGAGCCTCTGGAAGTCGTC	RT-qPCR
CBX2-Fwd	CCGAGTGCATCCTGAGCAA	RT-qPCR
CBX2-Rev	GCTCCCAGCTGTTATGTTTGG	RT-qPCR
CREB3L1-Rev	CTGGAGAATGCCAACAGGACC	RT-qPCR
CREB3L1-Fwd	AGAACAAAGCACAAGGCTGC	RT-qPCR
GNG11-Fwd	GGCCTTCAGTTGTTTCGGGA	RT-qPCR
GNG11-Rev	TTAGACACTTGTTGTCTCTGCAA	RT-qPCR
SCARA5-Fwd	ATGCGTGGGTTCAAAGGTGA	RT-qPCR
SCARA5-Rev	GACCTGAGCCATTCACCAGG	RT-qPCR
SIGLC15-Fwd	GGTCTCCCGACAGGCTCATT	RT-qPCR
SIGLC15-Rev	GCACCTCTGTGTTGAGCAAGT	RT-qPCR
SDHA-Fwd	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	RT-qPCR
SDHA-Rev	CCACCACTGCATCAAATTCATG	RT-qPCR
HPRT-Fwd	TGACACTGGCAAAACAATGCA	RT-qPCR
HPRT-Rev	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	RT-qPCR
GAPDH-Fwd	GGGGAGGCGTGTGTGTC	RT-qPCR
GAPDH-Rev	ATGGTGTCTGAGCGATGTGG	RT-qPCR
OSTERIX-Fwd	AGAGCTAGGAGGACAGAGGC	RT-qPCR
OSTERIX-Rev	CTTGAGACAGCAGGGGACAG	RT-qPCR
RUNX2-Fwd	TGCTGGAGTGATGTGGTTTC	RT-qPCR
RUNX2-Rev	TTTGCTATGAAGCCTGGCGA	RT-qPCR
RANK-Fwd	AGATGGCTTTCCAGTGTGT	RT-qPCR
RANK-Rev	GCAACTATCTCCAGGCCTCA	RT-qPCR

Supplementary Table S2: Ingenuity pathway analysis “Top Disease and Bio Functions”: List of molecules implied in cancer

See Supplementary File 1

Supplementary Table S3: Ingenuity pathway analysis “Molecular and Cellular Functions”: List of molecules implied in Cell-To-Cell Signaling and Interaction

See Supplementary File 2

Supplementary Table S4: Ingenuity pathway analysis “Molecular and Cellular Functions”: List of molecules implied in Cellular Movement

See Supplementary File 3

Supplementary Table S5: Ingenuity pathway analysis “Physiological System Development and Function”: List of molecules implied in Connective Tissues Development and Function

See Supplementary File 4

Supplementary Table S6: List of differentially expressed genes between PC3M-luc Ctrl and TMPRSS2-ERG cells

See Supplementary File 5

V. BIBLIOGRAPHIE

- Abate-Shen C. and Shen M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14, 2410-34.
- Abate-Shen C., Shen M.M., Gelmann E. (2008). Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation* 76, 717-27.
- Abou-Ouf H., Zhao L., Bismar T.A. (2016). ERG expression in prostate cancer: biological relevance and clinical implication. *J Cancer Res Clin Oncol* 142, 1781-93.
- Aboulafia A.J., Levine A.M., Schmidt D., *et al.* (2007). Surgical therapy of bone metastases. *Semin Oncol* 34, 206-14.
- Adamo P. and Ladomery M.R. (2016). The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer. *Oncogene* 35, 403-14.
- Adams J.C. (2004). Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr Opin Cell Biol* 16, 590-6.
- Agoulnik I.U. and Weigel N.L. (2008). Androgen receptor coactivators and prostate cancer. *Adv Exp Med Biol* 617, 245-55.
- Ahmed K. (2011). Biological roles and therapeutic potential of hydroxy-carboxylic Acid receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2, 51.
- Ahmed K., Tunaru S., Tang C., *et al.* (2010). An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell Metab* 11, 311-9.
- Al Bashir S., Alshalalfa M., Hegazy S.A., *et al.* (2014). Cysteine- rich secretory protein 3 (CRISP3), ERG and PTEN define a molecular subtype of prostate cancer with implication to patients' prognosis. *J Hematol Oncol* 7, 21.
- An J., Ren S., Murphy S.J., *et al.* (2015). Truncated ERG Oncoproteins from TMPRSS2-ERG Fusions Are Resistant to SPOP-Mediated Proteasome Degradation. *Mol Cell* 59, 904-16.
- Anderson M.K., Hernandez-Hoyos G., Diamond R.A., *et al.* (1999). Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development* 126, 3131-48.
- Andriole G.L., Crawford E.D., Grubb R.L., 3rd, *et al.* (2009). Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 360, 1310-9.
- Anthony B.A. and Link D.C. (2014). Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol* 35, 32-7.
- Araya N., Hirota K., Shimamoto Y., *et al.* (2003). Cooperative interaction of EWS with CREB-binding protein selectively activates hepatocyte nuclear factor 4-mediated transcription. *J Biol Chem* 278, 5427-32.

- Asahi H., Mizokami A., Miwa S., *et al.* (2006). Bisphosphonate induces apoptosis and inhibits pro-osteoclastic gene expression in prostate cancer cells. *Int J Urol* 13, 593-600.
- Asangani I.A., Dommeti V.L., Wang X., *et al.* (2014). Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature* 510, 278-82.
- Askmyr M., Sims N.A., Martin T.J., *et al.* (2009). What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche? *Trends Endocrinol Metab* 20, 303-9.
- Attard G., Clark J., Ambrosini L., *et al.* (2008). Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene* 27, 253-63.
- Attard G., Jameson C., Moreira J., *et al.* (2009). Hormone-sensitive prostate cancer: a case of ETS gene fusion heterogeneity. *J Clin Pathol* 62, 373-6.
- Attiga F.A., Fernandez P.M., Weeraratna A.T., *et al.* (2000). Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 60, 4629-37.
- Baena E., Shao Z., Linn D.E., *et al.* (2013). ETV1 directs androgen metabolism and confers aggressive prostate cancer in targeted mice and patients. *Genes Dev* 27, 683-98.
- Bagnato A., Loizidou M., Pflug B.R., *et al.* (2011). Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *Br J Pharmacol* 163, 220-33.
- Baldus C.D., Burmeister T., Martus P., *et al.* (2006). High expression of the ETS transcription factor ERG predicts adverse outcome in acute T-lymphoblastic leukemia in adults. *J Clin Oncol* 24, 4714-20.
- Barbieri C.E., Baca S.C., Lawrence M.S., *et al.* (2012). Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet* 44, 685-9.
- Barfeld S.J., East P., Zuber V., *et al.* (2014). Meta-analysis of prostate cancer gene expression data identifies a novel discriminatory signature enriched for glycosylating enzymes. *BMC Med Genomics* 7, 513.
- Barry M., Perner S., Demichelis F., *et al.* (2007). TMPRSS2-ERG fusion heterogeneity in multifocal prostate cancer: clinical and biologic implications. *Urology* 70, 630-3.
- Bastus N.C., Boyd L.K., Mao X., *et al.* (2010). Androgen-induced TMPRSS2:ERG fusion in nonmalignant prostate epithelial cells. *Cancer Res* 70, 9544-8.
- Basuyaux J.P., Ferreira E., Stehelin D., *et al.* (1997). The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner. *J Biol Chem* 272, 26188-95.
- Beltran H., Prandi D., Mosquera J.M., *et al.* (2016). Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat Med* 22, 298-305.

- Benton C.R., Yoshida Y., Lally J., *et al.* (2008). PGC-1alpha increases skeletal muscle lactate uptake by increasing the expression of MCT1 but not MCT2 or MCT4. *Physiol Genomics* 35, 45-54.
- Berg K.D., Vainer B., Thomsen F.B., *et al.* (2014). ERG protein expression in diagnostic specimens is associated with increased risk of progression during active surveillance for prostate cancer. *Eur Urol* 66, 851-60.
- Berger M.F., Lawrence M.S., Demichelis F., *et al.* (2011). The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 470, 214-20.
- Bernard D., Pourtier-Manzanedo A., Gil J., *et al.* (2003). Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest* 112, 1724-31.
- Bianco P. (2011). Minireview: The stem cell next door: skeletal and hematopoietic stem cell "niches" in bone. *Endocrinology* 152, 2957-62.
- Birdsey G.M., Dryden N.H., Amsellem V., *et al.* (2008). Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* 111, 3498-506.
- Birdsey G.M., Dryden N.H., Shah A.V., *et al.* (2012). The transcription factor Erg regulates expression of histone deacetylase 6 and multiple pathways involved in endothelial cell migration and angiogenesis. *Blood* 119, 894-903.
- Birdsey G.M., Shah A.V., Dufton N., *et al.* (2015). The endothelial transcription factor ERG promotes vascular stability and growth through Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell* 32, 82-96.
- Bismar T.A., Alshalalfa M., Petersen L.F., *et al.* (2014). Interrogation of ERG gene rearrangements in prostate cancer identifies a prognostic 10-gene signature with relevant implication to patients' clinical outcome. *BJU Int* 113, 309-19.
- Bismar T.A., Dolph M., Teng L.H., *et al.* (2012). ERG protein expression reflects hormonal treatment response and is associated with Gleason score and prostate cancer specific mortality. *Eur J Cancer* 48, 538-46.
- Bismar T.A., Yoshimoto M., Vollmer R.T., *et al.* (2011). PTEN genomic deletion is an early event associated with ERG gene rearrangements in prostate cancer. *BJU Int* 107, 477-85.
- Bjorkman M., Iljin K., Halonen P., *et al.* (2008). Defining the molecular action of HDAC inhibitors and synergism with androgen deprivation in ERG-positive prostate cancer. *Int J Cancer* 123, 2774-81.
- Blad C.C., Tang C., Offermanns S. (2012). G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 11, 603-19.
- Bosco A., Bureau C., Affaticati P., *et al.* (2013). Development of hypothalamic serotonergic neurons requires Fgf signalling via the ETS-domain transcription factor Etv5b. *Development* 140, 372-84.

