



**HAL**  
open science

# Etude des gènes réprimés par le récepteur aux androgènes dans les cancers de la prostate résistants à la castration et leur évolution neuroendocrine

Anthony Turpin

## ► To cite this version:

Anthony Turpin. Etude des gènes réprimés par le récepteur aux androgènes dans les cancers de la prostate résistants à la castration et leur évolution neuroendocrine. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS012 . tel-04053048

**HAL Id: tel-04053048**

**<https://theses.hal.science/tel-04053048>**

Submitted on 31 Mar 2023

**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

**ETUDE DES GENES REPRIMES PAR LE RECEPTEUR AUX ANDROGENES  
DANS LES CANCERS DE LA PROSTATE RESISTANTS A LA CASTRATION ET  
LEUR EVOLUTION NEUROENDOCRINE**

Présentée et soutenue publiquement par

**Anthony TURPIN**

A Lille, le 30 Mars 2021

**Composition du jury :**

Pr Gaëlle FROMONT-HANKARD	Rapporteur
Dr Jocelyn CERALINE	Rapporteur
Pr Karim FIZAZI	Examineur
Dr Céline DELLOYE-BOURGEOIS	Examineur
Dr Yvan DE LAUNOIT	Examineur
Dr Martine DUTERQUE-COQUILLAUD	Directeur de thèse
Pr Arnauld VILLERS	Président du Jury

**CNRS UMR9020, INSERM UMR1277, University of Lille, Institut Pasteur, Lille, France**  
**CANTHER: Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies**

“Eat a live frog first thing in the morning and nothing worse will happen to you the rest of the day.”

Mark Twain

“Success is stumbling from failure to failure with no loss of enthusiasm.”

Winston S Churchill

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation et réussite de ce travail. **Merci à tous !**

Merci aux membres du jury d'avoir spontanément accepté d'évaluer mon travail, au Professeur Arnauld Villers d'avoir accepté de présider ce jury, au Professeur Gaëlle Fromont-Hankard et Docteur Jocelyn Céraline d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, et au Professeur Karim Fizazi, Docteurs Céline Delloye-Bourgeois et Yvan de Launoit et d'avoir accepté d'être examinateurs. Merci en particulier aux membres du Jury extérieurs à Lille d'être en visioconférence, crise sanitaire oblige. Ce travail de thèse pourrait constituer un point de départ à une discussion future sur ce sujet au caractère pluridisciplinaire et translationnel.

Merci à l'équipe d'oncologie médicale du CHU de Lille et notamment à mes collègues Anne Ploquin, Christophe Desauw, Nicolas Bertrand pour leur constant soutien et aussi pour la gestion et le suivi des patients d'oncologie lors de mon temps universitaire. Sans votre engagement au quotidien auprès des patients, cette thèse n'aurait pu aboutir.

Merci aux Masters 2 de la « filière » oncologique. Pauline Parent, Hortense Chevalier et Apolline Monfilliette. La qualité de votre travail, la réussite de vos manips, ou par moment les échecs ☺...nos nombreuses discussions scientifiques mais pas que...ont façonné ce travail de thèse. Un grand bravo pour votre super parcours et merci d'avoir choisi l'équipe ETS. Et je n'oublie pas Enora Vauléon pour la qualité de son travail pendant l'année recherche et tout au long de son parcours en oncologie.

Merci aux internes d'anatomopathologie ayant osé passer en recherche fondamentale le temps d'un semestre. Tristan pour les ChIP, la mise en forme des immunohisto et ta bonne humeur au quotidien. Cyprien pour ta sérénité, ta patte à western-blot et à immunoprécipitations. Et aussi pour avoir anobli l'équipe en quelque sorte...grâce à toi beaucoup de nouveaux Lords et Ladies sont venus de France.

Merci à Nathalie Vanpouille, ton enthousiasme constant, ta positive attitude vivifiante et réflexion scientifique de qualité autour du design de manips ont été de précieux atouts tout au long de cette thèse.

Merci à Anne-Claire Flourens, pour ta patience et la pédagogie dont tu fais preuve, non sans humour, auprès des différents étudiants qui ont la chance de te côtoyer. Surtout quand ils sont quelque peu désordonnés !

Merci à Tian Tian. Tes travaux ont été le « primum movens » des résultats de cette thèse. Même si on n'a jamais travaillé « physiquement » ensemble, l'esprit de Tian est toujours présent au labo à travers quelques flacons avec polystyrène flottant, fruits d'expériences passées, ou tout simplement au quotidien lors de discussions avec Martine.

Merci à Carine Delliaux, pour les échanges scientifiques de début de thèse pour moi, de fin de thèse pour toi, et pour ces grands moments de l'AACR 2016. La foudre sur la Nouvelle Orléans est tombée...Merci également à Nuria Balibrea, j'ai été impressionné par ta maturité scientifique lors de ton passage dans l'équipe témoignant d'une grande force de caractère.

Merci à Anne Chotteau, Isabelle Dammour, Elisa et Aline pour votre rigueur scientifique, bienveillance et pour les moments partagés dans la science et la convivialité.

Merci à Yvan de Launoit. J'ai beaucoup de sympathie et d'admiration pour vous, la passion vibrante et transmissible que vous avez pour la science. Je me rappelle très bien de la première discussion dans votre bureau en 2013 sur le concept nouveau appelé « axon guidance ». Cette discussion enthousiasmante a abouti à un Master 2 puis ensuite une Thèse...

Merci à David Tulasne. J'ai beaucoup apprécié votre hauteur de vue, capacité de synthèse ainsi que les remarques toujours pertinentes et justes pour faire avancer un projet et le valoriser. Toujours dans l'optique d'une publication la meilleure possible. Merci également à l'équipe Canther-Target réunifiée et notamment toutes les personnes ayant participé à ces échanges constructifs lors des lab meetings notamment Alexis Cortot, Zoulika Kherrouche, Marie-Christine Copin, Catherine Leroy, Marie Fernandes, Simon Baldacci, Leslie Duplaquet...

Merci à Philippe Jamme. J'ai passé de grands moments scientifiques et politiques à tes côtés, je suis certain que tu deviendras un oncologue de renom comme Jean-Charles !

Merci enfin à Martine...Au total les mots me manquent pour décrire ma reconnaissance pour vos qualités pédagogiques et d'encadrement, votre culture, votre droiture scientifique, votre détermination sans faille pour ne rien lâcher même dans les moments incertains. Assurément on apprend de ses chefs. J'ai appris à vos côtés une certaine idée de la Science et du management. Comme la recherche est un travail d'équipe, merci aussi à Alexandre pour les relectures d'articles, abstracts, résumé de thèse en anglais. Et merci aussi à Paul pour sa formation à Illustrator. Par la suite, un tuto gratuit serait bien utile...

Sur le plan personnel, je remercie nos amis Alice Pham, Jérôme, Claire et Aurélien Carnot, Anaïs et Arnaud Leroy...ainsi que leurs enfants (spéciale dédicace à mon filleul Simon). Les amis oncologues, belges, grecs, nantais et tous les autres. Que de bons moments partagés et surtout à venir quand le monde entier sera vacciné...d'ici l'été parait-il ?

Je remercie aussi mes amis picards de toujours Hervé, Julien, Davy, Boris, Mathieu et leurs compagnes. A la prochaine Thèse ou prochaine pandémie, vous serez une fois de plus au-dessus du lot.

A ma famille : Parents, frères Florian et Rémy, sœur Pauline et grand-mère. Malgré la distance, vous êtes d'une importance capitale et les retrouvailles sont à chaque fois exceptionnelles !

A ma belle-famille de Croix : Les Roussel. Catherine et Édouard, sans vous la vie serait bien différente...

A Caroline. Merci de m'épauler en permanence depuis maintenant quinze ans. Sans toi, rien n'aurait été possible hier, rien ne le serait aujourd'hui, et rien ne pourrait être envisageable demain.

A nos enfants, Léon et Harry. Ce travail de thèse vous est dédié.

## SOMMAIRE

RESUME.....	9
ABSTRACT.....	10
ABREVIATIONS.....	11
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	15
INTRODUCTION.....	19
<b>I. EPIDEMIOLOGIE.....</b>	<b>21</b>
A. Dans le monde : .....	21
B. En France Métropolitaine.....	21
<b>II. FACTEURS DE RISQUE.....</b>	<b>23</b>
<b>III. HISTOIRE NATURELLE.....</b>	<b>25</b>
A. Sur le plan clinique.....	25
B. Sur le plan biologique .....	26
1. Oncogenèse et rôle du récepteur aux androgènes.....	26
C. Résistance à la castration.....	28
2. Mécanismes moléculaires impliqués .....	28
D. Autres altérations génomiques dans le cancer de la prostate .....	34
1. Altérations ciblables.....	34
2. Autres altérations, non ciblables pour le moment.....	41
<b>IV. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE .....</b>	<b>47</b>
A. Cancer de la prostate localisé et localement évolué .....	47
1. Armes thérapeutiques et stratégies de choix. ....	47
B. Cancer de la prostate avancé ou métastatique.....	49
1. Armes thérapeutiques.....	49
2. Stratégies thérapeutiques.....	55
<b>V. CAS PARTICULIER DU CANCER DE LA PROSTATE NEUROENDOCRINE : RESISTANCE AUX TRAITEMENTS ET TRANSDIFFERENCIATION .....</b>	<b>70</b>
A. Présentation clinique du NEPC .....	70
B. Caractéristiques biologiques et histologiques de la différenciation neuroendocrine.....	71
C. Physiopathogénie de la différenciation neuroendocrine :.....	73
D. Caractéristiques moléculaires :.....	74
E. Prise en charge thérapeutique des carcinomes neuroendocrines métastatiques .....	78
<b>VI. GUIDAGE AXONAL ET CANCEROGENESE.....</b>	<b>82</b>

A.	Interactions entre système nerveux central et périphérique dans le cancer de la prostate	82
B.	Molécules impliquées dans le guidage axonal	83
C.	Molécules du guidage axonal impliquées dans les cancers.	85
1.	Dans le cancer de la prostate	86
2.	Autres cancers (liste non exhaustive du Tableau 15)	88
<b>PROJET DE THESE</b>		<b>91</b>
I.	<b>AVANT PROPOS</b>	<b>92</b>
II.	<b>OBJECTIFS</b>	<b>95</b>
<b>RESULTATS</b>		<b>95</b>
<b>I. PREMIERE PARTIE : GENES DU GUIDAGE AXONAL IMPLIQUES DANS LA CANCEROGENESE PROSTATIQUE</b>		<b>98</b>
A.	Avant-propos	98
B.	Identification de gènes partenaires fonctionnels de <i>PLXNA2</i> , issus du guidage axonal, comme dérégulés par l'expression des fusions <i>TMPRSS2:ERG</i> dans le cancer de la prostate	98
C.	Étude <i>in vitro</i> des gènes sélectionnés dans le modèle cellulaire PC3c	100
1.	Le modèle PC3c	100
2.	Résultats <i>in vitro</i>	101
D.	Expression <i>in vivo</i> des gènes sélectionnés dans une cohorte de tumeurs primitives de cancers de la prostate	103
E.	Expression <i>in vivo</i> des gènes sélectionnés à partir de données publiées de cancers métastatiques	103
F.	NRP1 est-il exprimé dans les cancers de la prostate avancés, résistants à la castration ?	106
G.	Utilisation d'un modèle cellulaire neuroendocrine	107
H.	Suivi de l'expression de NRP1 dans les CaP-NE	110
1.	En RT-qPCR dans le modèle cellulaire neuroendocrine	110
2.	Recherche de l'expression protéique de NRP1 dans les cancers de la prostate neuroendocrines en immunohistochimie	111
I.	NRP1 est-il androgéno-dépendant ?	112
J.	NRP1 est-il un gène cible direct de AR et ERG ?	114
1.	Analyse bio-informatique <i>in silico</i>	115
K.	Détection des protéines NRP1/PLXNA2 en présence de leurs ligands SEMA3A/VEGFA/SEMA6A dans la modification de localisation cellulaire	120
L.	Rôle fonctionnel en migration et invasion de l'axe NRP1 en rapport avec ses ligands respectifs	122
M.	Conclusion de la première partie	126
<b>II. DEUXIEME PARTIE : GENE FASCINE-1 IMPLIQUE DANS LA CANCEROGENESE PROSTATIQUE</b>		<b>128</b>
<b>III. TROISIEME PARTIE : CARACTERISATION DE NRP1 ET FSCN1 DANS LES MICROVESICULES EXTRACELLULAIRES</b>		<b>154</b>
A.	Avant-propos	154



<b>B. Caractérisation des exosomes :</b> .....	<b>154</b>
1. Caractérisation morphologique .....	155
2. Détection des marqueurs protéiques .....	155
<b>C. Étude de NRP1</b> .....	<b>156</b>
<b>D. Étude de FSCN1</b> .....	<b>157</b>
<b>DISCUSSION, PERSPECTIVES, CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>159</b>
<b>I. DISCUSSION</b> .....	<b>162</b>
A. Avant-propos .....	162
B. Identification et rôle de <i>Neuropiline 1</i> , appartenant au guidage axonal, dans l'évolution des cancers de la prostate .....	162
C. Rôle de <i>Fascin-1</i> , impliqué dans l'invasion tumorale via la formation des invadopodes ...	165
<b>II. PERSPECTIVES</b> .....	<b>167</b>
<b>III. CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>169</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>169</b>
<b>Annexe 1</b> .....	<b>171</b>
<b>Annexe 2</b> .....	<b>179</b>
<b>Annexe 3</b> .....	<b>181</b>
<b>Annexe 4</b> .....	<b>193</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>209</b>

## RESUME

Dans le cancer de la prostate, la présence de gènes de fusion, issus de remaniements chromosomiques *TMPRSS2:ERG* dans plus de 50% des cas, aboutit à une dérégulation du transcriptome prostatique. Le récepteur aux androgènes (AR), membre de la famille des récepteurs nucléaires, reste toutefois l'acteur majeur de l'évolution du cancer de la prostate.

Notre objectif est d'identifier des gènes pouvant avoir un rôle dans l'évolution du cancer de la prostate, en lien avec la fusion *TMPRSS2:ERG* et AR.

Par une analyse transcriptomique, à partir d'un modèle de surexpression de la fusion *TMPRSS2:ERG* dans une lignée de cellules tumorales prostatiques humaines (PC3c) capables d'induire des lésions osseuses *in vivo*, nous avons identifié deux gènes régulés par la fusion parmi lesquels *Plexine A2 (PLXNA2)*, déjà décrit par l'équipe (Tian et al. Oncogene.2014), et également *Fascin-1 (FSCN1)* codant pour une protéine qui permet de regrouper les filaments d'actine et impliqué dans les phénomènes de migration et invasion tumorale grâce à la formation d'invadopodes. Nous avons recherché d'une part les partenaires fonctionnels de *PLXNA2* en réalisant une étude *in silico* grâce au logiciel Ingenuity Pathway Analysis®, et avons identifié *Neuropiline 1 (NRPI)* comme potentiellement dérégulé par la fusion. D'autre part nous avons évalué l'implication de *FSCN1*, associé à l'évolution de plusieurs cancers mais encore peu connu dans le cancer de la prostate.