- Boyce B.F. and Xing L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473, 139-46.
- Brenner J.C., Ateeq B., Li Y., *et al.* (2011). Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer. *Cancer Cell* 19, 664-78.
- Bretthauer M. and Kalager M. (2013). Principles, effectiveness and caveats in screening for cancer. *Br J Surg* 100, 55-65.
- Bryan J. and Kane R.E. (1978). Separation and interaction of the major components of sea urchin actin gel. *J Mol Biol* 125, 207-24.
- Cai D., Shames D.S., Raso M.G., *et al.* (2010). Steroid receptor coactivator-3 expression in lung cancer and its role in the regulation of cancer cell survival and proliferation. *Cancer Res* 70, 6477-85.
- Cai H., Memarzadeh S., Stoyanova T., *et al.* (2012). Collaboration of Kras and androgen receptor signaling stimulates EZH2 expression and tumor-propagating cells in prostate cancer. *Cancer Res* 72, 4672-81.
- Cai T.Q., Ren N., Jin L., *et al.* (2008). Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 987-91.
- Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-6.
- Camuzeaux B., Spriet C., Heliot L., *et al.* (2005). Imaging Erg and Jun transcription factor interaction in living cells using fluorescence resonance energy transfer analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 1107-14.
- Carrere S., Verger A., Flourens A., *et al.* (1998). Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* 16, 3261-8.
- Carter B.S., Beaty T.H., Steinberg G.D., *et al.* (1992). Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3367-71.
- Carver B.S., Tran J., Gopalan A., *et al.* (2009). Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet* 41, 619-24.
- Casey O.M., Fang L., Hynes P.G., *et al.* (2012). TMPRSS2- driven ERG expression in vivo increases self-renewal and maintains expression in a castration resistant subpopulation. *PLoS One* 7, e41668.
- Cattellino A., Liebner S., Gallini R., *et al.* (2003). The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol* 162, 1111-22.
- Cavazzana A.O., Magnani J.L., Ross R.A., *et al.* (1988). Ewing's sarcoma is an undifferentiated neuroectodermal tumor. *Prog Clin Biol Res* 271, 487-98.

- Cerveira N., Ribeiro F.R., Peixoto A., *et al.* (2006). TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia* 8, 826-32.
- Chan S.C., Selth L.A., Li Y., *et al.* (2015). Targeting chromatin binding regulation of constitutively active AR variants to overcome prostate cancer resistance to endocrine-based therapies. *Nucleic Acids Res* 43, 5880-97.
- Chandrasekar T., Yang J.C., Gao A.C., *et al.* (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol* 4, 365-80.
- Chang K.H., Li R., Papari-Zareei M., *et al.* (2011). Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13728-33.
- Charlot C., Dubois-Pot H., Serchov T., *et al.* (2010). A review of post-translational modifications and subcellular localization of Ets transcription factors: possible connection with cancer and involvement in the hypoxic response. *Methods Mol Biol* 647, 3-30.
- Chatterjee P., Choudhary G.S., Sharma A., *et al.* (2013). PARP inhibition sensitizes to low dose-rate radiation TMPRSS2-ERG fusion gene-expressing and PTEN-deficient prostate cancer cells. *PLoS One* 8, e60408.
- Cheetham P.J. and Petrylak D.P. (2012). Alpha particles as radiopharmaceuticals in the treatment of bone metastases: mechanism of action of radium-223 chloride (Alpharadin) and radiation protection. *Oncology (Williston Park)* 26, 330-7, 41.
- Chen H., Nandi A.K., Li X., *et al.* (2002). NKX-3.1 interacts with prostate-derived Ets factor and regulates the activity of the PSA promoter. *Cancer Res* 62, 338-40.
- Chen L., Yang S., Jakoncic J., *et al.* (2010). Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature* 464, 1062-6.
- Chen Y., Sawyers C.L., Scher H.I. (2008). Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol* 8, 440-8.
- Chen Z., Lan X., Thomas-Ahner J.M., *et al.* (2015). Agonist and antagonist switch DNA motifs recognized by human androgen receptor in prostate cancer. *EMBO J* 34, 502-16.
- Chng K.R., Chang C.W., Tan S.K., *et al.* (2012). A transcriptional repressor co-regulatory network governing androgen response in prostate cancers. *EMBO J* 31, 2810-23.
- Chu K., Cheng C.J., Ye X., *et al.* (2008). Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res* 6, 1259-67.
- Chung L.W., Hsieh C.L., Law A., *et al.* (2003). New targets for therapy in prostate cancer: modulation of stromal-epithelial interactions. *Urology* 62, 44-54.

- Clark J., Merson S., Jhavar S., *et al.* (2007). Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 26, 2667-73.
- Clezardin P. and Teti A. (2007). Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis* 24, 599-608.
- Coleman R.E. (2006). Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 12, 6243s-9s.
- Colombo M., Raposo G., Thery C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 255-89.
- Cookson M.S., Roth B.J., Dahm P., *et al.* (2013). Castration-resistant prostate cancer: AUA Guideline. *J Urol* 190, 429-38.
- Cooper C.R., Chay C.H., Pienta K.J. (2002). The role of alpha(v)beta(3) in prostate cancer progression. *Neoplasia* 4, 191-4.
- Corey E., Brown L.G., Kiefer J.A., *et al.* (2005). Osteoprotegerin in prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res* 65, 1710-8.
- Corey E., Brown L.G., Quinn J.E., *et al.* (2003a). Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9, 295-306.
- Corey E., Quinn J.E., Bladou F., *et al.* (2002). Establishment and characterization of osseous prostate cancer models: intra-tibial injection of human prostate cancer cells. *Prostate* 52, 20-33.
- Corey E., Quinn J.E., Vessella R.L. (2003b). A novel method of generating prostate cancer metastases from orthotopic implants. *Prostate* 56, 110-4.
- Correa D., Somoza R.A., Lin P., *et al.* (2016). Mesenchymal stem cells regulate melanoma cancer cells extravasation to bone and liver at their perivascular niche. *Int J Cancer* 138, 417-27.
- Cossigny D. and Quan G.M. (2012). In vivo animal models of spinal metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 31, 99-108.
- Cox M.K., Appelboom B.L., Ban G.I., *et al.* (2014). Erg cooperates with TGF-beta to control mesenchymal differentiation. *Exp Cell Res* 328, 410-8.
- Croucher P.I., McDonald M.M., Martin T.J. (2016). Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. *Nat Rev Cancer* 16, 373-86.
- Croucher P.I., Parker B.S., Corcoran N., *et al.* (2015). Bone Turnover Markers and Prostate Cancer: Not Just a Measure of Bone Disease? *Eur Urol* 68, 51-2.
- Culig Z., Hobisch A., Cronauer M.V., *et al.* (1993). Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* 7, 1541-50.

D'Amico A.V., Whittington R., Malkowicz S.B., *et al.* (1998). Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 280, 969-74.

Dai J., Hall C.L., Escara-Wilke J., *et al.* (2008). Prostate cancer induces bone metastasis through Wnt-induced bone morphogenetic protein-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res* 68, 5785-94.

Damber J.E. and Aus G. (2008). Prostate cancer. *Lancet* 371, 1710-21.

Darnel A.D., Behmoaram E., Vollmer R.T., *et al.* (2009a). Fascin regulates prostate cancer cell invasion and is associated with metastasis and biochemical failure in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15, 1376-83.

Darnel A.D., Lafargue C.J., Vollmer R.T., *et al.* (2009b). TMPRSS2-ERG fusion is frequently observed in Gleason pattern 3 prostate cancer in a Canadian cohort. *Cancer Biol Ther* 8, 125-30.

De Arcangelis A., Georges-Labouesse E., Adams J.C. (2004). Expression of fascin-1, the gene encoding the actin-bundling protein fascin-1, during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 4, 637-43.

De Marzo A.M., Platz E.A., Sutcliffe S., *et al.* (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7, 256-69.

de Taisne C., Gégonne A., Stehelin D., *et al.* (1984). Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets. *Nature* 310, 581-3.

De Val S. and Black B.L. (2009). Transcriptional control of endothelial cell development. *Dev Cell* 16, 180-95.

De Val S., Chi N.C., Meadows S.M., *et al.* (2008). Combinatorial regulation of endothelial gene expression by ets and forkhead transcription factors. *Cell* 135, 1053-64.

Decker K.F., Zheng D., He Y., *et al.* (2012). Persistent androgen receptor-mediated transcription in castration-resistant prostate cancer under androgen-deprived conditions. *Nucleic Acids Res* 40, 10765-79.

Dehm S.M. and Tindall D.J. (2011). Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocr Relat Cancer* 18, R183-96.

Delattre O., Zucman J., Plougastel B., *et al.* (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359, 162-5.

Demichelis F., Fall K., Perner S., *et al.* (2007). TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 26, 4596-9.

Deplus R., Delliaux C., Marchand N., *et al.* (2017). TMPRSS2-ERG fusion promotes prostate cancer metastases in bone. *Oncotarget* 8, 11827-40.

- Deramautd B.M., Remy P., Abraham N.G. (1999). Upregulation of human heme oxygenase gene expression by Ets-family proteins. *J Cell Biochem* 72, 311-21.
- Desai B., Rogers M.J., Chellaiah M.A. (2007). Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Mol Cancer* 6, 18.
- Dhordain P., Dewitte F., Desbiens X., *et al.* (1995). Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Mech Dev* 50, 17-28.
- Domanska U.M., Timmer-Bosscha H., Nagengast W.B., *et al.* (2012). CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. *Neoplasia* 14, 709-18.
- Drake M.T., Clarke B.L., Khosla S. (2008). Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 83, 1032-45.
- Dryden N.H., Sperone A., Martin-Almedina S., *et al.* (2012). The transcription factor Erg controls endothelial cell quiescence by repressing activity of nuclear factor (NF)-kappaB p65. *J Biol Chem* 287, 12331-42.
- Dunn T., Praisman L., Hagag N., *et al.* (1994). ERG gene is translocated in an Ewing's sarcoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 76, 19-22.
- Dunstan C.R., Felsenberg D., Seibel M.J. (2007). Therapy insight: the risks and benefits of bisphosphonates for the treatment of tumor-induced bone disease. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 42-55.
- Duterque-Coquillaud M., Niel C., Plaza S., *et al.* (1993). New human *erg* isoforms generated by alternative splicing are transcriptional activators. *Oncogene* 8, 1865-73.
- Dvorak C.A., Liu C., Shelton J., *et al.* (2012). Identification of Hydroxybenzoic Acids as Selective Lactate Receptor (GPR81) Agonists with Antilipolytic Effects. *ACS Med Chem Lett* 3, 637-9.
- Eccles S.A. and Welch D.R. (2007). Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 369, 1742-57.
- Edwards J.R. and Mundy G.R. (2011). Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* 7, 235-43.
- Egevad L. (2008). Recent trends in Gleason grading of prostate cancer: I. Pattern interpretation. *Anal Quant Cytol Histol* 30, 190-8.
- Ehninger A. and Trumpp A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* 208, 421-8.
- Elkin M. and Vlodavsky I. (2001). Tail vein assay of cancer metastasis. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 19, Unit 19 2.

- Ellett F., Kile B.T., Lieschke G.J. (2009). The role of the ETS factor *erg* in zebrafish vasculogenesis. *Mech Dev* 126, 220-9.
- Epstein J.I., Egevad L., Amin M.B., *et al.* (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. *Am J Surg Pathol* 40, 244-52.
- Erkizan H.V., Kong Y., Merchant M., *et al.* (2009). A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nat Med* 15, 750-6.
- Esgueva R., Perner S., C J.L., *et al.* (2010). Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort. *Mod Pathol* 23, 539-46.
- Falzarano S.M., Navas M., Simmerman K., *et al.* (2010). ERG rearrangement is present in a subset of transition zone prostatic tumors. *Mod Pathol* 23, 1499-506.
- Feingold K.R., Moser A., Shigenaga J.K., *et al.* (2011). Inflammation inhibits GPR81 expression in adipose tissue. *Inflamm Res* 60, 991-5.
- Feldman B.J. and Feldman D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.
- Fidler I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-8.
- Fidler I.J. and Kripke M.L. (2015). The challenge of targeting metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 34, 635-41.
- FitzGerald L.M., Agalliu I., Johnson K., *et al.* (2008). Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer. *BMC Cancer* 8, 230.
- Fizazi K., Bosserman L., Gao G., *et al.* (2009). Denosumab treatment of prostate cancer with bone metastases and increased urine N-telopeptide levels after therapy with intravenous bisphosphonates: results of a randomized phase II trial. *J Urol* 182, 509-15; discussion 15-6.
- Fizazi K., Carducci M., Smith M., *et al.* (2011). Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* 377, 813-22.
- Flajollet S., Tian T.V., Flourens A., *et al.* (2011). Abnormal expression of the ERG transcription factor in prostate cancer cells activates osteopontin. *Mol Cancer Res* 9, 914-24.
- Flajollet S., Tian T.V., Huot L., *et al.* (2012). Increased adipogenesis in cultured embryonic chondrocytes and in adult bone marrow of dominant negative *Erg* transgenic mice. *PLoS One* 7, e48656.

- Fortson W.S., Kayarthodi S., Fujimura Y., *et al.* (2011). Histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin-A induce apoptosis and affect acetylation status of p53 in ERG-positive prostate cancer cells. *Int J Oncol* 39, 111-9.
- Fradet A., Sorel H., Depalle B., *et al.* (2013). A new murine model of osteoblastic/osteolytic lesions from human androgen-resistant prostate cancer. *PLoS One* 8, e75092.
- Fuse M., Nohata N., Kojima S., *et al.* (2011). Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int J Oncol* 38, 1093-101.
- Galsky M.D., Small A.C., Tsao C.K., *et al.* (2012). Clinical development of novel therapeutics for castration-resistant prostate cancer: historic challenges and recent successes. *CA Cancer J Clin* 62, 299-308.
- Gan W., Dai X., Lunardi A., *et al.* (2015). SPOP Promotes Ubiquitination and Degradation of the ERG Oncoprotein to Suppress Prostate Cancer Progression. *Mol Cell* 59, 917-30.
- Gasi Tandefelt D., Boormans J.L., van der Korput H.A., *et al.* (2013). A 36-gene signature predicts clinical progression in a subgroup of ERG-positive prostate cancers. *Eur Urol* 64, 941-50.
- Gegonne A., Leprince D., Duterque-Coquillaud M., *et al.* (1987). Multiple domains for the chicken cellular sequences homologous to the v-ets oncogene of the E26 retrovirus. *Mol Cell Biol* 7, 806-12.
- Ghajar C.M. (2015). Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nat Rev Cancer* 15, 238-47.
- Ghajar C.M., Peinado H., Mori H., *et al.* (2013). The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol* 15, 807-17.
- Giancotti F.G. (2013). Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell* 155, 750-64.
- Gopalan A., Leversha M.A., Satagopan J.M., *et al.* (2009). TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res* 69, 1400-6.
- Gory S., Dalmon J., Prandini M.H., *et al.* (1998). Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J Biol Chem* 273, 6750-5.
- Grasso C.S., Wu Y.M., Robinson D.R., *et al.* (2012). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 487, 239-43.
- Graves B.J. and Petersen J.M. (1998). Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* 75, 1-55.
- Green S.M., Mostaghel E.A., Nelson P.S. (2012). Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 360, 3-13.

Gregory C.W., Johnson R.T., Jr., Mohler J.L., *et al.* (2001). Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res* 61, 2892-8.

Grupp K., Kohl S., Sirma H., *et al.* (2013). Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence. *Mod Pathol* 26, 733-42.

Guise T.A., Yin J.J., Mohammad K.S. (2003). Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer* 97, 779-84.

Guo Z., Yang X., Sun F., *et al.* (2009). A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res* 69, 2305-13.

Gupta G.P. and Massague J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-95.

Ha H.K., Lee W., Park H.J., *et al.* (2011). Clinical significance of CXCL16/CXCR6 expression in patients with prostate cancer. *Mol Med Rep* 4, 419-24.

Haffner M.C., Aryee M.J., Toubaji A., *et al.* (2010). Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. *Nat Genet* 42, 668-75.

Haider M., Zhang X., Coleman I., *et al.* (2016). Epithelial mesenchymal-like transition occurs in a subset of cells in castration resistant prostate cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 33, 239-48.

Halabi S., Kelly W.K., Ma H., *et al.* (2016). Meta-Analysis Evaluating the Impact of Site of Metastasis on Overall Survival in Men With Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 34, 1652-9.

Hall C.L., Bafico A., Dai J., *et al.* (2005). Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res* 65, 7554-60.

Hall C.L., Dai J., van Golen K.L., *et al.* (2006). Type I collagen receptor (alpha 2 beta 1) signaling promotes the growth of human prostate cancer cells within the bone. *Cancer Res* 66, 8648-54.

Han R., Pacifici M., Iwamoto M., *et al.* (2015). Endothelial Erg expression is required for embryogenesis and vascular integrity. *Organogenesis* 11, 75-86.

Harris W.P., Mostaghel E.A., Nelson P.S., *et al.* (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol* 6, 76-85.

Hasegawa Y., Abe M., Yamazaki T., *et al.* (2004). Transcriptional regulation of human angiopoietin-2 by transcription factor Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 52-8.

- Hashimoto Y., Kim D.J., Adams J.C. (2011). The roles of fascin in health and disease. *J Pathol* 224, 289-300.
- Hashimoto Y., Skacel M., Adams J.C. (2005). Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: prospects for a novel biomarker? *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1787-804.
- Hattori M., Fujiyama A., Taylor T.D., *et al.* (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405, 311-9.
- Hawksworth D., Ravindranath L., Chen Y., *et al.* (2010). Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 13, 311-5.
- Heemers H.V. and Tindall D.J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 28, 778-808.
- Helgeson B.E., Tomlins S.A., Shah N., *et al.* (2008). Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res* 68, 73-80.
- Henriksen G., Fisher D.R., Roeske J.C., *et al.* (2003). Targeting of osseous sites with alpha-emitting ²²³Ra: comparison with the beta-emitter ⁸⁹Sr in mice. *J Nucl Med* 44, 252-9.
- Hermans K.G., van Marion R., van Dekken H., *et al.* (2006). TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer. *Cancer Res* 66, 10658-63.
- Hermanson O., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab* 13, 55-60.
- Hessels D., Smit F.P., Verhaegh G.W., *et al.* (2007). Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13, 5103-8.
- Hewett P.W., Nishi K., Daft E.L., *et al.* (2001). Selective expression of erg isoforms in human endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 347-55.
- Hirschhaeuser F., Sattler U.G., Mueller-Klieser W. (2011). Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res* 71, 6921-5.
- Hoesel B., Malkani N., Hochreiter B., *et al.* (2016). Sequence-function correlations and dynamics of ERG isoforms. ERG8 is the black sheep of the family. *Biochim Biophys Acta* 1863, 205-18.
- Holder-Espinasse, M. (2006). Vers la compréhension de la formation et du vieillissement du cartilage à partir de deux modèles : souris transgéniques et remplacement trachéal, Université de Lille 2, Lille, France.

- Hollenhorst P.C., McIntosh L.P., Graves B.J. (2011). Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annu Rev Biochem* 80, 437-71.
- Hoogland A.M., Jenster G., van Weerden W.M., *et al.* (2012). ERG immunohistochemistry is not predictive for PSA recurrence, local recurrence or overall survival after radical prostatectomy for prostate cancer. *Mod Pathol* 25, 471-9.
- Horoszewicz J.S., Leong S.S., Chu T.M., *et al.* (1980). The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37, 115-32.
- Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., *et al.* (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329-35.
- Hu R., Dunn T.A., Wei S., *et al.* (2009). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 69, 16-22.
- Hu W., Zhen X., Xiong B., *et al.* (2008a). CXCR6 is expressed in human prostate cancer in vivo and is involved in the in vitro invasion of PC3 and LNCap cells. *Cancer Sci* 99, 1362-9.
- Hu Y., Dobi A., Sreenath T., *et al.* (2008b). Delineation of TMPRSS2-ERG splice variants in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14, 4719-25.
- Huang C.F., Lira C., Chu K., *et al.* (2010). Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res* 70, 4580-9.
- Huang K.C., Dolph M., Donnelly B., *et al.* (2014). ERG expression is associated with increased risk of biochemical relapse following radical prostatectomy in early onset prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 16, 973-9.
- Huang W.C., Xie Z., Konaka H., *et al.* (2005). Human osteocalcin and bone sialoprotein mediating osteomimicry of prostate cancer cells: role of cAMP-dependent protein kinase A signaling pathway. *Cancer Res* 65, 2303-13.
- Huggins C. and 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 Cancer J Clin* 22, 232-40.
- Ibrahim A., Scher N., Williams G., *et al.* (2003). Approval summary for zoledronic acid for treatment of multiple myeloma and cancer bone metastases. *Clin Cancer Res* 9, 2394-9.
- Ibrahim T., Flamini E., Mercatali L., *et al.* (2010). Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer* 116, 1406-18.
- Ichikawa H., Shimizu K., Hayashi Y., *et al.* (1994). An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Cancer Res* 54, 2865-8.