Pour chaque gène sélectionné nous avons déterminé, pour la validation clinique, leur expression dans des échantillons humains de cancers de la prostate primitifs, également en analysant des données de cohortes publiées et en suivant l'expression *in vivo* par immunohistochimie dans des cancers avancés. D'autre part nous avons étudié leur rôle fonctionnel *in vitro*, dans des modèles cellulaires hormono-indépendants et neuroendocrines. Enfin, nous avons réalisé une analyse bioinformatique et recherché dans les données de ChIP-seq-ERG et -AR publiées, l'existence de la fixation des facteurs ERG ou AR sur les 2 gènes *NRPI* puis *FSCN1*. Une fois identifiée, nous avons réalisé des expériences de ChIP *in vitro* à partir des modèles cellulaires dont nous disposons et nous avons mis en évidence la régulation directe de NRPI puis de FSCN1 par AR.

L'ensemble de nos résultats met en évidence *NRPI* et *FSCN1* comme gènes réprimés par AR, qui se ré-expriment en phase de résistance à la castration et acteurs potentiels de la différenciation neuroendocrine lorsque le niveau d'AR est bas ou inactif. Leur régulation par la fusion *TMPRSS2:ERG* et les mécanismes précis, en lien avec AR et ses cofacteurs restent à démontrer. Ces deux gènes pourraient toutefois jouer un rôle dans les mécanismes de résistances aux hormonothérapies, et constituer à l'avenir des cibles thérapeutiques.

## ABSTRACT

The presence of fusion genes, resulting from *TMPRSS2:ERG* chromosomal rearrangements in more than 50% of cases, leads to deregulation of the prostate cancer transcriptome. Androgen receptor (AR), a member of the nuclear receptor family, remains the major actor in the development of prostate cancer.

Our objective is to identify genes that may be involved in the evolution of prostate cancer, in relation to the *TMPRSS2:ERG* fusion and AR.

Using a transcriptomic analysis, derived from a PC3c prostate tumour cells line model overexpressing *TMPRSS2:ERG* fusion, we have identified two genes regulated by the fusion: *Plexin A2 (PLXNA2)*, already described in the literature by the team (Tian et al. Oncogene.2014 ), and also *Fascin-1 (FSCN1)* coding for a protein that groups actin filaments together and is involved in migration and tumour invasion phenomena through invadopods formation. We searched for functional partners of *PLXNA2*, performing an *in silico* study with Ingenuity Pathway Analysis® software, and have identified *Neuropilin-1 (NRPI)* as a potentially deregulated gene by fusion. On the other hand, we have evaluated the involvement of *FSCN1*, associated with the evolution of several cancers but poorly known in prostate cancer.

For each selected gene, we have determined, for clinical validation, their expression in human samples of primary prostate cancers, also by analyzing published cohort data and monitoring their expression *in vivo* by immunohistochemistry in advanced cancers. We have also studied their functional role *in vitro*, in hormone-independent and neuroendocrine cell models. Finally, we performed a bioinformatics analysis and searched in the published ChIP-seq-ERG and -AR data, the existence of ERG or AR factor binding on the 2 genes *NRPI* and *FSCN1*. Once identified, we have performed *in vitro* ChIP experiments using the available cellular models and we have demonstrated the direct regulation of *NRPI* and *FSCN1* by AR.

Together, our results highlight *NRPI* and *FSCN1* as genes repressed by AR, which are re-expressed in the phase of resistance to castration and are potential actors of neuroendocrine differentiation when the level of AR is low or inactive. Their regulation by the *TMPRSS2:ERG* fusion and its precise mechanisms, in relation to AR and co-factors, need to be further demonstrated. However, these two genes could play a role in the mechanisms of resistance to hormone-based therapies such as androgenic deprivation or selective competitive silent antagonist of AR, and could constitute therapeutic targets in the future.

## ABREVIATIONS

<b>Abi</b>	Abiratérone
<b>Apa</b>	Apalutamide
<b>APCCC</b>	Advanced Prostate Cancer Consensus Conference
<b>ASCO</b>	American Society of Clinical oncology
<b>AURKA</b>	Aurora- kinase-A
<b>ADT</b>	Androgen Deprivation Therapy »
<b>ADN</b>	Acide desoxyribo-nucléique
<b>AKT</b>	Protéine kinase B
<b>AMM</b>	Autorisation de Mise sur le Marché
<b>AR</b>	« Androgen receptor » = Récepteur aux androgènes
<b>ARE</b>	« Androgen response element » = Eléments de réponse aux androgènes
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BET</b>	Bromodomain and extraterminal domain
<b>BIC</b>	Bicalutamide
<b>CCAFU</b>	Comité de cancérologie de l'Association française d'urologie
<b>CDH1</b>	Cadherin 1
<b>CDK</b>	Cyclin-dependent kinase
<b>ChIP</b>	Chromatine Immunoprécipitation
<b>CgA</b>	Chromogranine A
<b>CPSC</b>	Cancer de la prostate sensible à la castration
<b>mCPSC</b>	Cancer de la prostate métastatique sensible à la castration
<b>CPRC</b>	Cancer de la prostate résistant à la castration
<b>mCPRC</b>	Cancer de la prostate métastatique résistant à la castration
<b>CYP17</b>	Enzyme 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17,20-lyase
<b>Daro</b>	Darolutamide
<b>DCX</b>	Doublecortine
<b>DDL3</b>	Delta Like Canonical Notch Ligand 3)
<b>DHEA</b>	Déhydroépiandrostérone
<b>DHT</b>	Dihydrotestostérone
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>EGR-1</b>	Early growth response protein 1
<b>ENZA</b>	Enzalutamide

<b>ERG</b>	ETS-Related Gene
<b>ESMO</b>	European Society of Medical Oncology
<b>ETS</b>	E twenty six
<b>ETV</b>	ETS Variant 1, 4 et 5
<b>EZH2</b>	Enhancer of zeste homologue 2
<b>FDA</b>	Food and Drugs Administration (US)
<b>FISH</b>	Fluorescence in situ hybridization
<b>FGFR</b>	Fibrosblast Growth Factor Receptor
<b>FKBP5</b>	FK506 binding protein 5
<b>FLRT</b>	Fibronectin leucine-rich transmembrane
<b>FOXA1</b>	Forkhead Box A1
<b>GAPDH</b>	D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>HES</b>	Hématoxiline
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth factor
<b>Hh</b>	Hedgehog
<b>HMT</b>	Histone methyl-transferase
<b>HNG</b>	Hormonothérapie de Nouvelle Génération
<b>HOXB13</b>	Homeo box B13
<b>HR</b>	Hazard ratio
<b>HSP</b>	Heat-Shock Protein
<b>ICK</b>	Inhibiteurs du checkpoint
<b>IHC</b>	Immunohistochimie
<b>IMRT</b>	Radiothérapie par modulation d'intensité
<b>INCa</b>	Institut National du Cancer
<b>INSM1</b>	INSM Transcriptional Repressor 1
<b>IP</b>	Immunoprécipitation
<b>IPA</b>	Ingenuity Pathway Analysis®
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>IRO</b>	Inhibiteurs de la résorption osseuse
<b>LBD</b>	Ligand-binding domain
<b>LH</b>	Hormone lutéinisante
<b>LHRH</b>	Hormone de libération de la lutéinostimuline
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases aussi appelée MAP-kinases
<b>MET</b>	Mesenchymal-epithelial transition factor

<b>MO</b>	Métastases osseuses
<b>MSI-H</b>	Instabilité Microsatellitaire Haute
<b>MMR</b>	Mismatch Repair
<b>MUC1</b>	Mucin-1
<b>MYC</b>	Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>NCCN</b>	National Comprehensive Cancer Network
<b>ND</b>	Non déterminé
<b>NE</b>	Neuroendocrine
<b>NEPC</b>	Neuroendocrine prostate cancer
<b>NRP</b>	Neuropiline
<b>NSE</b>	Neuron Specific Enolase
<b>NTD</b>	Domaine amino-terminal
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>PARP</b>	Poly-ADP ribose polymerase
<b>PCa</b>	Prostate cancer
<b>PD1</b>	Programmed cell death 1
<b>PDL1</b>	Programmed death-ligand 1
<b>PDGFR</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>PEG10</b>	Paternally Expressed 1
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
<b>PLA</b>	Proximity Ligation Assay
<b>PLXN</b>	Pléxine
<b>PSA</b>	Prostate Specific Antigen
<b>PTEN</b>	Phosphatase and TENsin homolog
<b>PRC2</b>	Polycomb repressive complex-2
<b>RB1</b>	Retinoblastome Transcriptional Corepressor 1
<b>RECIST</b>	Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
<b>REST</b>	RE1-Silencing Transcription factor
<b>ROBO</b>	Roundabout
<b>RT-qPCR</b>	Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction
<b>RTUP</b>	Résection transurétrale de prostate
<b>SA</b>	Suppression androgénique
<b>SAI</b>	Suppression androgénique intermittente
<b>SEMA</b>	Sémaphorine

<b>SCID</b>	Severe Combined Immunodeficiency
<b>SG</b>	Survie globale
<b>SRRM4</b>	Serine/Arginine Repetitive Matrix 4
<b>SYP</b>	Synaptophysine
<b>TMPRSS2</b>	Transmembrane protease serine 2
<b>TEM</b>	Transmission Electron Microscopy
<b>TEP</b>	Tomographie par émission de positons
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$
<b>TNM</b>	Tumor, Nodes, metastases
<b>TK</b>	Tyrosine kinase
<b>WNT</b>	Wingless
<b>mTOR</b>	Mechanistic target of rapamycin ou mammalian target of rapamycin
<b>UCSC</b>	University of California Santa Cruz
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VEGFR</b>	Vascular endothelial growth factor receptor

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### INTRODUCTION

Tableau 1 : Épidémiologie des principaux cancers dans le monde	21
Tableau 2 : Épidémiologie des principaux cancers en France	22
Figure 1 : Structure moléculaire du gène codant pour la protéine du récepteur aux androgènes	27
Figure 2 : Régulation hormonale de la production des androgènes	28
Figure 3 : Mécanismes impliqués dans la résistance à la castration	30
Figure 4 : Schéma représentatif de l'amplification de AR après suppression androgénique	31
Tableau 3 : Résumé des principales études cliniques ayant évalué les inhibiteurs de PARP dans le cancer de la prostate	36
Figure 5 : Voies de signalisation, réparation de l'ADN, voie épigénétique ciblée par les petites molécules actuellement en cours d'investigation dans les cancers de la prostate avancés	41
Figure 6 : Gène de fusion <i>TMPRSS2:ERG</i> dans le cancer de la prostate	42
Tableau 4 : Gènes de fusions <i>ETS</i> dans le cancer de la prostate	43
Tableau 5 : Autres gènes non ciblables actuellement, dérégulés dans le cancer de la prostate	45
Tableau 6 : Niveau de risque de rechute biologique, estimé par la classification de D'AMICO	47
Tableau 7 : Possibilités thérapeutiques dans le cancer de la prostate localisé	48
Figure 7 : Mécanisme d'action de l'acétate d'abiratéron	52
Figure 8 : Mécanisme d'action de l'enzalutamide et apalutamide	53
Figure 9 : Synthèse des hormonothérapies existantes dans le cancer de la prostate	55
Tableau 8 : Résultats des essais cliniques princeps chez les patients atteints de cancer de la prostate métastatique sensible à la castration	58
Tableau 9 : Résultats des essais cliniques princeps chez les patients atteints de cancer de la prostate non métastatique résistant à la castration	62
Tableau 10 : Résultats des essais cliniques princeps chez les patients atteints de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration, en première ligne	65
Tableau 11 : Résultats des essais cliniques princeps chez les patients atteints de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration, au-delà de la première ligne	66



Figure 10 : Synthèse des thérapies systémiques utilisées dans le cancer de la prostate et leur AMM en France_____	68
Figure 11 : Carcinome neuroendocrine de la prostate de type mixte, associant un contingent adénocarcinomateux avec un contingent neuroendocrine_____	71
Figure 12 : Mécanisme de transdifférenciation épithélio-neuroendocrine basé sur la plasticité des lignées et principaux gènes impliqués_____	74
Tableau 12 : Principales études évaluant le traitement des carcinomes neuroendocrines de la prostate métastatiques_____	77
Tableau 13 : Principales études cliniques en cours dans le traitement des carcinomes neuroendocrines de la prostate métastatiques_____	79
Figure 13 : Un dialogue unique entre le système nerveux central et les tumeurs de la prostate_____	82
Tableau 14 : Focus sur les molécules impliquées dans le guidage axonal_____	82
Figure 14 : Présentation en <i>cis</i> et en <i>trans</i> de NRP1 et implication dans l'angiogenèse__	84
Tableau 15 : Membres du guidage axonal impliqués dans les cancers non prostatiques__	88

## **PROJET DE THESE**

Figure 1 : Schéma représentatif du guidage axonal_____	92
Figure 2 : Formation des invadopodes_____	93

## **RESULTATS**

### **PREMIERE PARTIE : GENES DU GUIDAGE AXONAL IMPLIQUES DANS LA CANCEROGENESE PROSTATIQUE**

Figure 1 : Réseaux de gènes régulés par PLXNA2 dans les lignées cellulaires PC3c-H (haute expression de la fusion T1E4) par rapport aux lignées contrôle_____	98
Tableau 1 : Résultats de la revue de la littérature effectuée en 2016 pour confrontation aux résultats obtenus avec Ingenuity Pathway Analysis®_____	99
Figure 2 : Expression ARNm des gènes du guidage axonal sélectionnés dans des clones stables PC3c-H (haute expression de la fusion T1E4) par rapport aux lignées contrôle__	100
Figure 3 : Expression ARNm des gènes du guidage axonal sélectionnés NRP1, NRP2, VEGFR2, PLXND1, dans les cellules prostatiques induites par des androgènes__	101
Figure 4 : Corrélation entre l'expression ARNm de NRP1 et le cancer de la prostate____	102
Figure 5 : Méta-analyse de l'expression ARNm de NRP1 dans les cancers de la prostate avec métastases versus cancers de la prostate primaires sans métastases_____	103
Figure 6 : Corrélations entre expression ARNm de NRP1 et la fusion <i>TMPRSS2:ERG</i> __	103
Figure 7 : Diagramme de dispersion montrant la corrélation entre l'expression ARNm de	

<i>NRP1</i> avec l'expression ARNm de <i>PLXNA2</i> _____	104
Tableau 2 : Tableau de synthèse des corrélations entre l'expression ARNm des gènes sélectionnés et le cancer de la prostate primaire, corrélation avec la présence de la fusion <i>TMPRSS2:ERG</i> et avec l'expression ARNm d' <i>ERG</i> _____	104
Figure 8 : Expression ARNm de <i>NRP1</i> dans les cancers de la prostate avancés_____	105
Figure 9 : Oncoprint représentant la présence d'altérations d'expression de <i>ERG</i> et <i>NRP1</i> _____	106
Figure 10 : Acquisition d'un phénotype neuroendocrine de cellules LNCaP cultivées sans hormones_____	107
Figure 11 : Étude de l'expression de marqueurs neuroendocrines dans le modèle cellulaire_____	108
Figure 12 : Étude de l'expression de marqueurs neuroendocrines dans le modèle cellulaire, en milieu sans hormone pendant 72h +/- Enza_____	108
Figure 13 : Suivi de l'expression ARNm de <i>NRP1</i> dans le modèle cellulaire neuroendocrine_____	109
Figure 14 : Détection de la protéine <i>NRP1</i> dans des échantillons de NEPC_____	110
Figure 15 : Expression en ARNm de <i>NRP1</i> , <i>PLXNA2</i> , <i>ERG</i> , <i>PSA</i> selon la présence de <i>DHT</i> ou de l'inhibiteur <i>Bic</i> _____	112
Figure 16 : Expression relative ARNm de <i>NRP1</i> et <i>PLXNA2</i> , après transfection transitoire d'un vecteur <i>AR</i> dans un modèle hormono-indépendant_____	113
Figure 17 : Motifs <i>AR</i> et <i>ERG</i> issus de la base de données <i>JASPAR</i> et <i>HOMER</i> _____	114
Figure 18 : Téléchargement des données de <i>ChIP-Seq</i> publiés dans la base de données <i>UCSC for cancer genomics</i> _____	115
Figure 19 : Principales étapes de la réalisation d'une expérience de <i>ChIP</i> _____	116
Figure 20 : Étude en <i>ChIP</i> de la fixation de <i>ERG</i> sur <i>NRP1</i> _____	117
Figure 21 : Étude en <i>ChIP</i> de la fixation de <i>AR</i> sur <i>NRP1</i> _____	118
Figure 22 : Expériences d'immunofluorescences montrant <i>PLXNA2</i> et <i>NRP1</i> en milieu contrôle, sans ligands _____	119
Figure 23 : Expériences d'immunofluorescences montrant <i>PLXNA2</i> et <i>NRP1</i> en présence de leurs ligands_____	120
Figure 24 : Expériences de migration en <i>Transwell®</i> d'un modèle cellulaire <i>PC3c-H</i> avec présence de la fusion <i>TMPRSS2:ERG</i> versus contrôle mis en contact avec des ligands de <i>NRP1</i> _____	122
Figure 25 : Impact des extinctions de gènes par <i>Si-NRP1</i> , <i>Si-PLXNA2</i> et <i>Si-ERG</i>	

sur la migration en Transwell® d'un modèle cellulaire PC3c-H avec présence de la fusion <i>TMPRSS2:ERG</i> co-cultivées avec les ligands de NRP1_____	123
Figure 26 : Expression ARNm des gènes <i>ERG</i> , <i>NRP1</i> et <i>PLXNA2</i> dans les cellules PC3c-H (haute expression de la fusion T1E4) en fonction de la présence ou non des ligands de NRP1, <i>SEMA3A</i> ou <i>VEGFA</i> _____	124
Figure 27 : Hypothèses de déséquilibre de la signalisation impliquant les acteurs du guidage axonal Plexines/Neuropilines/Sémaphorines dans les cancers de la prostate exprimant la fusion <i>TMPRSS2:ERG</i> _____	125

## **DEUXIEME PARTIE : GENE *FASCINE-1* IMPLIQUE DANS LA CANCEROGENESE PROSTATIQUE**

Figure 1: <i>FSCN1</i> gene is down-regulated by the androgen receptor in VCaP cells_____	139
Figure 2: Expression of <i>FSCN1</i> in human normal and cancerous prostate_____	140
Figure 3: <i>FSCN1</i> is highly expressed in human NEPC_____	141
Figure 4: Androgen deprivation induces neuroendocrine-like phenotype and triggers <i>FSCN1</i> expression_____	142
Figure 5: <i>FSCN1</i> contributes to neuroendocrine-like LNCaP migration and invasion____	143
Figure 6: AR protein binds to cis-elements of <i>FSCN1</i> gene_____	144
Figure S1: <i>FSCN1</i> contributes to PC3c-T1E4 migration properties_____	145
Figure S2: <i>FSCN1</i> expression in metastasis is restricted to blood vessels, osteoblasts and osteocytes_____	146
Figure S3: LNCaP-NE are able to form invadopodia and degrade fluorescent matrix____	148
Sup Table 1: Primers used in quantitative RT-PCR_____	149
Sup Table 2: Primers used for ChIP-qPCR_____	150
Figure S4: Analysis of ChIP-seq datasets for the binding of AR to the <i>FSCN1</i> locus in VCaP cells using UCSC Genome Browser_____	151

## **TROISIEME PARTIE : CARACTERISATION DE NRP1 ET FSCN1 DANS LES MICROVESICULES EXTRACELLULAIRES**

Figure 1 : Schéma d'un exosome, vésicule extracellulaire de 30 à 100nm de diamètre, contenant des acides nucléiques, des protéines et des lipides_____	153
Figure 2 : Caractérisation des exosomes en TEM_____	154
Figure 3 : Caractérisation des marqueurs des exosomes purifiés en Western Blot_____	155
Figure 4 : Détection de NRP1_____	156
Figure 5 : Détection de <i>FSCN1</i> _____	157

## **INTRODUCTION**



# I. EPIDEMIOLOGIE

## A. Dans le monde :

Dans le monde, le cancer de la prostate représente le deuxième cancer chez l'homme en terme d'incidence avec 1 276 106 (13.5%) cas incidents, juste derrière le cancer du poumon. C'est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes dans plus de la moitié (105 sur 185) des pays du monde, notamment en Amérique, en Europe du Nord et de l'Ouest (dont la France), en Australie/Nouvelle-Zélande et dans une grande partie de l'Afrique subsaharienne. En termes de mortalité, le cancer de la prostate est néanmoins au 8<sup>ème</sup> rang mondial, avec 358 989 décès par an représentant 3.8% des causes de mortalité par cancer, essentiellement liées aux formes métastatiques. Il s'agit de la première cause de décès par cancer chez les hommes dans 46 pays, notamment en Afrique subsaharienne et dans les Caraïbes. Les taux d'incidence et de mortalité les plus élevés au monde sont observés en Guadeloupe et à la Barbade (Bray et al., 2018).

Cancer	Incidence	Mortalité
Poumon	1 368 524 (14.5%)	1,184,947 (27.1%)
Prostate	1 276 106 (13.5%)	358,989 (7.6%)
Colorectal	1 026 215 (10.9%)	474606 (10.6%)
Estomac	683 754 (7.2%)	513,555 (11.7%)
Foie	596 574 (6.3%)	548,375 (12.7%)

**Tableau 1 : Épidémiologie des principaux cancers dans le monde** (source GLOBOCAN, 2018).

L'incidence du cancer de la prostate au cours des dernières décennies a été fortement influencée par le diagnostic de cancers latents, soit par le dosage du Prostate Specific Antigen (PSA) chez les personnes asymptomatiques dans le cadre d'un dépistage individualisé, soit par la détection de cancers latents dans les tissus prélevés lors d'une prostatectomie par exemple. A la fin des années 1980, la disponibilité du dosage du PSA a conduit à une utilisation importante de ce test pour la détection et le diagnostic précoce, et les taux d'incidence du cancer de la prostate ont alors rapidement augmenté.

## B. En France Métropolitaine

En 2018, le nombre de nouveaux cas de cancers toutes localisations confondues en France métropolitaine est estimé à 382 000 (204 600 chez les hommes et 177 400 chez les femmes). Le nombre de décès par cancer est estimé à 157 400, dont 89 600 chez les hommes et 67 800 chez les femmes. Le cancer de la prostate reste de loin le cancer le plus fréquent chez l'homme (50 430 nouveaux cas estimés en 2015) devant le cancer du poumon et le cancer colorectal (31 231 et 23 216 cas estimés respectivement en 2018). En termes de mortalité, le cancer du poumon se situe au premier rang chez l'homme (22 761 décès en 2018), devant le cancer colorectal (9 209 décès) et le cancer de la prostate (8 115 décès).

<b>Cancer</b>	<b>Incidence</b>	<b>Mortalité</b>
<b>Tous cancers</b>	204 583	89621
<b>Poumon</b>	31 231 (15.3%)	22 761 (25.4%)
<b>Prostate</b>	50 430 (24.7%)	8 115 (9.1%)
<b>Colorectal</b>	23 216 (11.3%)	9 209 (10.3%)
<b>Vessie</b>	10 626 (5.2%)	4 112 (4.6%)
<b>Lèvre-Bouche-Pharynx</b>	10 055 (4.9%)	2 898 (3.2%)

**Tableau 2 : Épidémiologie des principaux cancers en France** (source Inca, 2018 d'après Defossez G, et al., 2019).

Toutefois, pour le cancer de la prostate, l'incidence est en baisse sur la période récente, de -3,5 % par an en moyenne entre 2010 et 2015. Cette évolution doit être interprétée à la lumière de l'épisode de forte augmentation de l'incidence observée jusqu'en 2005, qui a été suivie d'une baisse rapide en lien avec les modifications de pratique du dépistage individuel par le dosage du PSA. La diminution constante de la mortalité entre 1990 et 2018, de l'ordre de -2,8 % par an est un élément attribuable à l'amélioration des traitements d'une part, et au rôle du dépistage qui permet d'autre part de diagnostiquer certains cancers à des stades précoces, donc curables (Carioli et al., 2020).

## II. FACTEURS DE RISQUE

Les causes du cancer de la prostate ne sont pas encore bien établies.

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. En France, l'âge moyen au moment du diagnostic est de 70 ans en 2011, selon les informations fournies par l'Institut National du Cancer (INCa).

Les antécédents familiaux ainsi que les caractéristiques ethno-géographiques constituent également des facteurs de risque (Carter et al., 1992; Valéri, 2002). A titre d'exemple, les taux sont les plus élevés chez les hommes d'origine africaine aux États-Unis et dans les Caraïbes, ce qui reflète une prédisposition ethnique et génétique. Les populations caucasiennes et asiatiques présentent au contraire un risque moindre (Damber & Aus, 2008). Mais il existe peu de facteurs de risque supplémentaires pour le cancer avancé de la prostate autres que l'obésité. 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). Un risque potentiel lié à l'utilisation de pesticides, notamment la chlordécone, reste à démontrer mais est de plus en plus suspecté dans les Antilles (Maudouit & Rochoy, 2019).





### III. HISTOIRE NATURELLE

L'étiologie du cancer de la prostate reste à ce jour inconnue. Des séries autopsiques anciennes indiquent que la majorité des hommes centenaires, le plus souvent décédés d'autres causes, présentent dans leur prostate des cellules cancéreuses, sans que ces hommes aient nécessairement développé de symptômes de cancer de la prostate (Fizazi et al., 2017). Les cancers de la prostate ont la plupart du temps une évolution lente : des cellules cancéreuses sont souvent présentes à partir de l'âge de 50 ans, les symptômes apparaissent en moyenne vers l'âge de 71 ans et la majorité des décès surviennent au-delà de 75 ans (Fizazi et al., 2017).

#### A. Sur le plan clinique

Un cancer de la prostate évolue :

- (i) De manière locale et locorégionale à travers la capsule prostatique, vers les vésicules séminales et le trigone vésical.
- (ii) De manière métastatique sur le plan osseux et ganglionnaire, tels que classiquement les ganglions ilio-obturbateurs, mais une grande variété de ganglions pelviens peuvent être concernés.
- (iii) Certaines formes plus agressives, notamment les cancers avec différenciation neuroendocrine ont un tropisme métastatique viscéral.

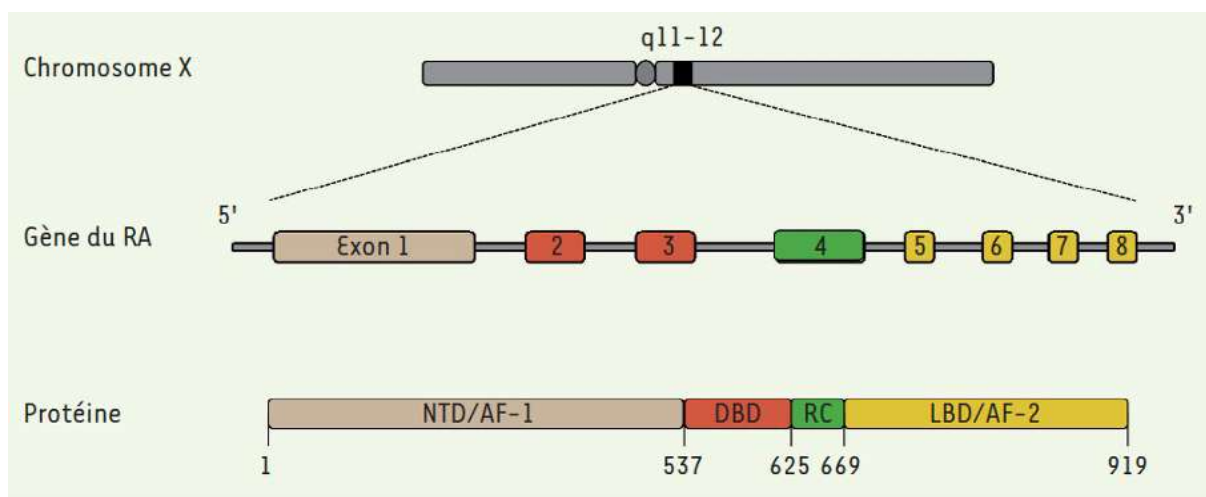
Le cancer de la prostate est ostéophile et la morbidité est essentiellement osseuse. Les métastases osseuses (MO) sont principalement ostéo-condensantes à l'imagerie radiologique, mais en fait biologiquement mixtes avec un excès de résorption et un excès de fabrication osseuse (DiNatale & Fatatis, 2019 ; Turpin et al., 2020)

## B. Sur le plan biologique

### 1. Oncogénèse et rôle du récepteur aux androgènes

Le récepteur aux androgènes (AR) joue un rôle majeur dans la prolifération tumorale du cancer de la prostate. Chez l'homme, les deux organes produisant les androgènes sont les testicules, 80 à 90%, et les glandes surrénales, 10 à 20% qui produisent des androgènes ayant une moindre affinité pour le récepteur des androgènes (déhydroépiandrostérone, etc.). La synthèse et la sécrétion des androgènes sont sous le contrôle du système hypothalamo-hypophysaire.

Le gène *AR* humain, d'une longueur de 90 kb et codant pour 918 acides aminés, est situé sur le chromosome X (Xq11-12) et contient 8 exons et 7 introns. Il appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires (Cai et al., 2018). Il s'agit d'un facteur de transcription de 110 kDa composé de quatre motifs distincts : (i) le domaine amino-terminal (NTD) intrinsèquement désordonné, contenant la fonction d'activation transcriptionnelle AF-1 (ii) le domaine de liaison à l'ADN, très conservé, assurant la reconnaissance d'éléments de réponse aux androgènes (ARE) (iii) la région charnière qui contient le signal de localisation nucléaire (iv) le domaine de fixation du ligand « ligand-binding domain » (LBD) contenant la fonction d'activation transcriptionnelle AF-2 ligand-dépendant (Figure 1) (Schreyer et al., 2017).