- Ikeda T., Utsuyama M., Hirokawa K. (2001). Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res* 16, 1416-25.
- Iljin K., Wolf M., Edgren H., *et al.* (2006). TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res* 66, 10242-6.
- Iwamoto M., Higuchi Y., Enomoto-Iwamoto M., *et al.* (2001). The role of ERG (ets related gene) in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A, S41-7.
- Iwamoto M., Higuchi Y., Koyama E., *et al.* (2000). Transcription factor ERG variants and functional diversification of chondrocytes during limb long bone development. *J Cell Biol* 150, 27-40.
- Iwamoto M., Ohta Y., Larmour C., *et al.* (2013). Toward regeneration of articular cartilage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 99, 192-202.
- Iwamoto M., Tamamura Y., Koyama E., *et al.* (2007). Transcription factor ERG and joint and articular cartilage formation during mouse limb and spine skeletogenesis. *Dev Biol* 305, 40-51.
- James N.D., Caty A., Payne H., *et al.* (2010). Final safety and efficacy analysis of the specific endothelin A receptor antagonist zibotentan (ZD4054) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain-free or mildly symptomatic for pain: a double-blind, placebo-controlled, randomized Phase II trial. *BJU Int* 106, 966-73.
- Jayaraman G., Srinivas R., Duggan C., *et al.* (1999). p300/cAMP-responsive element-binding protein interactions with ets-1 and ets-2 in the transcriptional activation of the human stromelysin promoter. *J Biol Chem* 274, 17342-52.
- Jayo A. and Parsons M. (2010). Fascin: a key regulator of cytoskeletal dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1614-7.
- Jeninga E.H., Bugge A., Nielsen R., *et al.* (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the anti-lipolytic G-protein-coupled receptor 81 (GPR81/Gpr81). *J Biol Chem* 284, 26385-93.
- Jenkins D.E., Yu S.F., Hornig Y.S., *et al.* (2003). In vivo monitoring of tumor relapse and metastasis using bioluminescent PC-3M-luc-C6 cells in murine models of human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 20, 745-56.
- Jeon I.S., Davis J.N., Braun B.S., *et al.* (1995). A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 10, 1229-34.
- Jones D.H., Nakashima T., Sanchez O.H., *et al.* (2006). Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440, 692-6.
- Jung Y., Kim J.K., Shiozawa Y., *et al.* (2013). Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat Commun* 4, 1795.

- Jung Y., Shiozawa Y., Wang J., *et al.* (2012). Prevalence of prostate cancer metastases after intravenous inoculation provides clues into the molecular basis of dormancy in the bone marrow microenvironment. *Neoplasia* 14, 429-39.
- Kaighn M.E., Narayan K.S., Ohnuki Y., *et al.* (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17, 16-23.
- Kan C., Vargas G., Pape F.L., *et al.* (2016). Cancer Cell Colonisation in the Bone Microenvironment. *Int J Mol Sci* 17,
- Kang H.S., Nelson M.L., Mackereth C.D., *et al.* (2008). Identification and structural characterization of a CBP/p300-binding domain from the ETS family transcription factor GABP alpha. *J Mol Biol* 377, 636-46.
- Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoulis S., *et al.* (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820-7.
- Karim F.D., Urness L.D., Thummel C.S., *et al.* (1990). The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev* 4, 1451-3.
- Kasper S. and Smith J.A., Jr. (2004). Genetically modified mice and their use in developing therapeutic strategies for prostate cancer. *J Urol* 172, 12-9.
- Kennedy K.M. and Dewhirst M.W. (2010). Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol* 6, 127-48.
- Khemlina G., Ikeda S., Kurzrock R. (2015). Molecular landscape of prostate cancer: implications for current clinical trials. *Cancer Treat Rev* 41, 761-6.
- Khosa A.D., Nayyar M.S., Beirne J.C. (2007). Osteochemonecrosis of jaws and bisphosphonates. *Ir Med J* 100, 410-1.
- Kiefer J.A., Vessella R.L., Quinn J.E., *et al.* (2004). The effect of osteoprotegerin administration on the intra-tibial growth of the osteoblastic LuCaP 23.1 prostate cancer xenograft. *Clin Exp Metastasis* 21, 381-7.
- Kim C.A. and Bowie J.U. (2003). SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends Biochem Sci* 28, 625-8.
- Kim T.S., Heinlein C., Hackman R.C., *et al.* (2006). Phenotypic analysis of mice lacking the *Tmprss2*-encoded protease. *Mol Cell Biol* 26, 965-75.
- King J.C., Xu J., Wongvipat J., *et al.* (2009). Cooperativity of *TMPRSS2*-*ERG* with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet* 41, 524-6.
- Kirk P., Wilson M.C., Heddle C., *et al.* (2000). CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 19, 3896-904.

- Klezovitch O., Risk M., Coleman I., *et al.* (2008). A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2105-10.
- Koeneman K.S., Yeung F., Chung L.W. (1999). Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. *Prostate* 39, 246-61.
- Korenchuk S., Lehr J.E., L M.C., *et al.* (2001). VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. *In Vivo* 15, 163-8.
- Kroemer G. and Pouyssegur J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472-82.
- Kuei C., Yu J., Zhu J., *et al.* (2011). Study of GPR81, the lactate receptor, from distant species identifies residues and motifs critical for GPR81 functions. *Mol Pharmacol* 80, 848-58.
- Kulasingam V. and Diamandis E.P. (2013). Fascin-1 is a novel biomarker of aggressiveness in some carcinomas. *BMC Med* 11, 53.
- Kumagai J., Hofland J., Erkens-Schulze S., *et al.* (2013). Intratumoral conversion of adrenal androgen precursors drives androgen receptor-activated cell growth in prostate cancer more potently than de novo steroidogenesis. *Prostate* 73, 1636-50.
- Kumar-Sinha C., Tomlins S.A., Chinnaiyan A.M. (2008). Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 497-511.
- Kureishy N., Sapountzi V., Prag S., *et al.* (2002). Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays* 24, 350-61.
- Kusumbe A.P., Ramasamy S.K., Adams R.H. (2014). Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 507, 323-8.
- Lacronique V., Boureux A., Valle V.D., *et al.* (1997). A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278, 1309-12.
- Lamy P.J., Gauchez A.S., Salomon L., *et al.* (2016). [The level of evidence for the use of biomarkers in the early detection of prostate cancer]. *Ann Biol Clin (Paris)* 74, 227-32.
- Lapointe J., Kim Y.H., Miller M.A., *et al.* (2007). A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis. *Mod Pathol* 20, 467-73.
- Lara P.N., Jr., Ely B., Quinn D.I., *et al.* (2014). Serum biomarkers of bone metabolism in castration-resistant prostate cancer patients with skeletal metastases: results from SWOG 0421. *J Natl Cancer Inst* 106, dju013.
- Lathen C., Zhang Y., Chow J., *et al.* (2014). ERG-APLNR axis controls pulmonary venule endothelial proliferation in pulmonary veno-occlusive disease. *Circulation* 130, 1179-91.

- Lau D.K., Okon M., McIntosh L.P. (2012). The PNT domain from *Drosophila* pointed-P2 contains a dynamic N-terminal helix preceded by a disordered phosphoacceptor sequence. *Protein Sci* 21, 1716-25.
- Laudet V., Hanni C., Stehelin D., *et al.* (1999). Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 18, 1351-9.
- Lawson D.A., Bhakta N.R., Kessenbrock K., *et al.* (2015). Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature* 526, 131-5.
- Laxman B., Tomlins S.A., Mehra R., *et al.* (2006). Noninvasive detection of TMPRSS2:ERG fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. *Neoplasia* 8, 885-8.
- Lee D.K., Nguyen T., Lynch K.R., *et al.* (2001). Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene* 275, 83-91.
- Lee S.L., Yu D., Wang C., *et al.* (2015). ERG Expression in Prostate Needle Biopsy: Potential Diagnostic and Prognostic Implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 23, 499-505.
- Lee Y.C., Cheng C.J., Huang M., *et al.* (2010). Androgen depletion up-regulates cadherin-11 expression in prostate cancer. *J Pathol* 221, 68-76.
- Lee Y.J., Shin K.J., Park S.A., *et al.* (2016). G-protein-coupled receptor 81 promotes a malignant phenotype in breast cancer through angiogenic factor secretion. *Oncotarget* 7, 70898-911.
- Lehr J.E. and Pienta K.J. (1998). Preferential adhesion of prostate cancer cells to a human bone marrow endothelial cell line. *J Natl Cancer Inst* 90, 118-23.
- Leinonen K.A., Saramaki O.R., Furusato B., *et al.* (2013). Loss of PTEN is associated with aggressive behavior in ERG-positive prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22, 2333-44.
- Lelievre E., Lionneton F., Soncin F., *et al.* (2001). The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 391-407.
- Leprince D., Gégonne A., Coll J., *et al.* (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306, 395-7.
- Leroy B.E. and Northrup N. (2009). Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *Vet J* 180, 149-62.
- Li E.C. and Davis L.E. (2003). Zoledronic acid: a new parenteral bisphosphonate. *Clin Ther* 25, 2669-708.
- Li J., Yen C., Liaw D., *et al.* (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-7.

- Li X., Loberg R., Liao J., *et al.* (2009). A destructive cascade mediated by CCL2 facilitates prostate cancer growth in bone. *Cancer Res* 69, 1685-92.
- Liao J., Li X., Koh A.J., *et al.* (2008). Tumor expressed PTHrP facilitates prostate cancer-induced osteoblastic lesions. *Int J Cancer* 123, 2267-78.
- Liao J., Schneider A., Datta N.S., *et al.* (2006). Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res* 66, 9065-73.
- Liberti M.V. and Locasale J.W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 41, 211-8.
- Lin B., Ferguson C., White J.T., *et al.* (1999). Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res* 59, 4180-4.
- Lindzey J., Kumar M.V., Grossman M., *et al.* (1994). Molecular mechanisms of androgen action. *Vitam Horm* 49, 383-432.
- Ling Y., Lakey J.H., Roberts C.E., *et al.* (1997). Molecular characterization of the B-box protein-protein interaction motif of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J* 16, 2431-40.
- Lipinski M., Braham K., Philip I., *et al.* (1987). Neuroectoderm-associated antigens on Ewing's sarcoma cell lines. *Cancer Res* 47, 183-7.
- 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? *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2972-82.
- Liu B., Gu X., Huang T., *et al.* (2017). Identification of TMPRSS2-ERG mechanisms in prostate cancer invasiveness: Involvement of MMP-9 and plexin B1. *Oncol Rep* 37, 201-8.
- Liu C., Kuei C., Zhu J., *et al.* (2012). 3,5-Dihydroxybenzoic acid, a specific agonist for hydroxycarboxylic acid 1, inhibits lipolysis in adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 341, 794-801.
- Liu C., Wu J., Zhu J., *et al.* (2009). Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J Biol Chem* 284, 2811-22.
- Liu W., Xie C.C., Zhu Y., *et al.* (2008). Homozygous deletions and recurrent amplifications implicate new genes involved in prostate cancer. *Neoplasia* 10, 897-907.
- Liu Y., Gu Y., Cao X. (2015). The exosomes in tumor immunity. *Oncoimmunology* 4, e1027472.
- Logothetis C.J. and Lin S.H. (2005). Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5, 21-8.