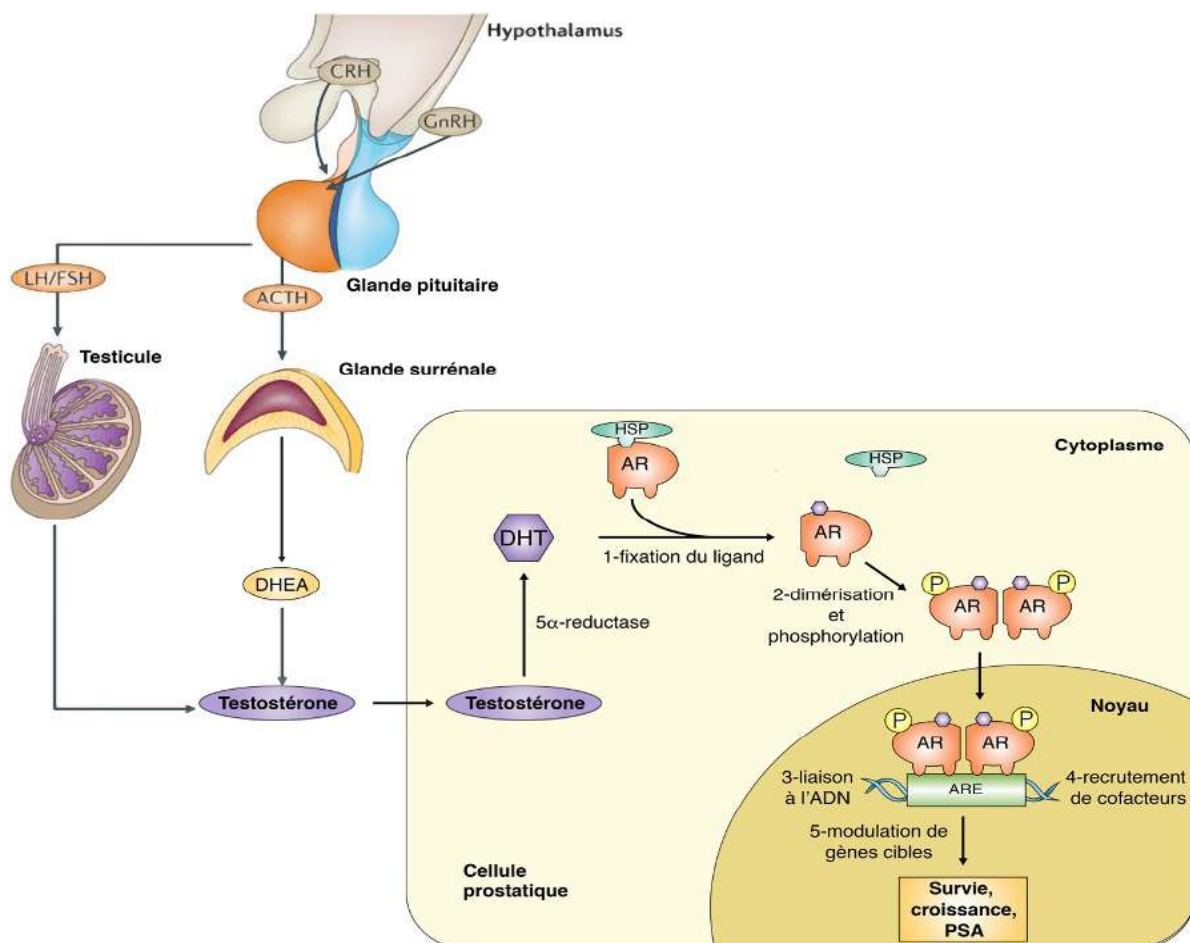
**Figure 1 : Structure moléculaire du gène codant pour la protéine du récepteur aux androgènes (d'après Schreyer et al., 2017).**

Le gène AR est localisé sur le bras long du chromosome X et contient 8 exons.

Domaines de la protéine : NTD : domaine amino-terminal ; AF-1 : fonction de transactivation 1 ; DBD: domaine de liaison à l'ADN ; RC : région charnière ; LBD : domaine de liaison du ligand ; AF-2 : fonction de transactivation 2.

AR est une protéine biologiquement inactive en situation cytoplasmique. Le récepteur cytoplasmique est lié par des protéines de réponse au choc thermique HSP (Heat-Shock Protein) dans son état inactif. HSP90 permet le maintien d'une structure conformationnelle assurant une grande affinité de AR pour son ligand naturel, la dihydrotestostérone (DHT). La liaison androgénique, en particulier de la DHT 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 la translocation au noyau et la liaison aux éléments de réponse aux androgènes (ARE, « androgen response element ») au niveau de la région promotrice des gènes régulés par AR, conduisent au contrôle de la survie et la croissance des cellules prostatiques, la sécrétion de PSA, ainsi que d'autres voies de signalisation (Figure 2) (Shafi et al., 2013).

Cette interaction avec la région promotrice est sous l'influence de nombreux corégulateurs transcriptionnels, environ 150 identifiés, dont des enzymes acétyltransferases, deacetylases ou encore méthyltransferases ou deméthylases permettant d'ouvrir la structure de la chromatine pour favoriser la transcription (Heemers & Tindall, 2007).



**Figure 2 : Régulation hormonale de la production des androgènes** (d'après Narayanan et al., 2016).

Cette voie de signalisation correspond à la voie génomique, la plus classique encore appelée voie canonique de AR. Néanmoins, un autre mécanisme d'action de AR existe, la voie non génomique. Dans cette dernière, AR demeure dans le cytoplasme après la stimulation androgénique et n'agit pas comme un facteur de transcription. Il active d'autres voies de signalisation intracellulaires convergeant vers la voie des MAP Kinases puis, en aval, aboutissant à l'activation de facteurs de transcription (Schreyer et al., 2017).

## C. Résistance à la castration

### a) *Définition de la résistance à la castration*

Selon la définition américaine du National Comprehensive Cancer Network (NCCN) :

**Un cancer de la prostate résistant à la castration (CPRC) est un cancer de la prostate qui progresse cliniquement, radiologiquement ou biochimiquement en dépit d'une castration efficace, matérialisée par une testostéronémie effondrée < 50 ng/dL.**

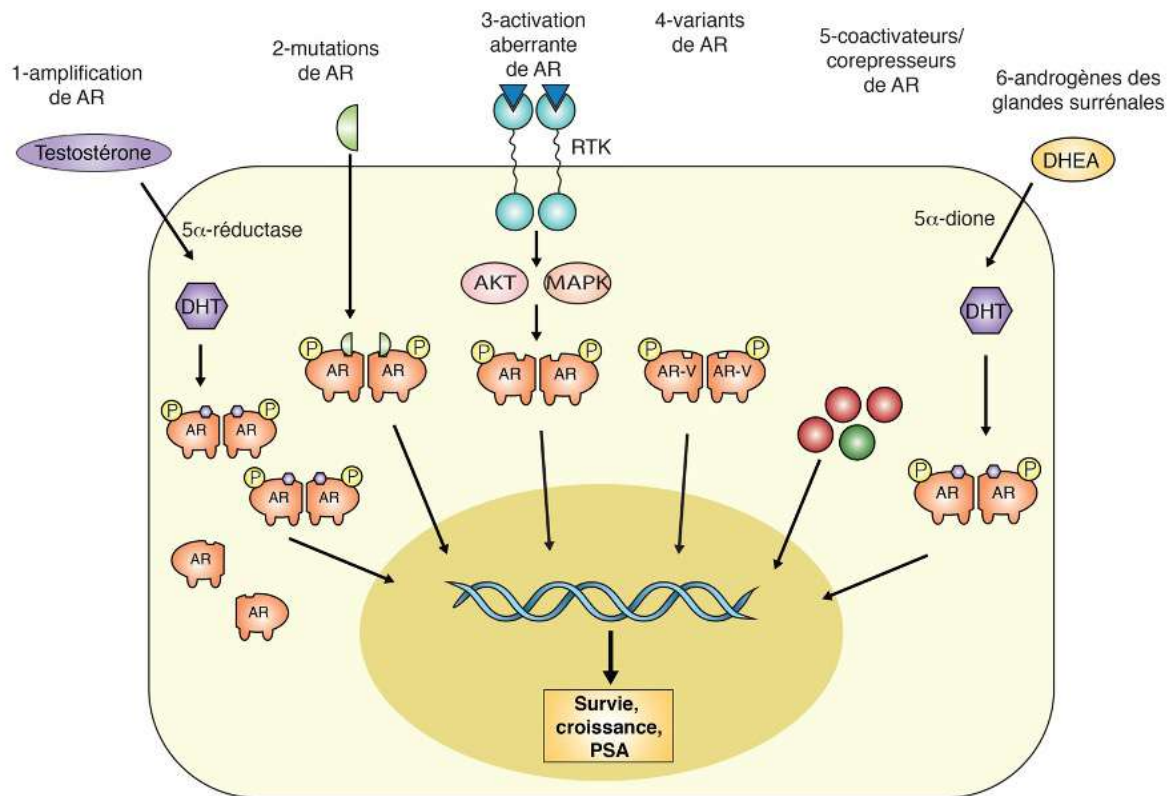
Les référentiels européens (Cornford et al., 2016) en donnent une définition plus précise :

Un taux de testostérone (= taux de castration) < 0,50 ng/mL ou 1,7 nmol/L plus la documentation d'une des progressions suivantes :

- Biochimique : trois augmentations du PSA à au moins 2 semaines d'intervalle, dont 2 à plus de 50 % au-dessus du nadir (taux de PSA le plus bas), avec un PSA > 2 ng/mL
- Radiologique : au moins deux ou plus nouvelles lésions osseuses sur la scintigraphie osseuse, ou au moins une métastase viscérale en utilisant les critères Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST) (Eisenhauer et al., 2009).

## 2. Mécanismes moléculaires impliqués

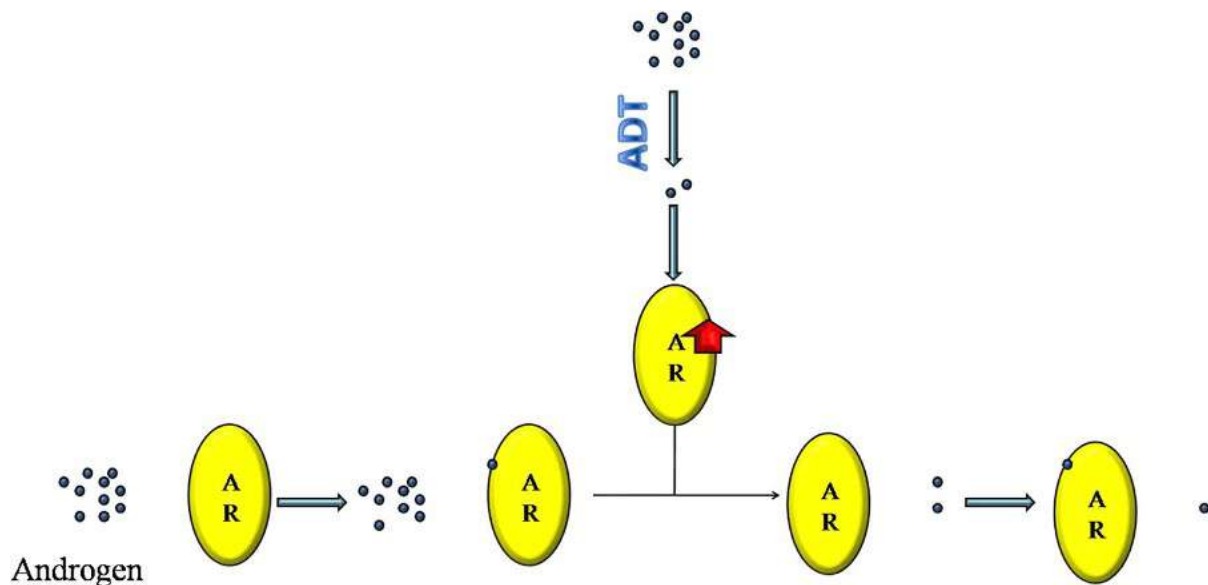
Les multiples mécanismes liés à AR qui favorisent le développement du CPRC sont les suivants et résumés dans la Figure 3.



**Figure 3 : Mécanismes impliqués dans la résistance à la castration** (d'après Chandrasekar et al., 2015).

a) « Amplification » de AR, qui permet au CPRC d'être « hypersensible » aux faibles niveaux d'androgènes

Après une suppression androgénique (« Androgen Deprivation Therapy » ou « ADT »), l'expression de AR est régulée à la hausse, et AR peut être activé à de plus faibles taux d'androgènes. Il en résulte que AR favorise toujours le cancer de la prostate, même en situation androgénique faible et que le cancer de la prostate devient ensuite progressivement résistant à la castration (Kohli et al., 2018; Salvi et al., 2016).



**Figure 4 : Schéma représentatif de l'amplification de AR après suppression androgénique.** AR : récepteur aux androgènes, ADT : « Androgen Deprivation Therapy » ou suppression androgénique (d'après Cai et al. 2018).

*b) Mutations AR, qui diminuent la spécificité AR et augmentent sa transcription*

Le gène AR étant localisé sur le chromosome X en position q11-14, son expression est mono-allélique chez les hommes. Il est donc raisonnable d'imaginer que toute mutation affectant les fonctions de AR dans une cellule donnée puisse induire un changement de phénotype. Si une perte de fonction est généralement attribuée aux mutations, ou altérations génétiques, touchant AR dans le syndrome d'insensibilité aux androgènes, les mutations «gain de fonction» sont prépondérantes dans le cancer de la prostate. Ainsi, la région charnière et le LBD représentent des points chauds avec près de 45 % des mutations décrites dans la littérature (Gottlieb et al., 2012).

Dans les CPRC, plusieurs mutations ponctuelles ont été identifiées sur le gène AR lui-même, conduisant à une augmentation de l'activité de AR en présence de faibles doses d'androgènes produites par les glandes surrénales (Culig et al., 1993), ou d'autres hormones stéroïdiennes non androgéniques, telles que la progestérone, l'hydrocortisone (Zhao et al., 2000), l'estradiol (M. E. Taplin et al., 1995) mais également certains antagonistes de AR tels que la Flutamide et le Bicalutamide convertis en agonistes via une mutation de AR (Steinkamp et al. 2009). Les mutations de AR peuvent également être à l'origine d'une résistance aux

hormonothérapies de nouvelle génération. Ainsi, la mutation F876L, touchant le résidu phénylalanine en position 876, près de la zone de liaison du ligand, confère une résistance *in vitro* et *in vivo* à l'enzalutamide (Joseph et al., 2013).

*c) Activation aberrante de AR par interaction entre la voie AR et les voies de signalisation classiques liées aux tumeurs*

Dans l'ensemble, quelle que soit la voie de signalisation activée, le résultat est le maintien de la survie des cellules tumorales. On distingue notamment l'implication de :

- PI3K/Akt/mTOR.

Lorsque la suppression androgénique inhibe la voie de signalisation AR, il existe un échappement via la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. A contrario, l'inhibition de cette voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR passant par Akt permet aux cytokines d'aval de réactiver la voie de signalisation AR (Cai et al., 2018). Ainsi, par exemple PTEN, fortement exprimé dans le CPRC (40%-50% des mCRPC) peut augmenter l'expression de la protéine FK506 binding protein 5 (FKBP5) en inhibant les co-inhibiteurs de AR, c-Jun et EGR1 (Edlind & Hsieh, 2014).

- Voie de signalisation des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAP-Kinases)

Il a été constaté que la voie de signalisation MAPK joue un rôle important dans le développement des CPRC, ce qui pourrait être lié à l'activation de la voie de signalisation AR, même si son rôle n'a pas été complètement expliqué (Cai et al., 2018). Ainsi, la voie de signalisation MAPK conduit à la phosphorylation et à la dimérisation de c-Jun dans le cancer de la prostate, puis active la voie de signalisation AR ou les gènes directement liés à AR, induisant une tolérance du cancer de la prostate aux androgènes (Mukherjee et al., 2011). Le rôle de c-Jun peut également être joué par la voie de signalisation HER-2 et Raf (Mukherjee et al., 2011).

- La voie de Wnt/ $\beta$ -caténine

La suppression androgénique diminue le niveau d'androgène et inhibe l'activité de AR à partir de sa combinaison compétitive avec la  $\beta$ -caténine activée (Y. Zhang et al., 2018). La  $\beta$ -



caténine activée promeut ensuite l'expression de l'AR via les facteurs de transcription TCF/LEF et améliore la transcription médiée par AR en tant que coactivateur (Wang et al., 2008). La  $\beta$ -caténine activée peut également améliorer l'activité de l'AR de faible activité qui se combine avec les androgènes de faible activité biologique dérivés de la glande surrénale (Yokoyama et al., 2014).