- Loibl M., Binder A., Herrmann M., *et al.* (2014). Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro. *Biomed Res Int* 2014, 395781.
- Loriot Y., Massard C., Fizazi K. (2012). Recent developments in treatments targeting castration-resistant prostate cancer bone metastases. *Ann Oncol* 23, 1085-94.
- Loughran S.J., Kruse E.A., Hacking D.F., *et al.* (2008). The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 9, 810-9.
- Lowsley O.S. (1915). The Prostate Gland in Old Age. *Ann Surg* 62, 716-37.
- Lu S., Ren C., Liu Y., *et al.* (2006). PI3K-Akt signaling is involved in the regulation of p21(WAF/CIP) expression and androgen-independent growth in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 28, 245-51.
- Mackereth C.D., Scharpf M., Gentile L.N., *et al.* (2004). Diversity in structure and function of the Ets family PNT domains. *J Mol Biol* 342, 1249-64.
- Mahdian R., Nodouzi V., Asgari M., *et al.* (2014). Expression profile of MAGI2 gene as a novel biomarker in combination with major deregulated genes in prostate cancer. *Mol Biol Rep* 41, 6125-31.
- Maher C.A., Palanisamy N., Brenner J.C., *et al.* (2009). Chimeric transcript discovery by paired-end transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12353-8.
- Mamillapalli R., VanHouten J., Zawalich W., *et al.* (2008). Switching of G-protein usage by the calcium-sensing receptor reverses its effect on parathyroid hormone-related protein secretion in normal versus malignant breast cells. *J Biol Chem* 283, 24435-47.
- Mani R.S., Tomlins S.A., Callahan K., *et al.* (2009). Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science* 326, 1230.
- Marcucci G., Baldus C.D., Ruppert A.S., *et al.* (2005). Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 23, 9234-42.
- Maroulakou I.G. and Bowe D.B. (2000). Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* 19, 6432-42.
- Massie C.E., Lynch A., Ramos-Montoya A., *et al.* (2011). The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J* 30, 2719-33.
- McCracken S.R., Ramsay A., Heer R., *et al.* (2008). Aberrant expression of extracellular signal-regulated kinase 5 in human prostate cancer. *Oncogene* 27, 2978-88.
- McLaughlin F., Ludbrook V.J., Cox J., *et al.* (2001). Combined genomic and antisense analysis reveals that the transcription factor Erg is implicated in endothelial cell differentiation. *Blood* 98, 3332-9.

- McNeal J.E. (1968). Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol* 49, 347-57.
- Meadows S.M., Salanga M.C., Krieg P.A. (2009). Kruppel-like factor 2 cooperates with the ETS family protein ERG to activate Flk1 expression during vascular development. *Development* 136, 1115-25.
- Mehra R., Han B., Tomlins S.A., *et al.* (2007a). Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer Res* 67, 7991-5.
- Mehra R., Tomlins S.A., Shen R., *et al.* (2007b). Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol* 20, 538-44.
- Mehra R., Tomlins S.A., Yu J., *et al.* (2008). Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 68, 3584-90.
- Meisel Sharon S., Pozniak Y., Geiger T., *et al.* (2016). TMPRSS2-ERG fusion protein regulates insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) gene expression in prostate cancer: involvement of transcription factor Sp1. *Oncotarget* 7, 51375-92.
- Menendez J.A. (2010). Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1801, 381-91.
- Merrimen J.L., Evans A.J., Srigley J.R. (2013). Preneoplasia in the prostate gland with emphasis on high grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Pathology* 45, 251-63.
- Metzeler K.H., Dufour A., Benthaus T., *et al.* (2009). ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol* 27, 5031-8.
- Miller K., Moul J.W., Gleave M., *et al.* (2013). Phase III, randomized, placebo-controlled study of once-daily oral zibotentan (ZD4054) in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 16, 187-92.
- Minner S., Enodien M., Sirma H., *et al.* (2011). ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res* 17, 5878-88.
- Miyagawa Y., Okita H., Nakajima H., *et al.* (2008). Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol* 28, 2125-37.
- Mizutani R. and Suzuki Y. (2012). X-ray microtomography in biology. *Micron* 43, 104-15.

- Mochmann L.H., Neumann M., von der Heide E.K., *et al.* (2014). ERG induces a mesenchymal-like state associated with chemoresistance in leukemia cells. *Oncotarget* 5, 351-62.
- Mohamed A.A., Tan S.H., Mikhalkevich N., *et al.* (2010). Ets family protein, erg expression in developing and adult mouse tissues by a highly specific monoclonal antibody. *J Cancer* 1, 197-208.
- Mohamed A.A., Tan S.H., Sun C., *et al.* (2011). ERG oncogene modulates prostaglandin signaling in prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther* 11, 410-7.
- Montgomery R.B., Mostaghel E.A., Vessella R., *et al.* (2008). Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res* 68, 4447-54.
- Montironi R., Mazzucchelli R., Lopez-Beltran A., *et al.* (2011). Prostatic intraepithelial neoplasia: its morphological and molecular diagnosis and clinical significance. *BJU Int* 108, 1394-401.
- Moore S.D., Offor O., Ferry J.A., *et al.* (2006). ELF4 is fused to ERG in a case of acute myeloid leukemia with a t(X;21)(q25-26;q22). *Leuk Res* 30, 1037-42.
- Mosialos G., Birkenbach M., Aychunie S., *et al.* (1996). Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein. *Am J Pathol* 148, 593-600.
- Mosquera J.M., Mehra R., Regan M.M., *et al.* (2009). Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. *Clin Cancer Res* 15, 4706-11.
- Mosquera J.M., Perner S., Demichelis F., *et al.* (2007). Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer. *J Pathol* 212, 91-101.
- Mostaghel E.A. (2014). Abiraterone in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Manag Res* 6, 39-51.
- Moulton K.S., Semple K., Wu H., *et al.* (1994). Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP-1/ets motif. *Mol Cell Biol* 14, 4408-18.
- Mounir Z., Lin F., Lin V.G., *et al.* (2015). TMPRSS2:ERG blocks neuroendocrine and luminal cell differentiation to maintain prostate cancer proliferation. *Oncogene* 34, 3815-25.
- Mullighan C.G., Goorha S., Radtke I., *et al.* (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446, 758-64.
- Mundy G.R. (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2, 584-93.

- Murphy D.A. and Courtneidge S.A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 413-26.
- Nadal R., Schweizer M., Kryvenko O.N., *et al.* (2014). Small cell carcinoma of the prostate. *Nat Rev Urol* 11, 213-9.
- Nagle R.B., Algotar A.M., Cortez C.C., *et al.* (2013). ERG overexpression and PTEN status predict capsular penetration in prostate carcinoma. *Prostate* 73, 1233-40.
- Nakashima T., Hayashi M., Fukunaga T., *et al.* (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17, 1231-4.
- Nam R.K., Sugar L., Wang Z., *et al.* (2007a). Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression. *Cancer Biol Ther* 6, 40-5.
- Nam R.K., Sugar L., Yang W., *et al.* (2007b). Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. *Br J Cancer* 97, 1690-5.
- Narayanan S., Srinivas S., Feldman D. (2016). Androgen-glucocorticoid interactions in the era of novel prostate cancer therapy. *Nat Rev Urol* 13, 47-60.
- Navone N.M., Olive M., Ozen M., *et al.* (1997). Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis. *Clin Cancer Res* 3, 2493-500.
- Nemeth J.A., Harb J.F., Barroso U., Jr., *et al.* (1999). Severe combined immunodeficient-hu model of human prostate cancer metastasis to human bone. *Cancer Res* 59, 1987-93.
- Ng A.P., Loughran S.J., Metcalf D., *et al.* (2011). Erg is required for self-renewal of hematopoietic stem cells during stress hematopoiesis in mice. *Blood* 118, 2454-61.
- Nhili R., Peixoto P., Depauw S., *et al.* (2013). Targeting the DNA-binding activity of the human ERG transcription factor using new heterocyclic dithiophene diamidines. *Nucleic Acids Res* 41, 125-38.
- Nikolova-Krstevski V., Yuan L., Le Bras A., *et al.* (2009). ERG is required for the differentiation of embryonic stem cells along the endothelial lineage. *BMC Dev Biol* 9, 72.
- Nunn M.F., Seeburg P.H., Moscovici C., *et al.* (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306, 391-5.
- Offermanns S. (2017). Hydroxy-Carboxylic Acid Receptor Actions in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 28, 227-36.
- Offermanns S., Colletti S.L., Lovenberg T.W., *et al.* (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXII: Nomenclature and Classification of Hydroxy-carboxylic Acid Receptors (GPR81, GPR109A, and GPR109B). *Pharmacol Rev* 63, 269-90.

- Ohno T., Ouchida M., Lee L., *et al.* (1994). The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene* 9, 3087-97.
- Oikawa T. and Yamada T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303, 11-34.
- Ottewell P.D. (2016). The role of osteoblasts in bone metastasis. *J Bone Oncol* 5, 124-7.
- Ottewell P.D., Wang N., Meek J., *et al.* (2014). Castration-induced bone loss triggers growth of disseminated prostate cancer cells in bone. *Endocr Relat Cancer* 21, 769-81.
- Otto J.J., Kane R.E., Bryan J. (1979). Formation of filopodia in coelomocytes: localization of fascin, a 58,000 dalton actin cross-linking protein. *Cell* 17, 285-93.
- Owczarek C.M., Portbury K.J., Hardy M.P., *et al.* (2004). Detailed mapping of the ERG-ETS2 interval of human chromosome 21 and comparison with the region of conserved synteny on mouse chromosome 16. *Gene* 324, 65-77.
- Ozdemir B.C., Hensel J., Secondini C., *et al.* (2014). The molecular signature of the stroma response in prostate cancer-induced osteoblastic bone metastasis highlights expansion of hematopoietic and prostate epithelial stem cell niches. *PLoS One* 9, e114530.
- Paget S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 571-573.
- Palanisamy N., Ateeq B., Kalyana-Sundaram S., *et al.* (2010). Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. *Nat Med* 16, 793-8.
- Pan J., Zou J., Wu D.Y., *et al.* (2008). TLS-ERG leukemia fusion protein deregulates cyclin-dependent kinase 1 and blocks terminal differentiation of myeloid progenitor cells. *Mol Cancer Res* 6, 862-72.
- Panagopoulos I., Aman P., Fioretos T., *et al.* (1994). Fusion of the FUS gene with ERG in acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). *Genes Chromosomes Cancer* 11, 256-62.
- Parimi V., Goyal R., Poropatich K., *et al.* (2014). Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *Am J Clin Exp Urol* 2, 273-85.
- Park S.I., Kim S.J., McCauley L.K., *et al.* (2010). Pre-clinical mouse models of human prostate cancer and their utility in drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 14, Unit 14 5.
- Parker C., Nilsson S., Heinrich D., *et al.* (2013). Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 369, 213-23.
- Paulo P., Barros-Silva J.D., Ribeiro F.R., *et al.* (2012). FLI1 is a novel ETS transcription factor involved in gene fusions in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 240-9.

- Peraldo-Neia C., Migliardi G., Mello-Grand M., *et al.* (2011). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer* 11, 31.
- Perner S., Demichelis F., Beroukhim R., *et al.* (2006). TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 66, 8337-41.
- Perner S., Mosquera J.M., Demichelis F., *et al.* (2007). TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol* 31, 882-8.
- Peter M., Couturier J., Pacquement H., *et al.* (1997). A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene* 14, 1159-64.
- Petermann R., Mossier B.M., Aryee D.N., *et al.* (1998). Oncogenic EWS-Fli1 interacts with hsRPB7, a subunit of human RNA polymerase II. *Oncogene* 17, 603-10.
- Petrovics G., Liu A., Shaheduzzaman S., *et al.* (2005). Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 24, 3847-52.
- Pettaway C.A., Pathak S., Greene G., *et al.* (1996). Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. *Clin Cancer Res* 2, 1627-36.
- Pflueger D., Rickman D.S., Sboner A., *et al.* (2009). N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) is fused to ERG in prostate cancer. *Neoplasia* 11, 804-11.
- Pimanda J.E., Chan W.Y., Donaldson I.J., *et al.* (2006). Endoglin expression in the endothelium is regulated by Fli-1, Erg, and Elf-1 acting on the promoter and a -8-kb enhancer. *Blood* 107, 4737-45.
- Prasad D.D., Rao V.N., Lee L., *et al.* (1994). Differentially spliced erg-3 product functions as a transcriptional activator. *Oncogene* 9, 669-73.
- Puhaindran M.E., Farooki A., Steensma M.R., *et al.* (2011). Atypical subtrochanteric femoral fractures in patients with skeletal malignant involvement treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Joint Surg Am* 93, 1235-42.
- Qiao L., Liang Y., Li N., *et al.* (2015). Endothelin-A receptor antagonists in prostate cancer treatment-a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8, 3465-73.
- Rahim S., Beauchamp E.M., Kong Y., *et al.* (2011). YK-4-279 inhibits ERG and ETV1 mediated prostate cancer cell invasion. *PLoS One* 6, e19343.
- Rainis L., Toki T., Pimanda J.E., *et al.* (2005). The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. *Cancer Res* 65, 7596-602.
- Rajan P., Stockley J., Sudbery I.M., *et al.* (2014). Identification of a candidate prognostic gene signature by transcriptome analysis of matched pre- and post-treatment prostatic biopsies from patients with advanced prostate cancer. *BMC Cancer* 14, 977.

- Rajput A.B., Miller M.A., De Luca A., *et al.* (2007). Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *J Clin Pathol* 60, 1238-43.
- Randi A.M., Sperone A., Dryden N.H., *et al.* (2009). Regulation of angiogenesis by ETS transcription factors. *Biochem Soc Trans* 37, 1248-53.
- Rao V.N., Modi W.S., Drabkin H.D., *et al.* (1988). The human *erg* gene maps to chromosome 21, band q22: relationship to the 8; 21 translocation of acute myelogenous leukemia. *Oncogene* 3, 497-500.
- Rao V.N., Ohno T., Prasad D.D., *et al.* (1993). Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation functions of human Fli-1 protein. *Oncogene* 8, 2167-73.
- Rao V.N., Papas T.S., Reddy E.S. (1987). *erg*, a human *ets*-related gene on chromosome 21: alternative splicing, polyadenylation, and translation. *Science* 237, 635-9.
- Reddy E.S. and Rao V.N. (1991). *erg*, an *ets*-related gene, codes for sequence-specific transcriptional activators. *Oncogene* 6, 2285-9.
- Reddy E.S., Rao V.N., Papas T.S. (1987). The *erg* gene: a human gene related to the *ets* oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6131-5.
- Regan M.C., Horanyi P.S., Pryor E.E., Jr., *et al.* (2013). Structural and dynamic studies of the transcription factor ERG reveal DNA binding is allosterically autoinhibited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 13374-9.
- Ribeiro F.R., Paulo P., Costa V.L., *et al.* (2011). Cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP3) is strongly up-regulated in prostate carcinomas with the TMPRSS2-ERG fusion gene. *PLoS One* 6, e22317.
- Rickman D.S., Chen Y.B., Banerjee S., *et al.* (2010). ERG cooperates with androgen receptor in regulating trefoil factor 3 in prostate cancer disease progression. *Neoplasia* 12, 1031-40.
- Rickman D.S., Pflueger D., Moss B., *et al.* (2009). SLC45A3-ELK4 is a novel and frequent erythroblast transformation-specific fusion transcript in prostate cancer. *Cancer Res* 69, 2734-8.
- Rickman D.S., Soong T.D., Moss B., *et al.* (2012). Oncogene-mediated alterations in chromatin conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9083-8.
- Riggi N., Cironi L., Provero P., *et al.* (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 65, 11459-68.
- Riggi N. and Stamenkovic I. (2007). The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 254, 1-10.
- Rivera R.R., Stuver M.H., Steenbergen R., *et al.* (1993). *Ets* proteins: new factors that regulate immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Mol Cell Biol* 13, 7163-9.

- Robert G., Jannink S., Smit F., *et al.* (2013). Rational basis for the combination of PCA3 and TMPRSS2:ERG gene fusion for prostate cancer diagnosis. *Prostate* 73, 113-20.
- Robinson D., Van Allen E.M., Wu Y.M., *et al.* (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 161, 1215-28.
- Roland C.L., Arumugam T., Deng D., *et al.* (2014). Cell surface lactate receptor GPR81 is crucial for cancer cell survival. *Cancer Res* 74, 5301-10.
- Roodman G.D. (2004). Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 350, 1655-64.
- Rosol T.J., Tannehill-Gregg S.H., LeRoy B.E., *et al.* (2003). Animal models of bone metastasis. *Cancer* 97, 748-57.
- Ross R., Ross X.L., Schwing J., *et al.* (1998). The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 160, 3776-82.
- Roudier M.P., Vesselle H., True L.D., *et al.* (2003). Bone histology at autopsy and matched bone scintigraphy findings in patients with hormone refractory prostate cancer: the effect of bisphosphonate therapy on bone scintigraphy results. *Clin Exp Metastasis* 20, 171-80.
- Rouzier C., Haudebourg J., Carpentier X., *et al.* (2008). Detection of the TMPRSS2-ETS fusion gene in prostate carcinomas: retrospective analysis of 55 formalin-fixed and paraffin-embedded samples with clinical data. *Cancer Genet Cytogenet* 183, 21-7.
- Roy A.K., Lavrovsky Y., Song C.S., *et al.* (1999). Regulation of androgen action. *Vitam Horm* 55, 309-52.
- Rubin M.A. and Chinnaiyan A.M. (2006). Bioinformatics approach leads to the discovery of the TMPRSS2:ETS gene fusion in prostate cancer. *Lab Invest* 86, 1099-102.
- Rubin M.A., Maher C.A., Chinnaiyan A.M. (2011). Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol* 29, 3659-68.
- Rubin M.A., Putzi M., Mucci N., *et al.* (2000). Rapid ("warm") autopsy study for procurement of metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6, 1038-45.
- Saad F. and Hotte S.J. (2010). Guidelines for the management of castrate-resistant prostate cancer. *Can Urol Assoc J* 4, 380-4.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-25.
- Salek-Ardakani S., Smooha G., de Boer J., *et al.* (2009). ERG is a megakaryocytic oncogene. *Cancer Res* 69, 4665-73.
- San-Millan I. and Brooks G.A. (2016). Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*

- Sandberg A.A. and Bridge J.A. (2000). Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 123, 1-26.
- Sankar S. and Lessnick S.L. (2011). Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet* 204, 351-65.
- Saramaki O.R., Harjula A.E., Martikainen P.M., *et al.* (2008). TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res* 14, 3395-400.
- Schachterle W., Rojas A., Xu S.M., *et al.* (2012). ETS-dependent regulation of a distal Gata4 cardiac enhancer. *Dev Biol* 361, 439-49.
- Schneikert J., Lutz Y., Wasylyk B. (1992). Two independent activation domains in c-Ets-1 and c-Ets-2 located in non-conserved sequences of the ets gene family. *Oncogene* 7, 249-56.
- Schroder F.H., Hugosson J., Roobol M.J., *et al.* (2009). Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 360, 1320-8.
- Schwachtgen J.L., Janel N., Barek L., *et al.* (1997). Ets transcription factors bind and transactivate the core promoter of the von Willebrand factor gene. *Oncogene* 15, 3091-102.
- Seidel J.J. and Graves B.J. (2002). An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors. *Genes Dev* 16, 127-37.
- Selman S.H. (2011). The McNeal prostate: a review. *Urology* 78, 1224-8.
- Selvaraj N., Kedage V., Hollenhorst P.C. (2015). Comparison of MAPK specificity across the ETS transcription factor family identifies a high-affinity ERK interaction required for ERG function in prostate cells. *Cell Commun Signal* 13, 12.
- Seth A. and Watson D.K. (2005). ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 41, 2462-78.
- Setlur S.R., Mertz K.D., Hoshida Y., *et al.* (2008). Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 100, 815-25.
- Shafi A.A., Yen A.E., Weigel N.L. (2013). Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Ther* 140, 223-38.
- Shah A.V., Birdsey G.M., Randi A.M. (2016). Regulation of endothelial homeostasis, vascular development and angiogenesis by the transcription factor ERG. *Vascul Pharmacol* 86, 3-13.
- Shahinian V.B., Kuo Y.F., Freeman J.L., *et al.* (2005). Risk of fracture after androgen deprivation for prostate cancer. *N Engl J Med* 352, 154-64.

- Shappell S.B., Thomas G.V., Roberts R.L., *et al.* (2004). Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res* 64, 2270-305.
- Sharma N.L., Massie C.E., Butter F., *et al.* (2014). The ETS family member GABPalph modulates androgen receptor signalling and mediates an aggressive phenotype in prostate cancer. *Nucleic Acids Res* 42, 6256-69.
- Sharrocks A.D. (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 827-37.
- Shimizu K., Ichikawa H., Tojo A., *et al.* (1993). An ets-related gene, ERG, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10280-4.
- Shiozawa Y., Havens A.M., Jung Y., *et al.* (2008). Annexin II/annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer. *J Cell Biochem* 105, 370-80.
- Shiozawa Y., Pedersen E.A., Havens A.M., *et al.* (2011). Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest* 121, 1298-312.
- Shiozawa Y., Pedersen E.A., Patel L.R., *et al.* (2010). GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia* 12, 116-27.
- Shtivelman E. and Namikawa R. (1995). Species-specific metastasis of human tumor cells in the severe combined immunodeficiency mouse engrafted with human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4661-5.
- Shwartz A., Yogev S., Schejter E.D., *et al.* (2013). Sequential activation of ETS proteins provides a sustained transcriptional response to EGFR signaling. *Development* 140, 2746-54.
- Siddique H.R., Rao V.N., Lee L., *et al.* (1993). Characterization of the DNA binding and transcriptional activation domains of the erg protein. *Oncogene* 8, 1751-5.
- Simmons J.K., Hildreth B.E., 3rd, Supsavhad W., *et al.* (2015). Animal Models of Bone Metastasis. *Vet Pathol* 52, 827-41.
- Singareddy R., Semaan L., Conley-Lacomb M.K., *et al.* (2013). Transcriptional regulation of CXCR4 in prostate cancer: significance of TMPRSS2-ERG fusions. *Mol Cancer Res* 11, 1349-61.
- Singh A.S. and Figg W.D. (2005). In vivo models of prostate cancer metastasis to bone. *J Urol* 174, 820-6.
- Siolas D. and Hannon G.J. (2013). Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res* 73, 5315-9.