*d) Activation constitutive de AR*

Des variants d'épissage de AR, qui régulent l'expression des gènes d'aval sans androgènes, ont récemment été identifiés. Des épissages alternatifs des transcrits de AR produisent également des formes tronquées du récepteur (Mudryj & Tepper, 2013). Ces cinq dernières années, 17 variants tronqués, issus de ces épissages alternatifs, ont ainsi été identifiés dans plusieurs lignées cellulaires ou modèles de xénogreffes de cancer de la prostate, ainsi que dans des échantillons isolés de patients. Parmi ces variants d'épissage on note AR-V7 particulièrement étudié, notamment en raison de la disponibilité d'anticorps spécifiques (Z. Guo et al., 2009; Hu et al., 2009) qui ont permis l'étude de leur expression par immunohistochimie dans des échantillons tumoraux humains. Il régule à la fois les gènes, classiquement dépendants de AR, mais également un nouvel ensemble de gènes, classiquement indépendants de AR. Ceci montre que les AR-V7 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 & Tindall, 2011).

*e) Cofacteurs de AR*

Dans le CPRC, certains cofacteurs peuvent directement ou indirectement promouvoir l'expression de gènes en aval de AR, ce qui peut avoir pour résultat d'augmenter l'activité transcriptionnelle de AR, maintenir son intégrité et empêcher sa dégradation. Les deux principaux mécanismes comprennent l'augmentation de l'activation de AR et la réduction de sa dégradation. Les cofacteurs coactivateurs de AR comprennent notamment la famille SRC. Les cofacteurs corépresseurs, liés à la dégradation de AR, comprennent notamment HSP90, HSP 70, HSP27. Dans le cytoplasme, FOXA1 se lie à AR, et il en résulte le complexe FOXA1-AR, qui se transloque vers le noyau. Grâce à la coopération du facteur de transcription GATA2 dans la chromatine, le cofacteur SRC est recruté sur le complexe FOXA1-AR, qui favorise l'expression des gènes d'aval, ce qui aboutit au développement de CPRC (Heemers & Tindall, 2007; Chandrasekar et al., 2015).

*f) Stéroïdogénèse alternative*

Après suppression androgénique, il reste un taux de testostérone et de DHT sériques à 1/10. Ce résidu de testostérone et de DHT pourrait provenir de la déhydroépiandrostérone (DHEA) synthétisée dans la glande surrénale. Les cellules tumorales prostatiques transforment la DHEA en testostérone ou en DHT hautement actif qui se sont combinées avec AR pour favoriser la croissance tumorale, par l'intermédiaire de cellules qui possèdent une variété de stéroïdes synthases. Il s'agit là d'une voie alternative appelée 5- $\alpha$ -dione, permettant la conversion en DHT, en contournant complètement la testostérone (Cai et al., 2018).

**AR joue donc un rôle clé dans le développement du cancer de la prostate. Notamment la littérature récente a démontré que le développement des CRPC était largement dû à des mécanismes liés à AR.**

Il existe cependant d'autres altérations génomiques dans le cancer de la prostate, dont le rôle dans l'évolution cancéreuse prostatique reste à mieux déterminer.

## D. Autres altérations génomiques dans le cancer de la prostate

En 2015, Robinson et ses collaborateurs ont 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 CPRC (Robinson et al., 2015). En dehors de AR, Les altérations génomiques des gènes *ETS*, *P53* et *PTEN* ont été les plus fréquemment retrouvées, dans environ 40 à 60% des cas. De nombreuses autres altérations génomiques, notamment des gènes de réparation de l'ADN, tels que *BRCA2* ayant une fréquence plus élevée dans les CRPC par rapport aux cancers primaires ont été également mis en évidence. Tous ne sont pas ciblables mais au total, 89% des patients atteints de CPRC présentent au moins une altération génomique, suggérant l'importance du séquençage clinique et son influence sur les décisions de traitements des patients.

### 1. Altérations ciblables

Mis à part AR, plusieurs gènes et voies de signalisations potentiellement ciblables ont été impliquées dans la cancérisation prostatique, dont certaines sont en cours d'investigations actives comme la voie PI3K/AKT/TOR, le « profil BRCAness » par implications de gènes de réparations de l'ADN, dont le plus connu est *BRCA2*, ou encore les tumeurs présentant une instabilité microsatellitaire MSI-H avec un important rationnel pour la réponse aux immunothérapies. D'autres rares altérations potentiellement ciblables telles que les fusions RAF, l'amplification focale *CDK4*, les mutations *PI3K*, amplifications de *FGFR1* ont aussi été identifiées (Attard et al., 2016; Saad et al., 2019).

#### a) *BRCA* et gènes associés (profil BRCAness)

Des altérations de perte de fonction dans les gènes de réparation de l'ADN tels que les défauts de recombinaison homologue sont présents dans 20-25% des cas (Robinson et al., 2015). On retrouve notamment des altérations germinales ou somatiques de *BRCA2* parmi les plus fréquentes, survenant chez environ 6-10% des cas selon les études (Armenia et al., 2018; Robinson et al., 2015; Quigley et al., 2018). Ces données étayent l'évaluation des inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) dans le cancer métastatique de la prostate (Farmer et al., 2005; Bryant et al., 2005). En effet à la fois PARP1 et PARP2 assurent la réparation des

cassures simple brin de l'ADN par le mécanisme de « base-excision repair ». Si PARP devient incapable de réparer les cassures de l'ADN en raison de la présence d'un inhibiteur, les protéines de la recombinaison homologue BRCA1 et BRCA2 peuvent normalement compenser en réparant les cassures de l'ADN double brin (Saad et al., 2019). Chez les patients présentant des anomalies germinales ou somatiques dans ces gènes de réparation de l'ADN, l'inhibition de PARP bloque efficacement la réparation de l'ADN dans la cellule cancéreuse cible, ce qui aboutit à la mort cellulaire (Kamel et al., 2018). En particulier, les CRPC ont une augmentation de l'expression d'un panel de gènes associés à la recombinaison homologue, incluant *BRCA1*, *RAD54L*, and *RMI2*. Dans une étude combinant lignées cellulaires et modèles murins, l'enzalutamide a pour conséquence de diminuer l'expression de ces gènes associés à la recombinaison homologue dans les cellules CRPC, créant ainsi un défaut de la recombinaison homologue (HRD) et un phénotype « BRCAness » (Likun Li et al., 2017). Ce phénotype BRCAness est particulièrement sensible aux inhibiteurs de PARP comme l'ont montré les essais cliniques depuis les premiers résultats de TOPARP A en 2015 (Mateo et al., 2015) (Tableau 3). Aujourd'hui la recherche d'altérations concernant les gènes de réparation de l'ADN et notamment *BRCA* sont recommandés en routine clinique. En France, il n'existe toutefois pas encore d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) ni de financement de ces médicaments dans le cancer de la prostate.

Type d'étude	Schéma	Principaux Résultats
<b>TOPARP-A</b> (Mateo et al., 2015)	Phase 2 monobras en ouvert olaparib à la dose de 400 mg	N = 49, 16 des 49 patients ayant pu être évalués ont eu une réponse (33% ; IC95%, 20 – 48). -Sur 16 patients avec altération dans un des gènes du spectre <i>BRCA</i> , 14 (88%) ont eu une réponse à l'olaparib.
<b>TOPARP-B</b> (Mateo et al., 2020)	Phase 2 en ouvert, altération moléculaire du spectre <i>BRCA</i> . Randomisation en 1:1 pour recevoir 400 mg ou 300 mg d'olaparib	N = 98 (soit 22.6% des 711 patients screenés au total) -Réponse radiologique chez 8(24.2% ; 11.1-42.3) des 33 patients évaluables pour la cohorte 400mg et 6 (16.2% ; 6.2-32.0) des 37 patients évaluables pour la cohorte 300mg. -Meilleures réponses en cas d'altération <i>BRCA</i> documentée
<b>PROFOUND</b> (J. de Bono et al., 2020; Hussain et al., 2020)	Phase 3, en ouvert, altération moléculaire du spectre <i>BRCA</i> <b>Cohorte A:</b> <i>BRCA1, BRCA2, ATM</i> <b>Cohorte B:</b> Autres altérations du spectre <i>BRCA "BRIP1, BARD1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, PALB2, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, et RAD54L"</i> Olaparib versus HNG (Enza ou abiratéron)	<b>Résultats pour la cohorte A :</b> -Survie sans progression radiologique de 7.4 mois vs 3.6 mois en faveur groupe olaparib HR : 0.34 (0.25-0.47, p<0.001) -Survie globale médiane : 19.1 mois vs 14.7 mois en faveur groupe olaparib HR : 0.69 (0.50-0.97, p = 0.02). Résultats cohorte B moins bons Ex : Survie globale médiane : 14.1 mois avec olaparib vs 11.5 mois pour le groupe contrôle

**Tableau 3 : Résumé des principales études cliniques ayant évalué les inhibiteurs de PARP dans les cancers de la prostate.**  
HNG : Hormonothérapie de nouvelle génération

## b) *Instabilité microsatellitaire*

L'instabilité microsatellitaire correspond à la présence de mutations dans les gènes de réparation de l'ADN (gènes du système « mismatch repair » encore appelé système MMR) et témoigne souvent d'un syndrome de Lynch, qui est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante. Ces dernières années il a été montré une réponse majeure des immunothérapies inhibiteurs du checkpoint (ICK) dans les cancers présentant une instabilité microsatellitaire (phénotype MSI-H) (Le et al., 2015; Le et al., 2017).

L'autorisation de la Food and Drugs Administration (FDA) en mai 2017 pour l'anticorps monoclonal anti-PD1 pembrolizumab, de manière agnostique pour tous cancers MSI-H, ont suscité l'intérêt de ces stratégies d'immunothérapies chez les patients atteints de cancer de la prostate MSI-H.

Historiquement, les inhibiteurs du checkpoint (ICK) avaient montré un effet limité dans les cancers de la prostate. Ainsi, une étude de phase 1 avec Nivolumab chez 17 patients atteints de cancers de la prostate résistant à la castration « non sélectionnés » par la biologie moléculaire, le taux de réponse global était de 0% (Topalian et al., 2012). Deux études de phase 3 ont ensuite montré une absence d'augmentation de survie avec l'ipilimumab une fois encore chez des patients atteints de cancer de la prostate « non sélectionnés » (Kwon et al., 2014; Beer et al., 2017).

Il existe en réalité une proportion non négligeable de cancers de la prostate avancés présentant un phénotype MSI-high, ce phénotype variant selon les études entre 2.2% et 12% (Pritchard et al., 2014 ; Abida et al., 2019).

Dans une première série de 1346 patients du Memorial Sloan Kettering Cancer Center (New York), suivis pour un cancer de la prostate ayant effectué un séquençage somatique ou germlinal, 32(3.1%) présentaient une instabilité micro satellitaire. Parmi les 11 patients ayant reçu un ICK anti-PD1/PDL1, 6(54.5%) avaient une diminution de plus de 50% du taux de PSA, 4 d'entre eux avaient une réponse radiologique (Abida et al., 2019). Dans une autre série du Royal Marsden Hospital (Londres) chez 124 patients, 8.1% des patients présentaient un statut MSI-H, qui était associé à une moins bonne survie. Chez les patients MSI-H on notait un enrichissement en infiltration lymphocytaire T et en expression de PDL1 (Nava Rodrigues et al., 2018).

D'autre part, un autre biomarqueur a récemment suscité de l'intérêt pour l'immunogénicité potentielle des tumeurs prostatiques : le gène *CDK12* (Y.-M. Wu et al., 2018)

comme l'ont démontré Wu et al en réalisant une analyse génomique intégrative de 360 échantillons de patients atteints de CPRC métastatiques. Les auteurs ont identifié un nouveau sous-type immunogénique caractérisé par la perte bi-allélique de *CDK12*, une augmentation de la charge néoantigénique, une augmentation de l'infiltration en lymphocytes T intratumorale et une expansion clonale. Ils ont identifié pour ce sous-type une réponse accrue aux anti-PD1, 50% de patients ayant une diminution marquée du PSA. Des études prospectives complémentaires sont nécessaires pour que la caractérisation de ce sous-type puisse prendre une place dans la pratique clinique.

c) *Inhibition de la voie PI3K/AkT/mTOR*

La voie PI3K/AKT/mTOR, déjà associée à une activation aberrante de AR, régule la croissance, prolifération et survie des cellules cancéreuses. Au sein de cette voie, la tyrosine kinase AkT joue un rôle central dans la médiation de ses effets oncogéniques. De multiples mécanismes peuvent conduire à l'activation de la signalisation de AkT dans les cellules tumorales, notamment l'activation de mutations de AkT ou de la sous-unité p110 $\alpha$  de PI3K (PIK3CA), la perte de PTEN et/ou l'augmentation de la signalisation des récepteurs (Saad et al. 2019). *PTEN* est un gène suppresseur de tumeur qui régule négativement la voie de signalisation intracellulaire PI3K/AkT ayant un rôle dans la survie, la prolifération et le métabolisme (Khemlina et al., 2015). La perte de PTEN (40%-50% des mCPRC) notamment résulte en une activation de AkT et un plus mauvais pronostic (Saad et al., 2019).

Des résultats d'essais cliniques de phase III ont déjà été présentés, le dernier au congrès ESMO2020 concernant l'essai IPATential150 (NCT03072238) avec ipatasertib. Dans cet essai, 1101 patients étaient randomisés : 547 dans le bras ipat + abiratérone et 554 dans le bras placebo + abiratérone. L'association ipatasertib + abiratérone en première ligne de traitement pour un mCPRC augmente significativement la survie sans progression radiologique et l'activité antitumorale chez les patients avec une perte de PTEN (de Bono et al, 2020).

d) *EZH2*

EZH2 est une histone méthyltransferase, et correspond à la sous-unité enzymatique du Polycomb repressive complex-2 (PRC2), qui induit l'inhibition transcriptionnelle des gènes cibles par méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (méthylation de H3K27). Une

surexpression de *EZH2* corrèle avec la progression de la maladie et un plus mauvais pronostic dans diverses tumeurs solides, dont le cancer de la prostate (Saad et al., 2019).

Des études récentes ont mis en exergue la possibilité pour une inhibition d'EZH2 d'outrepasser la résistance à l'enzalutamide pour les CPRC en induisant l'expression de gènes qui inhibent la signalisation AR et sont co-réprimées par AR et EZH2, comme par exemple *CCN3* (L. Wu et al., 2014; Fong et al., 2017). Il a également été démontré que l'inhibition de l'EZH2 empêche la reprogrammation cellulaire et la différenciation des tumeurs prostatiques en cancer de la prostate de type neuroendocrine résistant à l'enzalutamide (Kelly & Balk, 2017; Ku et al. 2017; Dardenne et al., 2016).

Sur la base des résultats précliniques, les inhibiteurs de EZH2 pourraient ainsi contribuer à améliorer les résultats en association avec les thérapies anti-androgènes chez les patients atteints de mCPRC à un stade précoce ou avancé, grâce à une activité antitumorale accrue et à une resensibilisation potentielle des tumeurs résistantes à l'hormonothérapie. Une phase Ib-II (ProSTAR, NCT03480646) évaluant CPI-1205 avec enzalutamide ou abiraterone/prednisone chez des patients avec un mCPRC après une première thérapie inhibitrice de AR et une étude de phase I/II ORION-E, NCT03525795) étudiant une combinaison de CPI-1205 avec ipilimumab chez les patients atteints de tumeurs solides avancées sont en cours (M.-E. Taplin et al., 2018).

#### e) *Inhibition de la voie Hedgehog*

La voie Hedgehog (Hh) est physiologiquement impliquée dans le développement des organes et la régulation des cellules souches par la régulation de la transcription médiée par les protéines Gli. Dans le cancer de la prostate, des anomalies de signal Hh peuvent augmenter le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse aboutissant à la dissémination tumorale (Saad et al., 2019). D'autre part, un « crosstalk » entre AR et la voie Hh peut contribuer à la résistance à la castration. En effet, dans des modèles pré-cliniques de xénotransplantes avec cellules LNCap résistantes à la castration, il a été montré que l'utilisation de l'inhibiteur de Hh/Smoothed TAK-441 diminuait la progression tumorale. L'expression des gènes murins activés par le Hh (Gli1, Gli2 et Ptch1) a également été réduite, ce qui suggère que le TAK- 441 pourrait retarder la progression tumorale dans le CRPC en perturbant la signalisation paracrine médiée par la voie Hh dans le microenvironnement de la tumeur (Ibuki et al., 2013). Des essais cliniques chez l'homme sont nécessaires pour préciser l'efficacité de ces médicaments.



*f) Inhibition de MDM2*

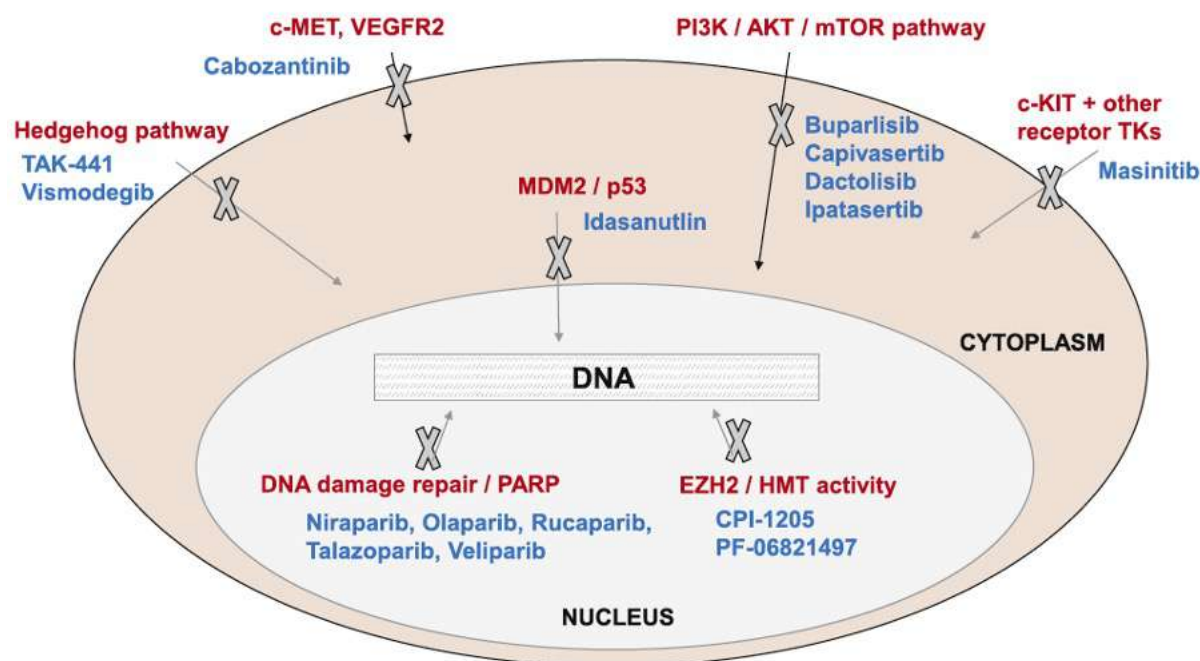
La protéine MDM2, une protéine ubiquitine-ligase E3, est un régulateur négatif de P53, un puissant gène suppresseur de tumeur capable d'induire l'arrêt du cycle et la mort cellulaire après activation par un stress cellulaire ou un oncogène (Harris & Levine, 2005). Comme la majorité des cancers de la prostate ont un P53 fonctionnel, l'inhibition de la MDM2 par des antagonistes spécifiques, c'est-à-dire Nutlines, analogues de la cis-imidazoline, peut libérer l'activité du P53 endogène, entraînant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules cancéreuses cibles. De plus, en raison de l'interférence des voies de signalisation entre P53 et AR, l'activation de P53 peut augmenter les effets antitumoraux de la suppression androgénique dans le cancer de la prostate.

Chez les patients atteints de mCPRC, les résultats pharmacodynamiques préliminaires d'une étude de dosage de l'idasanutline, antagoniste du MDM2 de deuxième génération, en association avec l'abiraterone/prednisolone ou l'enzalutamide, ont montré une activation de P53 et une induction de la cytokine-1 inhibitrice des macrophages (Q. Ding et al., 2013). Des essais cliniques chez l'homme sont nécessaires pour préciser l'efficacité de ces médicaments.

*g) Autres voies*

- La voie MET a déjà été ciblée par le Cabozantinib/XL-184, un inhibiteur c-MET/VEGFR2 qui peut aussi inhiber AXL et récepteur RET. Malheureusement le développement du Cabozantinib a été stoppée suite aux résultats négatifs en survie globale de l'essai COMET-1 (D. C. Smith et al., 2013).
- La voie KIT a été ciblée par le masitinib, un inhibiteur de tyrosine kinase multi-cibles (c-KIT, FGFR3, PDGFR  $\alpha/\beta$ ) (Marech et al., 2014) (Marech, 2014). Une étude de phase III, AB12003 (NCT03761225) est en cours pour comparer efficacité et la tolérance du masitinib en combinaison avec docetaxel/prednisone versus docetaxel/prednisone en première ligne de mCPRC.

La Figure 5 illustre l'ensemble de ces altération ciblables et les thérapies associées.



**Figure 5 : Voies de signalisation, réparation de l'ADN, voie épigénétique ciblée par les petites molécules actuellement en cours d'investigation dans les cancers de la prostate avancé (d'après F.Saad et al., 2019).**

EZH2: enhancer of zeste homologue 2; HMT: histone methyl-transferase; MDM2: mouse double minute 2 homolog; MET: mesenchymal-epithelial transition factor; mTOR: mammalian target of rapamycin; PARP: poly-ADP ribose polymerase; PI3K: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; TK: tyrosine kinase; VEGFR2: vascular endothelial growth factor receptor 2.

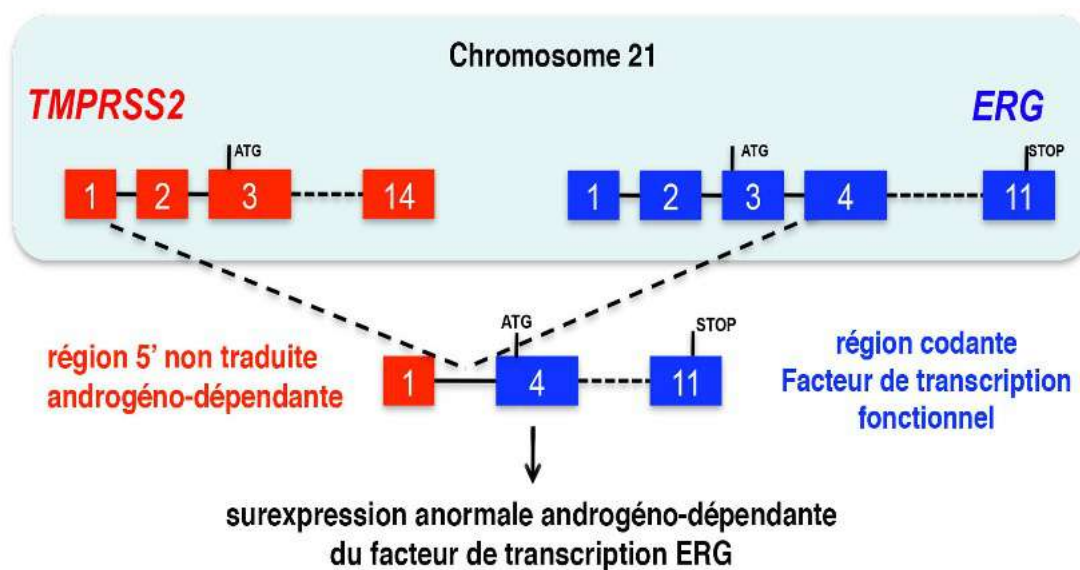
## 2. Autres altérations, non ciblables pour le moment

### a) Réarrangements chromosomiques *TMPRSS2:ETS*

Les facteurs de transcription ETS (E twenty Six) régissent une pléthore de processus, notamment le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation, la prolifération, l'apoptose, le remodelage des tissus et l'angiogenèse. Dans les cancers, la perturbation des facteurs ETS aboutit à une initiation tumorale, une progression de la tumeur et une dissémination métastatique. C'est notamment le cas pour les leucémies et certaines tumeurs solides comme les sarcomes d'Ewing avec la fusion *EWS:FLII* (Sizemore et al., 2017).

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

Dans le cancer de la prostate, la présence de gènes de fusion *TMPRSS2:ERG*, issus de remaniements chromosomiques, a été identifiée en 2005 et a ouvert une nouvelle voie dans la compréhension du processus de cancérisation de la prostate (Tomlins et al., 2005; Rubin et al., 2011). Ces fusions impliquent d'une part la partie promotrice non-codante du gène hormono-dépendant *TMPRSS2* (Transmembrane protease serine 2), et d'autre part la partie codante des gènes de la famille des facteurs de transcription ETS, le gène *ERG* (ETS Related Gene) dans plus de 50% des cas (Figure 6), mais aussi les gènes *ETV1*, *ETV4* et *ETV5* (*ETS Variant 1, 4 et 5*) dans environ 10% des cas (Tomlins et al., 2009).



**Figure 6 : Gène de fusion *TMPRSS2:ERG* dans le cancer de la prostate.**

La détection de la fusion *TMPRSS2:ERG* par FISH et le suivi de l'expression anormale de ERG, montre qu'il s'agit d'un événement retrouvé de manière commune dans plus de 50% des cas de cancer de la prostate (Kumar-Sinha et al., 2008). L'isoforme la plus fréquente du gène de fusion, appelée T1E4, correspond à la fusion de l'exon 1 non codant du gène *TMPRSS2*, avec l'exon 4 codant du gène *ERG* (Clark et al., 2008). Les nombreux transcrits de fusion sont ainsi à l'origine de protéines ERG pouvant être soit de pleine longueur, soit tronquées au niveau de la partie N-terminale de 32 acides aminés. Cependant les domaines fonctionnels sur la protéine ERG, en particulier les domaines PNT et ETS, ainsi que deux domaines transactivateurs et deux domaines inhibiteurs sont conservés.

Les cancers de la prostate, à l'instar d'autres cancers étant hétérogènes, il est possible de trouver des foyers tumoraux exprimant ou non un gène de fusion. La présence des différents

réarrangements chromosomiques semble être mutuellement exclusive dans une même cellule, ou un même foyer tumoral prostatique (Tomlins et al., 2005; Tomlins et al., 2009; Attard et al., 2016).

On distingue de nombreux gènes de fusion 5', dont certains sont exprimés de manière constitutive et ne sont pas régulés par les androgènes (par exemple, HNRPA2B1), et d'autres membres de la famille ETS sont également moins fréquemment impliqués (Tableau 4) (Tomlins et al., 2007).

Partenaire de fusion 5'	Spécifique de la prostate	Régulé par les androgènes	Partenaire ETS	Fréquence
<i>TMPRSS2</i> (chr 21q)	+	+	ERG (chr 21q)	50
<i>SLC45A3</i> (chr 1q)	+	+		<1
<i>NDRG1</i> (chr 8)	+/-	+		<1
<i>SLC45A3</i> (chr 1q)	+	+	FLI1	<1
<i>TMPRSS2</i> (chr 21q)	+	+	ETV1 (chr 7p)	<1
<i>SLC45A3</i> (chr 1q)	+	+		<1
<i>FOXP1</i> (chr 3p)	ND	ND		<1
<i>EST14</i> (chr 14q)	+	+		<1
<i>HERVK17</i> (chr 17p)	+			<1
<i>HERV-K</i> 22q11.23	+	+		<1
<i>C15ORF21</i> (chr 15q)	+	+(bas)		<1
<i>HNRPA2B1</i> (chr 7p)	-	-		<1
<i>ACSL3</i> (chr 2q)	+/-	+		<1
<i>TMPRSS2</i> (chr 21q)	+	+	ETV4 (chr 17q)	<1
<i>KLK2</i> (chr 19p)	+	+		<1
<i>CANT</i> (chr 17q)	+	+		<1
<i>DDX5</i> (chr 17q)	-	-		<1
<i>TMPRSS2</i> (chr 21q)	+	+	ETV5 (chr 3q)	<1
<i>SLC45A3</i> (chr 1q)	+	+		<1
<i>SLC45A3</i> (chr 1q)	+	+	ELK4 (chr 1q)	<1

**Tableau 4 : Gènes de fusion ETS dans le cancer de la prostate** (d'après Gasi Tandefelt et al., 2014). ND, non déterminé.

Cependant, les études génomiques, épigénétiques et transcriptomiques montrent que les tumeurs ETS-positives se distinguent des tumeurs ETS-négatives, par des modifications de l'expression de plusieurs gènes qui surviennent exclusivement dans les tumeurs prostatiques ETS négatives (Berger et al., 2011; Rubin et al., 2011; Börno et al., 2012). Par exemple, *SPINK1*, qui code un inhibiteur de la sérine protéase, est nettement surexprimé dans environ 5 à 10% des cancers de la prostate, et les cancers *SPINK1*-positifs sont exclusivement ETS-négatifs (Rubin et al., 2011). De même, des mutations de *SPOP*, se produisent dans environ 5 à 10 % des cancers de la prostate, et les cancers *SPOP* mutés sont exclusivement ETS négatifs (Barbieri et al., 2012; Berger et al., 2011; Grasso et al., 2012; Lindberg et al., 2013) mais sont associés à des délétions *CDHI* (Barbieri et al., 2012). La majorité des études n'a pas retrouvé

d'impact en termes de pronostic de la présence d'une fusion *TMPRSS2:ERG* et la littérature est discordante à ce sujet (Sizemore et al., 2017). Cependant la combinaison entre la fusion *TMPRSS2:ERG* et la délétion de PTEN prédit la récurrence. L'utilité de la fusion *TMPRSS2:ERG* peut également être clinique avec la possibilité de détection dans l'urine lors de stratégies diagnostiques (Sizemore et al., 2017).

L'équipe d'accueil, dans deux études récentes s'est questionnée sur le rôle des fusions *TMPRSS2:ERG* dans le développement des métastases osseuses du cancer de la prostate. Une première étude a montré que, lorsqu'on injectait des clones cellulaires surexprimant la fusion en intra-cardiaque chez des souris, il était observé davantage de lésions osseuses par rapport aux souris chez qui on avait injecté des clones cellulaires ne surexprimant pas la fusion (Deplus et al., 2017). Une autre étude a mis en évidence que l'injection intra-tibiale de clones cellulaires surexprimant la fusion *TMPRSS2:ERG* chez des souris entraînait la formation de lésions osseuses ostéoblastiques telles que celles retrouvées chez les patients présentant un cancer de la prostate métastatique (Delliaux et al., 2018).

La compréhension fine du rôle de la fusion dans le développement des métastases osseuses du cancer de la prostate passe par la connaissance des gènes régulés par le facteur de transcription ERG. C'est pourquoi une étude transcriptomique a été réalisée à partir des clones cellulaires surexprimant la fusion.