- Slupsky C.M., Gentile L.N., Donaldson L.W., *et al.* (1998). Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12129-34.
- Smith M.R., Lee W.C., Brandman J., *et al.* (2005). Gonadotropin-releasing hormone agonists and fracture risk: a claims-based cohort study of men with nonmetastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 23, 7897-903.
- Soller M.J., Isaksson M., Elfving P., *et al.* (2006). Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 717-9.
- Sonveaux P., Vegran F., Schroeder T., *et al.* (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118, 3930-42.
- Sorensen P.H., Lessnick S.L., Lopez-Terrada D., *et al.* (1994). A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* 6, 146-51.
- Sosa M.S., Bragado P., Aguirre-Ghiso J.A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 14, 611-22.
- Spencer E.S., Johnston R.B., Gordon R.R., *et al.* (2013). Prognostic value of ERG oncoprotein in prostate cancer recurrence and cause-specific mortality. *Prostate* 73, 905-12.
- Sperone A., Dryden N.H., Birdsey G.M., *et al.* (2011). The transcription factor Erg inhibits vascular inflammation by repressing NF-kappaB activation and proinflammatory gene expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 142-50.
- Sreenath T.L., Dobi A., Petrovics G., *et al.* (2011). Oncogenic activation of ERG: A predominant mechanism in prostate cancer. *J Carcinog* 10, 37.
- Staege M.S., Hutter C., Neumann I., *et al.* (2004). DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 64, 8213-21.
- Staubert C., Broom O.J., Nordstrom A. (2015). Hydroxycarboxylic acid receptors are essential for breast cancer cells to control their lipid/fatty acid metabolism. *Oncotarget* 6, 19706-20.
- Steeg P.S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12, 895-904.
- Steinkamp M.P., O'Mahony O.A., Brogley M., *et al.* (2009). Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res* 69, 4434-42.
- Sternberg C.N. (2008). Systemic chemotherapy and new experimental approaches in the treatment of metastatic prostate cancer. *Ann Oncol* 19 Suppl 7, vii91-5.

- Stone K.R., Mickey D.D., Wunderli H., *et al.* (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21, 274-81.
- Sun C., Dobi A., Mohamed A., *et al.* (2008). TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation. *Oncogene* 27, 5348-53.
- Sun S., Sprenger C.C., Vessella R.L., *et al.* (2010a). Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest* 120, 2715-30.
- Sun W., Yan Q., Vida T.A., *et al.* (2003). Hrs regulates early endosome fusion by inhibiting formation of an endosomal SNARE complex. *J Cell Biol* 162, 125-37.
- Sun X., Cheng G., Hao M., *et al.* (2010b). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 29, 709-22.
- Sun Y.X., Fang M., Wang J., *et al.* (2007). Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXCL12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells. *Prostate* 67, 61-73.
- Sun Y.X., Schneider A., Jung Y., *et al.* (2005). Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J Bone Miner Res* 20, 318-29.
- Taichman R.S., Cooper C., Keller E.T., *et al.* (2002). Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 62, 1832-7.
- Taichman R.S., Patel L.R., Bedenis R., *et al.* (2013). GAS6 receptor status is associated with dormancy and bone metastatic tumor formation. *PLoS One* 8, e61873.
- Tallon L., Luangphakdy D., Ruffion A., *et al.* (2014). Comparative evaluation of urinary PCA3 and TMPRSS2: ERG scores and serum PHI in predicting prostate cancer aggressiveness. *Int J Mol Sci* 15, 13299-316.
- Tan V.Y., Lewis S.J., Adams J.C., *et al.* (2013). Association of fascin-1 with mortality, disease progression and metastasis in carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 11, 52.
- Tannehill-Gregg S.H., Levine A.L., Nadella M.V., *et al.* (2006). The effect of zoledronic acid and osteoprotegerin on growth of human lung cancer in the tibias of nude mice. *Clin Exp Metastasis* 23, 19-31.
- Tannock I.F., de Wit R., Berry W.R., *et al.* (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351, 1502-12.
- Taoudi S., Bee T., Hilton A., *et al.* (2011). ERG dependence distinguishes developmental control of hematopoietic stem cell maintenance from hematopoietic specification. *Genes Dev* 25, 251-62.

- Taplin M.E., Bubley G.J., Shuster T.D., *et al.* (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 332, 1393-8.
- Taylor B.S., Schultz N., Hieronymus H., *et al.* (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11-22.
- Teng L.H., Wang C., Dolph M., *et al.* (2013). ERG Protein Expression Is of Limited Prognostic Value in Men with Localized Prostate Cancer. *ISRN Urol* 2013, 786545.
- Tentler J.J., Tan A.C., Weekes C.D., *et al.* (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 338-50.
- Thalmann G.N., Anezinis P.E., Chang S.M., *et al.* (1994). Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res* 54, 2577-81.
- Thalmann G.N., Sikes R.A., Wu T.T., *et al.* (2000). LNCaP progression model of human prostate cancer: androgen-independence and osseous metastasis. *Prostate* 44, 91-103 Jul 1;44(2).
- Thangapazham R., Saenz F., Katta S., *et al.* (2014). Loss of the NKX3.1 tumorsuppressor promotes the TMPRSS2-ERG fusion gene expression in prostate cancer. *BMC Cancer* 14, 16.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-80.
- Thoms J.A., Birger Y., Foster S., *et al.* (2011). ERG promotes T-acute lymphoblastic leukemia and is transcriptionally regulated in leukemic cells by a stem cell enhancer. *Blood* 117, 7079-89.
- Tian T.V., Tomavo N., Huot L., *et al.* (2014). Identification of novel TMPRSS2:ERG mechanisms in prostate cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2. *Oncogene* 33, 2204-14.
- Tirode F., Laud-Duval K., Prieur A., *et al.* (2007). Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11, 421-9.
- Tomlins S.A., Bjartell A., Chinnaiyan A.M., *et al.* (2009). ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur Urol* 56, 275-86.
- Tomlins S.A., Laxman B., Dhanasekaran S.M., *et al.* (2007a). Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 448, 595-9.
- Tomlins S.A., Laxman B., Varambally S., *et al.* (2008). Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 10, 177-88.
- Tomlins S.A., Mehra R., Rhodes D.R., *et al.* (2007b). Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* 39, 41-51.

- Tomlins S.A., Mehra R., Rhodes D.R., *et al.* (2006). TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 66, 3396-400.
- Tomlins S.A., Rhodes D.R., Perner S., *et al.* (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644-8.
- Toubaji A., Albadine R., Meekeer A.K., *et al.* (2011). Increased gene copy number of ERG on chromosome 21 but not TMPRSS2-ERG fusion predicts outcome in prostatic adenocarcinomas. *Mod Pathol* 24, 1511-20.
- Tsingotjidou A.S., Zotalis G., Jackson K.R., *et al.* (2001). Development of an animal model for prostate cancer cell metastasis to adult human bone. *Anticancer Res* 21, 971-8.
- Tso C.L., McBride W.H., Sun J., *et al.* (2000). Androgen deprivation induces selective outgrowth of aggressive hormone-refractory prostate cancer clones expressing distinct cellular and molecular properties not present in parental androgen-dependent cancer cells. *Cancer J* 6, 220-33.
- Tsourlakis M.C., Weigand P., Grupp K., *et al.* (2014). betaIII-tubulin overexpression is an independent predictor of prostate cancer progression tightly linked to ERG fusion status and PTEN deletion. *Am J Pathol* 184, 609-17.
- Tsuzuki S., Taguchi O., Seto M. (2011). Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood* 117, 3858-68.
- Tu J.J., Rohan S., Kao J., *et al.* (2007). Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 20, 921-8.
- Tunaru S., Lattig J., Kero J., *et al.* (2005). Characterization of determinants of ligand binding to the nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A/PUMA-G). *Mol Pharmacol* 68, 1271-80.
- Urano F., Umezawa A., Yabe H., *et al.* (1998). Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, EWS-E1AF, available for diagnosis. *Jpn J Cancer Res* 89, 703-11.
- Vakaet L.A. and Boterberg T. (2004). Pain control by ionizing radiation of bone metastasis. *Int J Dev Biol* 48, 599-606.
- Valeri A., Drelon E., Azzouzi R., *et al.* (1999). [Epidemiology of familial prostatic cancer: 4-year assessment of French studies]. *Prog Urol* 9, 672-9.
- Valk P.J., Verhaak R.G., Beijnen M.A., *et al.* (2004). Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350, 1617-28.
- Valkenburg K.C., Steensma M.R., Williams B.O., *et al.* (2013). Skeletal metastasis: treatments, mouse models, and the Wnt signaling. *Chin J Cancer* 32, 380-96.
- Valkenburg K.C. and Williams B.O. (2011). Mouse models of prostate cancer. *Prostate Cancer* 2011, 895238.