*b) Autres :*

Enfin, d'autres gènes sont fréquemment dérégulés dans le cancer de la prostate. Parmi les principaux gènes non ciblés, on distingue l'oncogène *MYC* et aussi *RBI* (Tableau 5) (Khemina et al., 2015).

<b>Gène</b>	<b>Fonction</b>	<b>Ciblage possible ?</b>	<b>Aberration et fréquence</b>
<b>MYC</b>	Facteur de transcription Contrôle de l'expression de gènes spécifiques ayant un rôle dans le cycle cellulaire, l'apoptose et la transformation cellulaire	Non	Amplification : 2-20%
<b>RB1</b>	Gène suppresseur de tumeur Régulateur de l'entrée dans le cycle cellulaire	Non	Mutation 1-14% Perte : 5-23%

**Tableau 5 : Autres gènes non ciblables actuellement dérégulés dans le cancer de la prostate (d'après Khemlina et al., 2015).**



## IV. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

### A. Cancer de la prostate localisé et localement évolué

#### 1. Armes thérapeutiques et stratégies de choix.

Les possibilités thérapeutiques (Tableau 7) se discutent selon que le cancer de la prostate soit localisé ou localement avancé, et selon le niveau de risque estimé par la classification de d'Amico (Tableau 6). Cette classification ancienne, de plus en plus remise en cause à l'heure des imagerie prostatiques performantes (IRM prostatique) se base sur le stade TNM (Tumor, Nodes, metastases), le score de Gleason et le taux de PSA (en ng/mL).

	Stade TNM	Score de Gleason	Taux de PSA (ng/ml)
<b>Faible I</b>	≤ T2a	≤ 6	≤ 10
<b>Intermédiaire II</b>	T2b	7	10-20
<b>Elevé III</b>	≥ T2c	≥8	≥ 20

**Tableau 6 : Niveau de risque de rechute biologique estimé par la classification de d'AMICO (d'après D'Amico, et al., 1998).**



	I	II	III
<b>Surveillance active</b>	<p>C'est une option thérapeutique curative</p> <p><u>Indication préférentielle</u> : espérance de vie &gt; 10 ans ou faible volume tumoral</p> <p>Ne pas traiter immédiatement un cancer de la prostate cliniquement localisé à (très) faible risque de progression chez des patients demandeurs ayant une espérance de vie &gt; 10 ans</p> <p><u>Modalités</u> : dosage PSA sérique total tous les 6 mois, biopsies à 1 an puis tous les 2-3 ans</p>	+	
<b>Ultrasons focalisés de haute intensité</b>	<p><u>Indications préférentielles</u> : stade localisé T1-T2 N0M0, patients &gt; 70 ans avec espérance de vie d'au moins 7 ans</p> <p><u>Modalités</u> : application d'ultrasons focalisés de haute intensité, sous AG ou péridurale, guidé par échographie, après résection transurétrale de prostate</p>	+	
<b>Prostatectomie totale</b>	<p><u>Indication préférentielle</u> : espérance de vie &gt; 10 ans, âge ≤ 75 ans.</p> <p><u>Modalités</u> : ablation totale de prostate + vésicules séminales, curage ilio-obturateur bilatéral (optionnel pour les faibles risques, indiqué si risque intermédiaire).</p> <p><u>Effets secondaires</u> : impuissance (75 % des cas), anéjaculation constante, incontinence urinaire (5 à 10%).</p> <p>Risques évolutifs : récidive locale ou à distance</p>	+	+
<b>Radiothérapie externe conformationnelle</b>	<p><u>Indication préférentielle</u> : espérance de vie &gt; 10 ans, risque chirurgical important, conserver la sexualité (discutée).</p> <p><u>Modalités</u> : 74 Gy en 6 ou 8 semaines lorsqu'elle est utilisée seule, 70 Gy en association avec l'hormonothérapie.</p> <p>Les techniques modernes de radiothérapie par modulation d'intensité « IMRT » (Tomothérapie®) sont de plus en plus utilisées.</p> <p>De plus, les schémas hypofractionnés (avec la radiothérapie stéréotaxique de type Cyberknife®) deviennent des options thérapeutiques validées, et permettent de diviser le nombre de séance par un facteur 2, avec un recul et une efficacité satisfaisante.</p> <p><u>Effets secondaires</u> : Impuissance (40 à 50%), cystite/ rectite/ iléite radique, sténose urétrale. L'amélioration des techniques permet de limiter ces effets secondaires.</p>	+	+
<b>Curiothérapie</b>	<p><u>Indication préférentielle</u> : faible risque en l'absence de contre-indications, volume prostatique &lt; 50 cc, pas de troubles urinaires (score mictionnel et débitmétrie satisfaisants), absence de résection transurétrale de prostate (RTUP)</p> <p><u>Modalités</u> : implant permanent de grains d'iode 125.</p> <p><u>Effets secondaires</u> : hématurie (précoce), dysurie, impériosités mictionnelles.</p>	+	
<b>Hormonothérapie</b>	<p>Association radiothérapie-hormonothérapie = traitement de référence pour le stade III</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Hormonothérapie prolongée au moins 3 ans</li> <li>-Le champ d'irradiation comprend les aires ganglionnaires</li> </ul> <p>NB : Dans certains cas particuliers (hommes jeunes, signes fonctionnels urinaires etc..) la prostatectomie avec curage ganglionnaire peut être proposée.</p>		+

**Tableau 7 : Possibilités thérapeutiques dans le cancer de la prostate localisé. D'après Anthony Turpin & Tiphaine Lebon, L'essentiel en Cancérologie, réédition 2016. I, II, III : stades de d'Amico.**

## B. Cancer de la prostate avancé ou métastatique

### 1. Armes thérapeutiques

#### a) *Chimiothérapies*

Les chimiothérapies utilisées en pratique dans le cancer de la prostate sont :

- Le docétaxel 75mg/m<sup>2</sup> depuis les résultats de l'étude TAX327 ayant montré la supériorité en termes de survie globale d'une chimiothérapie par docétaxel 75 mg/m<sup>2</sup> associé à la prednisone 10 mg/jour en comparaison à la mitoxantrone plus prednisone (Tannock et al., 2004).

Il s'agit d'une chimiothérapie cytotoxique de la classe des poisons du fuseau, famille des taxanes. Le mécanisme d'action est une inhibition de la dépolymérisation des microtubules.

- Le cabazitaxel 25 mg/m<sup>2</sup> depuis les résultats de l'essai TROPIC ayant montré la supériorité du cabazitaxel en comparaison à la mitoxantrone en termes de survie globale chez les patients résistants à la castration progressant après docétaxel (de Bono et al., 2010).

Il s'agit de nouveau d'une chimiothérapie cytotoxique de la classe des poisons du fuseau, famille des taxanes. Son mécanisme d'action est également un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules.

#### b) *Hormonothérapies agonistes ou antagonistes de la LHRH*

Les agonistes ou antagonistes de la LHRH s'utilisent dans les cancers de la prostate métastatiques sensibles à la castration, et constituent un traitement chronique du cancer de la prostate, à poursuivre à vie selon les dernières recommandations ESMO (Cornford et al., 2016).

- Agonistes de la LHRH

Le mode d'action des agonistes de la LHRH s'explique par un rétrocontrôle au niveau hypophysaire : les récepteurs hypophysaires pour la LHRH sont totalement saturés et deviennent insensibles à tout autre stimulus. Puis les récepteurs gonadiques pour la LH ou la FSH sont aussi réduits. La poursuite de doses élevées des agonistes de la LHRH entraîne une inhibition des fonctions pituitaires et gonadiques (privation des stéroïdes sexuels). Il existe un risque d'effet « flare-up » c'est-à-dire de sécrétion paradoxale de testostérone par le testicule, par rétrocontrôle dans le premier temps de saturation des récepteurs hypophysaires (Singla et al., 2019).

Les principaux médicaments utilisés sont :

- La triptoréline
- La buséréline
- La goséréline
- La leuproréline

- Antagonistes de la LHRH

Les antagonistes de la LHRH (dégarelix) bloquent directement les récepteurs hypophysaires, ce qui entraîne une castration rapide et réversible avec moins d'effet « flare-up », en début de traitement même si ce dernier n'est pas nul (Dellis & Papatsoris, 2017).

Effets secondaires communs aux agonistes et antagonistes de la LHRH :

- Bouffées vasomotrices souvent intenses, tardant à se dissiper malgré la prolongation du traitement
- Ostéopénie et ostéoporose
- Sensibilité mammaire voire gynécomastie
- Effets en rapport avec l'effet « flare up » (surtout pour les agonistes de la LHRH)
  - Survenue de douleurs osseuses, avec risque de compression médullaire si les métastases se situent au niveau du rachis ou la dure-mère
  - Survenue de rétention urinaire chez l'homme
  - Hypercalcémie chez la femme porteuse de métastases osseuses
- Effets cardiovasculaires généraux et effets métaboliques
  - Ils seraient dus à des facteurs divers : augmentation du poids et de la masse grasseuse, résistance à l'insuline, diabète de type II, de syndrome métabolique.

On observerait un risque accru d'infarctus du myocarde, d'arythmies ventriculaires, de décès soudains d'origine cardiaque, dans certaines études.

- Effets cognitifs
  - Le lien entre fonction cognitive, androgènes et œstrogènes est établi. Cependant, du fait du retentissement sur l'humeur de la castration, il est souvent difficile de se prononcer sur les fonctions cognitives.
- Les anti-androgènes stéroïdiens ou non stéroïdiens

Leur objectif est de bloquer le récepteur des androgènes directement et parfois associé à une inhibition centrale pour les anti-androgènes stéroïdiens.

Ex :

- anti-androgènes stéroïdiens : acétate de cyprotérone
- anti-androgènes non stéroïdiens : bicalutamide

### c) *Hormonothérapies de nouvelle génération*

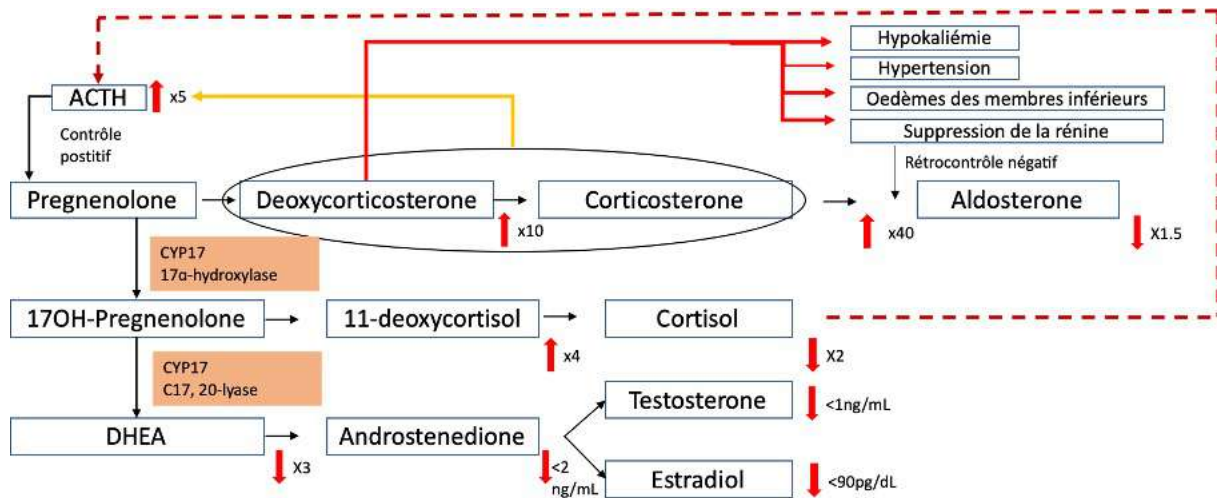
Les hormonothérapies de nouvelles générations visent à inhiber le récepteur aux androgènes, et s'utilisent en complément de la castration continue, à vie par agoniste ou antagoniste de la LHRH. Leur place initialement limitée aux cancers résistant à la castration est de plus en plus précoce dans la stratégie thérapeutique, chez les patients sensibles à la castration depuis les essais récents (<5 ans).

On distingue :

- Acétate d'abiratérone

L'acétate d'abiratérone est transformé *in vivo* en abiratérone, un inhibiteur de la biosynthèse des androgènes. Plus spécifiquement, l'abiratérone inhibe de manière sélective l'enzyme 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17,20-lyase (CYP17). Cette enzyme est exprimée et nécessaire lors de la biosynthèse des androgènes au niveau des testicules, des glandes surrénales et des tissus tumoraux prostatiques. Le CYP17 catalyse la conversion de la prégénolone et de la progestérone en précurseurs de la testostérone, respectivement la DHEA et l'androstènedione,

par 17 $\alpha$ -hydroxylation et rupture de la liaison C17,20. L'inhibition du CYP17 entraîne également une augmentation de la production de minéralocorticoïdes par les glandes surrénales (Figure 7) (Thakur et al., 2018).



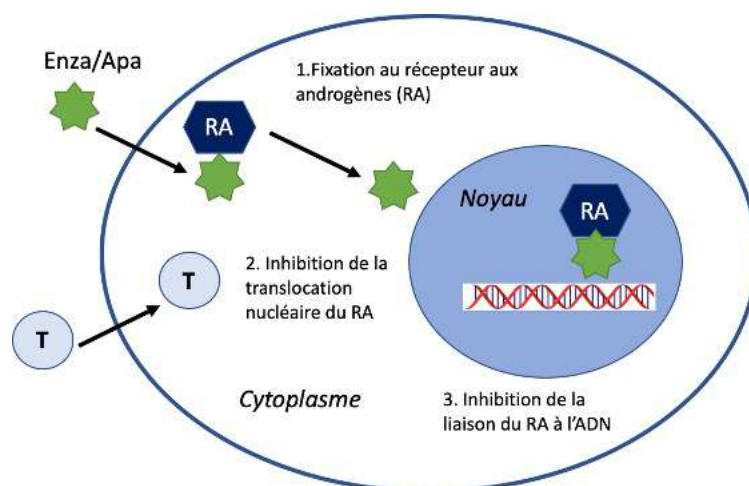
**Figure 7 : Mécanisme d'action de l'acétate d'abiratérone**  
Niveau d'action (en rose) et conséquences (flèches rouges)

- Enzalutamide

L'enzalutamide est un inhibiteur puissant de la voie de signalisation des récepteurs aux androgènes, qui en bloque plusieurs étapes. L'enzalutamide inhibe de façon compétitive la liaison des androgènes à leurs récepteurs, et inhibe donc la translocation nucléaire des récepteurs activés, et inhibe leur fixation à l'ADN et ce, même en cas de surexpression des récepteurs aux androgènes ou dans les cellules cancéreuses résistantes aux anti-androgènes (Figure 8) (Scott, 2018).

- Apalutamide

L'apalutamide est un inhibiteur sélectif du récepteur aux androgènes, administré par voie orale, qui se lie directement au domaine de liaison du ligand de AR. L'apalutamide empêche la translocation nucléaire de AR, inhibe la liaison à l'ADN, ralentit la transcription médiée par AR, et n'a pas d'activité agoniste sur le récepteur aux androgènes (Figure 8). L'apalutamide diminue la prolifération cellulaire tumorale et augmente l'apoptose entraînant une activité antitumorale puissante. Un métabolite majeur, le N-desméthyl apalutamide, représente un tiers de l'activité *in vitro* de l'apalutamide (Rathkopf & Scher 2018).