- Van Audenhove I., Boucherie C., Pieters L., *et al.* (2014). Stratifying fascin and cortactin function in invadopodium formation using inhibitory nanobodies and targeted subcellular delocalization. *FASEB J* 28, 1805-18.
- Varambally S., Yu J., Laxman B., *et al.* (2005). Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression. *Cancer Cell* 8, 393-406.
- Velaeti S., Dimitriadis E., Kontogianni-Katsarou K., *et al.* (2014). Detection of TMPRSS2-ERG fusion gene in benign prostatic hyperplasia. *Tumour Biol* 35, 9597-602.
- Veldscholte J., Ris-Stalpers C., Kuiper G.G., *et al.* (1990a). A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 534-40.
- Veldscholte J., Voorhorst-Ogink M.M., Bolt-de Vries J., *et al.* (1990b). Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: high affinity for progestagenic and estrogenic steroids. *Biochim Biophys Acta* 1052, 187-94.
- Verger A., Buisine E., Carrere S., *et al.* (2001). Identification of amino acid residues in the ETS transcription factor Erg that mediate Erg-Jun/Fos-DNA ternary complex formation. *J Biol Chem* 276, 17181-9.
- Verger A. and Duterque-Coquillaud M. (2002). When Ets transcription factors meet their partners. *Bioessays* 24, 362-70.
- Vijayaraj P., Le Bras A., Mitchell N., *et al.* (2012). Erg is a crucial regulator of endocardial-mesenchymal transformation during cardiac valve morphogenesis. *Development* 139, 3973-85.
- Visakorpi T., Hyytinen E., Koivisto P., *et al.* (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 9, 401-6.
- Vlachostergios P.J., Puca L., Beltran H. (2017). Emerging Variants of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep* 19, 32.
- Vlaeminck-Guillem V., Carrere S., Dewitte F., *et al.* (2000). The Ets family member Erg gene is expressed in mesodermal tissues and neural crests at fundamental steps during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 91, 331-5.
- Vlaeminck-Guillem V., Devonec M., Champetier D., *et al.* (2015). Urinary PCA3 to predict prostate cancer in a cohort of 1015 patients. *Prog Urol* 25, 1160-8, e1-8.
- Vlaeminck-Guillem V., Vanacker J.M., Verger A., *et al.* (2003). Mutual repression of transcriptional activation between the ETS-related factor ERG and estrogen receptor. *Oncogene* 22, 8072-84.
- Wagner W., Ciszewski W.M., Kania K.D. (2015). L- and D-lactate enhance DNA repair and modulate the resistance of cervical carcinoma cells to anticancer drugs via histone deacetylase inhibition and hydroxycarboxylic acid receptor 1 activation. *Cell Commun Signal* 13, 36.

- Wagner W., Kania K.D., Ciszewski W.M. (2017). Stimulation of lactate receptor (HCAR1) affects cellular DNA repair capacity. *DNA Repair (Amst)* 52, 49-58.
- Walenta S., Wetterling M., Lehrke M., *et al.* (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60, 916-21.
- Wanders D., Graff E.C., Judd R.L. (2012). Effects of high fat diet on GPR109A and GPR81 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 278-83.
- Wang H., Yu C., Gao X., *et al.* (2015). The osteogenic niche promotes early-stage bone colonization of disseminated breast cancer cells. *Cancer Cell* 27, 193-210.
- Wang J., Cai Y., Ren C., *et al.* (2006). Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 66, 8347-51.
- Wang J., Cai Y., Yu W., *et al.* (2008). Pleiotropic biological activities of alternatively spliced TMPRSS2/ERG fusion gene transcripts. *Cancer Res* 68, 8516-24.
- Wang N., Docherty F.E., Brown H.K., *et al.* (2014a). Prostate cancer cells preferentially home to osteoblast-rich areas in the early stages of bone metastasis: evidence from in vivo models. *J Bone Miner Res* 29, 2688-96.
- Wang Q., Li W., Zhang Y., *et al.* (2009). Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell* 138, 245-56.
- Wang S., Kollipara R.K., Srivastava N., *et al.* (2014b). Ablation of the oncogenic transcription factor ERG by deubiquitinase inhibition in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 4251-6.
- Wang X., Qiao Y., Asangani I.A., *et al.* (2017). Development of Peptidomimetic Inhibitors of the ERG Gene Fusion Product in Prostate Cancer. *Cancer Cell* 31, 532-48 e7.
- Warburg O. (1925). Iron, the Oxygen-Carrier of Respiration-Ferment. *Science* 61, 575-82.
- Warner J.K., Wang J.C., Takenaka K., *et al.* (2005). Direct evidence for cooperating genetic events in the leukemic transformation of normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 19, 1794-805.
- Watson P.A., Arora V.K., Sawyers C.L. (2015). Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 15, 701-11.
- Wei G.H., Badis G., Berger M.F., *et al.* (2010). Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. *EMBO J* 29, 2147-60.
- Weilbaecher K.N., Guise T.A., McCauley L.K. (2011). Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 11, 411-25.

- Werbeck J.L., Thudi N.K., Martin C.K., *et al.* (2014). Tumor microenvironment regulates metastasis and metastasis genes of mouse MMTV-PyMT mammary cancer cells in vivo. *Vet Pathol* 51, 868-81.
- Whittemore A.S., Kolonel L.N., Wu A.H., *et al.* (1995). Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* 87, 652-61.
- Wilson N.K., Foster S.D., Wang X., *et al.* (2010). Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* 7, 532-44.
- Winnes M., Lissbrant E., Damber J.E., *et al.* (2007). Molecular genetic analyses of the TMPRSS2-ERG and TMPRSS2-ETV1 gene fusions in 50 cases of prostate cancer. *Oncol Rep* 17, 1033-6.
- Wolf I.M., Heitzer M.D., Grubisha M., *et al.* (2008). Coactivators and nuclear receptor transactivation. *J Cell Biochem* 104, 1580-6.
- Wright M.E., Tsai M.J., Aebbersold R. (2003). Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* 17, 1726-37.
- Wu D., Zhang C., Shen Y., *et al.* (2011). Androgen receptor-driven chromatin looping in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* 22, 474-80.
- Wu H.C., Hsieh J.T., Gleave M.E., *et al.* (1994). Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer* 57, 406-12.
- Wu T.T., Sikes R.A., Cui Q., *et al.* (1998). Establishing human prostate cancer cell xenografts in bone: induction of osteoblastic reaction by prostate-specific antigen-producing tumors in athymic and SCID/bg mice using LNCaP and lineage-derived metastatic sublines. *Int J Cancer* 77, 887-94.
- Xiao L., Lanz R.B., Frolov A., *et al.* (2016). The Germ Cell Gene TDRD1 as an ERG Target Gene and a Novel Prostate Cancer Biomarker. *Prostate* 76, 1271-84.
- Xin L., Teitell M.A., Lawson D.A., *et al.* (2006). Progression of prostate cancer by synergy of AKT with genotropic and nongenotropic actions of the androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7789-94.
- Xiong J., Onal M., Jilka R.L., *et al.* (2011). Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 17, 1235-41.
- Yamaguchi T., Chattopadhyay N., Kifor O., *et al.* (2001). Expression of extracellular calcium-sensing receptor in human osteoblastic MG-63 cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C382-93.
- Yamakita Y., Matsumura F., Yamashiro S. (2009). Fascin1 is dispensable for mouse development but is favorable for neonatal survival. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 524-34.

- Yang L., Mei Q., Zielinska-Kwiatkowska A., *et al.* (2003). An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B. *Biochem J* 369, 651-7.
- Yang L., Xia L., Wu D.Y., *et al.* (2002). Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene* 21, 148-52.
- Yano S., Macleod R.J., Chattopadhyay N., *et al.* (2004). Calcium-sensing receptor activation stimulates parathyroid hormone-related protein secretion in prostate cancer cells: role of epidermal growth factor receptor transactivation. *Bone* 35, 664-72.
- Yaskiv O., Zhang X., Simmerman K., *et al.* (2011). The utility of ERG/P63 double immunohistochemical staining in the diagnosis of limited cancer in prostate needle biopsies. *Am J Surg Pathol* 35, 1062-8.
- Yepuru M., Wu Z., Kulkarni A., *et al.* (2013). Steroidogenic enzyme AKR1C3 is a novel androgen receptor-selective coactivator that promotes prostate cancer growth. *Clin Cancer Res* 19, 5613-25.
- Yonou H., Yokose T., Kamijo T., *et al.* (2001). Establishment of a novel species- and tissue-specific metastasis model of human prostate cancer in humanized non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice engrafted with human adult lung and bone. *Cancer Res* 61, 2177-82.
- Yoshimoto M., Joshua A.M., Chilton-Macneill S., *et al.* (2006). Three-color FISH analysis of TMPRSS2/ERG fusions in prostate cancer indicates that genomic microdeletion of chromosome 21 is associated with rearrangement. *Neoplasia* 8, 465-9.
- Yoshimoto M., Joshua A.M., Cunha I.W., *et al.* (2008). Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Mod Pathol* 21, 1451-60.
- Yu E.Y., Miller K., Nelson J., *et al.* (2012). Detection of previously unidentified metastatic disease as a leading cause of screening failure in a phase III trial of zibotentan versus placebo in patients with nonmetastatic, castration resistant prostate cancer. *J Urol* 188, 103-9.
- Yu J., Yu J., Mani R.S., *et al.* (2010). An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* 17, 443-54.
- Yu Y.P., Landsittel D., Jing L., *et al.* (2004). Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol* 22, 2790-9.
- Yuan L., Le Bras A., Sacharidou A., *et al.* (2012). ETS-related gene (ERG) controls endothelial cell permeability via transcriptional regulation of the claudin 5 (CLDN5) gene. *J Biol Chem* 287, 6582-91.

- Yuan L., Nikolova-Krstevski V., Zhan Y., *et al.* (2009). Antiinflammatory effects of the ETS factor ERG in endothelial cells are mediated through transcriptional repression of the interleukin-8 gene. *Circ Res* 104, 1049-57.
- Yuan L., Sacharidou A., Stratman A.N., *et al.* (2011). RhoJ is an endothelial cell-restricted Rho GTPase that mediates vascular morphogenesis and is regulated by the transcription factor ERG. *Blood* 118, 1145-53.
- Zammarchi F., Boutsalis G., Cartegni L. (2013). 5' UTR control of native ERG and of Tmprss2:ERG variants activity in prostate cancer. *PLoS One* 8, e49721.
- Zhang F.R., Tao L.H., Shen Z.Y., *et al.* (2008). Fascin expression in human embryonic, fetal, and normal adult tissue. *J Histochem Cytochem* 56, 193-9.
- Zhang J., Niu C., Ye L., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-41.
- Zhang Y., Gong M., Yuan H., *et al.* (2012). Chimeric transcript generated by cis-splicing of adjacent genes regulates prostate cancer cell proliferation. *Cancer Discov* 2, 598-607.
- Zhao X.Y., Boyle B., Krishnan A.V., *et al.* (1999). Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. *J Urol* 162, 2192-9.
- Zhao X.Y., Malloy P.J., Krishnan A.V., *et al.* (2000). Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat Med* 6, 703-6.
- Zheng Y., Zhou H., Ooi L.L., *et al.* (2011). Vitamin D deficiency promotes prostate cancer growth in bone. *Prostate* 71, 1012-21.
- Zong Y., Xin L., Goldstein A.S., *et al.* (2009). ETS family transcription factors collaborate with alternative signaling pathways to induce carcinoma from adult murine prostate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12465-70.
- Zoubek A., Pflaiderer C., Salzer-Kuntschik M., *et al.* (1994). Variability of EWS chimaeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data. *Br J Cancer* 70, 908-13.
- Zucman J., Melot T., Desmaze C., *et al.* (1993). Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* 12, 4481-7.
- Zumsteg Z.S. and Zelefsky M.J. (2012). Short-term androgen deprivation therapy for patients with intermediate-risk prostate cancer undergoing dose-escalated radiotherapy: the standard of care? *Lancet Oncol* 13, e259-69.