**Figure 8 : Mécanisme d'action de l'enzalutamide et apalutamide (d'après Beuzeboc et al., 2014).**

- Darolutamide

Le darolutamide est aussi un inhibiteur sélectif de AR, en cours de développement, avec des premiers résultats (étude de phase III ARAMIS) en faveur d'une efficacité dans le cancer de la prostate non métastatique résistant à la castration. Actuellement il n'y a pas d'AMM en France ni de remboursement de ce médicament (Scott, 2020).

#### d) Immunothérapies

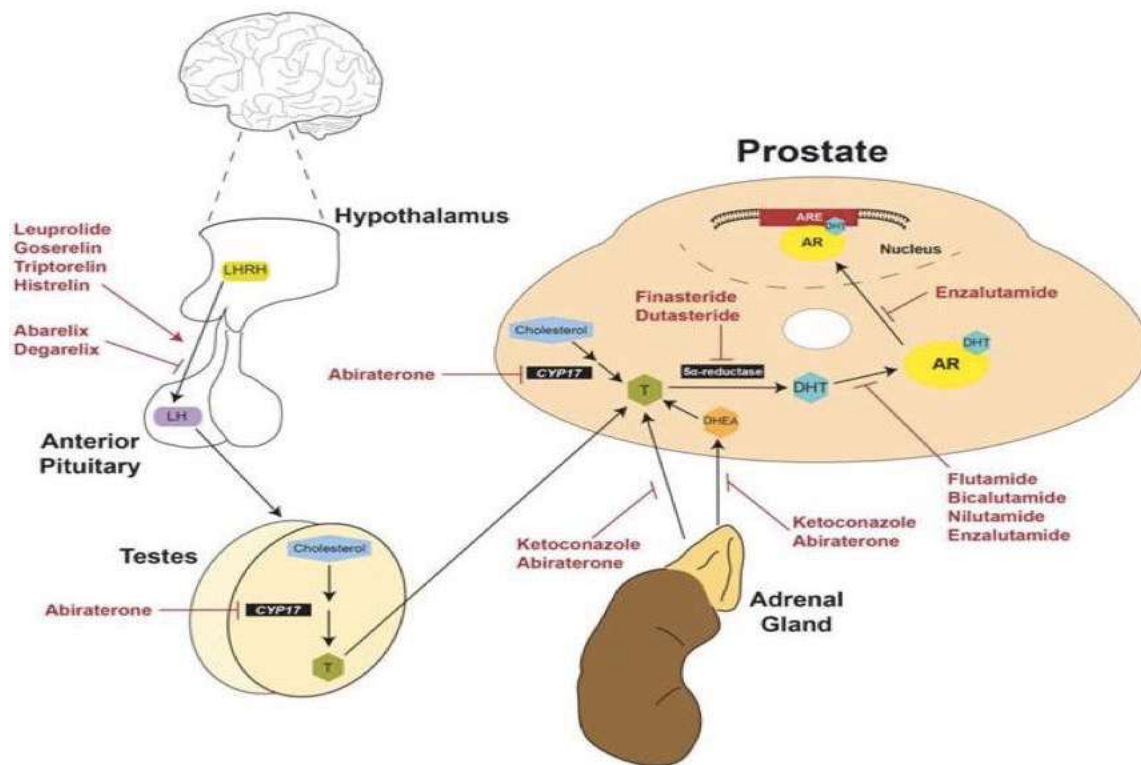
Il n'y a pas de place à l'heure actuelle en France pour les immunothérapies dans le cancer de la prostate. Des cas rares de cancers de la prostate (<3%) survenant dans le cadre d'un syndrome de Lynch et présentant une instabilité microsatellitaire (MSI-H) sont susceptibles d'être répondeurs aux immunothérapies anti-PD1 (Abida et al., 2019).

Par ailleurs, la place du vaccin Sipuleucel T n'est pas reconnue en France, même s'il existe une augmentation de survie globale d'environ 4 mois avec ce traitement (Kantoff et al., 2010), ayant amené certaines recommandations internationales à le préconiser chez les patients résistants à la castration (Parker et al., 2015). La détermination d'un sous-groupe de cancers de la prostate non MSI-H répondeur aux immunothérapies fait l'objet de nombreuses recherches, comme celle des cancers de la prostate avec inactivation de CDK12 (Wu et al., 2018).

e) *Thérapies moléculaires (inhibiteurs de PARP)*

L'avènement récent d'inhibiteurs de PARP tels que olaparib dans le cancer de la prostate est récent et va devenir très prochainement un nouveau standard thérapeutique chez les patients présentant des altérations des gènes du spectre BRCA (Ramakrishnan et al., 2017). En 2015, une première étude de phase 2 a montré une présence d'altération de gènes de réparation de l'ADN (*BRCA*, *ATM*, *Fanconi*, *Chek2*) chez 16/49 patients avec un taux de réponse de 88% aux inhibiteurs de PARP chez les patients concernés, surtout chez les patients avec altérations de *BRCA* (Mateo et al., 2015). Les résultats de l'essai de phase 3 PROfound ont été présentés à l'ESMO 2019 et publiés en 2020. Il s'agit d'un essai positif sur son objectif principal car la survie sans progression à l'imagerie radiologique a été significativement augmentée dans le bras olaparib (7.4 mois vs. 3.6 mois ; hazard ratio pour la progression ou le décès de 0.34; 95% IC95% 0.25 to 0.47; P<0.001). Un bénéfice significatif a aussi été retrouvé pour les objectifs secondaires de taux de réponse radiologique et aussi de délai jusqu'à la survenue de douleurs. Par ailleurs, les résultats étaient plus marqués chez les patients présentant des mutations/altérations de *BRCA1* et *BRCA2* que des gènes associés (*ATM*, *Fanconi*, *Chek2*...) (de Bono et al., 2020).

La Figure 9 ci-dessous résume les principales hormonothérapies utilisées dans le cancer de la prostate



**Figure 9 : Synthèse des hormonothérapies existantes dans le cancer de la prostate (d'après Wadosky & Koochekpour 2016).**

## 2. Stratégies thérapeutiques

### a) *Maladie sensible à la castration*

- Suppression androgénique

Historiquement, la suppression androgénique (i) médicale avec l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes de l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LHRH) ou (ii) chirurgicale par orchidectomie bilatérale, constitue le *primum movens* du traitement du cancer de la prostate métastatique nouvellement diagnostiqué avec un niveau de preuve I dans les référentiels internationaux majeurs ESMO et ASCO (Mottet et al., 2018; Cornford et al., 2016).

Il n'y a pas de préférence dans la méthode de castration médicamenteuse ou chirurgicale dans la littérature (Dellis et al., 2019). Les taux moyens de testostérone chez les patients soumis à une orchidectomie bilatérale étaient de 15 ng/dl. Cependant, le niveau acceptable de castration est défini par des niveaux de testostérone inférieurs à 50 ng/dl.

En outre, les groupes d'experts reconnaissent qu'il n'y a pas de différence d'efficacité entre les agonistes et les antagonistes de la LHRH (Mottet et al., 2018; Cornford et al., 2016).



- Blocage combiné des androgènes.

L'ajout d'un anti-androgène non stéroïdien à la suppression androgénique médicamenteuse standard a été associé à un avantage minime en termes de survie, et à une toxicité accrue (Dellis et al., 2019). Par conséquent, le blocage androgénique anciennement appelé « blocage androgénique complet » est soit exclus des recommandations internationales (Cornford et al., 2016; Parker et al., 2015; Golabek et al., 2016), soit considéré comme une alternative à la suppression androgénique pour certains patients (Cassinello et al., 2018; Thomas et al., 2016; Gillessen et al., 2015; Gillessen et al., 2019). Au contraire, il est unanimement suggéré de ne pas proposer de monothérapie anti-androgène pour les maladies métastatiques hormono-sensibles (Dellis et al., 2019).

- Suppression androgénique intermittente

La suppression androgénique intermittente (SAI) chez les patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique a été considérée comme une approche qui pourrait obtenir une efficacité égale à celle de la suppression androgénique continue (SAC) et améliorer la qualité de vie des patients. Cette approche consiste à proposer des pauses thérapeutiques sans SA lorsque la maladie est contrôlée.

En pratique clinique, la SAI reste une option pour certains patients bien informés pour la majorité des médecins comme le suggère le consensus issu de l'Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) en 2015 (Gillessen et al., 2015).

Cependant, le plus grand essai clinique randomisé de phase III qui comparait la SAI et la SAC chez des patients atteints d'un cancer métastatique de la prostate n'a pas réussi à démontrer la non-infériorité de la SAI (Hussain et al., 2013). Ainsi, il existe une variabilité des recommandations entre les référentiels internationaux concernant la question de la SAI, souvent débattue aussi pour des raisons de qualité de vie chez les patients.

- Docétaxel ou hormonothérapie de nouvelle génération plus ADT ?

Le débat sur le BAC et la SAI a perdu de son importance dans la gestion moderne du cancer de la prostate métastatique sensible à la castration (mCPSC) depuis la présentation d'essais randomisés combinant suppression androgénique standard avec une chimiothérapie de type docétaxel ou une hormonothérapie de nouvelle génération comme l'abiraterone ou enzalutamide (Tableau 8) (Sweeney et al., 2015; James et al., 2017; Fizazi et al., 2017; Armstrong et al., 2019).



Type d'étude	Schéma	Principaux résultats
<b>CHARTEED</b> (Sweeney et al., 2015; Kyriakopoulos et al., 2018)	Phase 2 SA + docétaxel 75mg/m <sup>2</sup> /21 jours vs SA seule	N = 790 patients randomisés, 397 bras docétaxel, 393 bras SA seule Après un suivi de 28.9 mois (présentation première en 2014) - Résultats significativement positifs en survie globale (critère de jugement principal) en faveur groupe docétaxel (57.6 mois versus 44.0 mois, Hazard ratio pour le décès dans le bras SA + docétaxel : 0.61 (95% CI, 0.47-0.80) P < 0.001) - Après actualisation de la survie après un suivi de 53.7 mois, la SG médiane était de 57.6 mois en faveur bras SA+ docétaxel versus 47.2 mois pour la SA seule - Bénéfice du docétaxel surtout chez les patients ayant un « haut volume tumoral »*(51.2 mois versus 34.4 mois en faveur bras SA + docétaxel (HR, 0.63; 95% CI, 0.50 - 0.79; P < 0.001). Avec faible volume (n = 277), pas de bénéfice en SG (HR, 1.04; 95% CI, 0.70 - 1.55; P = 0.86).
<b>GETUG 15</b> (Gravis et al., 2013)	Phase 3, ouverte SA+docétaxel versus SA	N = 385 patients randomisés dont 192 bras docétaxel + SA et 193 bras SA. Après un suivi médian de 50 mois, pas de bénéfice de l'adjonction du docétaxel à la SA. - Survie globale médiane 58.9 mois bras docétaxel + SA versus 54.2 mois bras SA seule (HR, 1.01, 95% CI 0.75-1.36).
<b>STAMPEDE</b> (James et al., 2016; Parker et al., 2018)	Design complexe multi stade, multi-étapes, chaque bras étudiant l'apport d'un traitement (SA seule, SA + docétaxel, SA + docétaxel + acide zolédronique, SA + acide zolédronique) <u>2 études</u> 1) « Outcomes » selon les possibilités de traitement en plus de la SA 2) Apport de la radiothérapie de la tumeur primitive en plus d'une prise en charge dans le cadre de STAMPEDE.	1) N= 2962 hommes randomisés Après 43 mois de suivi médian : - Pas de bénéfice de l'acide zolédronique - Bénéfice significatif du docétaxel + SA La survie moyenne sans échec, limitée aux 84 premiers mois de l'essai, était de 34.8 mois avec SA seule, contre 44.2 mois avec SA + Doc (différence 9-4 mois, 95% CI 6-6-12-3 ; p=0-556 × 10-10) et contre 43.1 mois avec SA + ZA + Doc (différence 8.3 mois, 95% CI 5.5-11- ; p=0-480 × 10-8). 2) N = 1029 patients sans radiothérapie (contrôles) dans le cadre de l'essai STAMPEDE ; 1032 pts ayant reçu de la radiothérapie prostatique - La radiothérapie a amélioré la survie sans échec (HR 0.76, 95 % IC 0.68-0.84 ; P <0.0001) mais pas la survie globale (0.92, 0.80-1.06 ; P = 0.266).

<p><b>HORRAD</b> (Boevé et al., 2019)</p>	<p>SA ou SA + radiothérapie de la tumeur primitive prostatique.</p>	<p>N = 432 patients randomisés Pas de différence significative en survie globale (critère de jugement principal) - Hazard ratio : 0.90; 95% CI: 0.70-1.14; P = 0.4). - Sauf si maladie à faible volume tumoral* dans une analyse de sous-groupe pré-spécifiée (SG augmentée de 73% à 81% à 3 ans)</p>
<p><b>LATITUDE</b> (Fizazi et al., 2017; Fizazi et al., 2019)</p>	<p>Phase 3. SA + Abi 1000mg/jour + prednisone 5 mg/jour vs SA seule. Cancers de la prostate à « haut risque »**.</p>	<p>N = 1199 patients, dont 597 dans le bras SA + Abi et 602 dans le bras Abi seule. Après un suivi médian de 30.4 mois : - Résultats significativement positifs en survie globale (critère de jugement principal) - Hazard ratio pour le risque de décès, 0.62; 95% CI 0.51 to 0.76; P &lt; 0.001. - Effets secondaires de type HTA et hypokaliémies de grade 3 plus fréquents dans bras SA + Abi Après un suivi médian de 51.8 mois : - Survie globale significativement plus importante groupe SA + abi, SG médiane 53.3 mois que dans le groupe placebo (36.5 mois) avec un HR de 0.66 (95% CI 0.56-0.78; P &lt; 0.0001).</p>
<p><b>ENZAMET</b> (Davis et al., 2019)</p>	<p>Phase 3. SA + enza 160 mg/jour vs SA seule.</p>	<p>N = 1125 patients randomisés, 563 pts groupe enza, 562 pts groupe standard. Après un suivi de 34 mois : - Résultats significativement positifs en survie globale (critère de jugement principal) en faveur groupe enza. - 102 décès dans le groupe enza et 143 décès dans le groupe standard (HR pour le risque de décès, 0,67 ; intervalle de confiance [IC] de 95%, 0,52 - 0,86 ; P=0,002). - Plus d'effets secondaires dans le bras enza.</p>
<p><b>ARCHES</b> (Armstrong et al., 2019)</p>	<p>Phase 3. SA + enza 160 mg/jour vs SA seule. En incluant aussi les maladies à faible volume tumoral. Et les patients pré-traités par docétaxel.</p>	<p>N = 1150 patients randomisés, 574 pts groupe SA+ enza, 576 patients groupe SA standard. Après un suivi de 14.4 mois : - Résultats significativement positifs en survie sans progression radiologique (critère de jugement principal) en faveur groupe enza - Hazard ratio, 0.39; 95% CI, 0.30 - 0.50; P &lt; 0.001; médiane non atteinte v 19.0 mois). Tolérance identique dans les 2 bras.</p>

**Tableau 8 : Résultats des essais cliniques princeps chez les patients atteints de cancer de la prostate métastatique sensibles à la castration.**

\*Maladie à haut volume tumoral selon les critères CHARTEED (au moins 4 lésions métastatiques osseuses dont au moins une extra-axiale ou au moins une métastase viscérale).

\*\*Dans l'essai LATITUDE les patients étaient éligibles s'ils avaient au moins 2 des 3 critères de mauvais pronostic suivants : score de Gleason de  $\geq 8$ , présence de trois lésions ou plus sur la scintigraphie osseuse, ou présence de métastases viscérales mesurables à l'exception des métastases ganglionnaires)

Abi : abiratérone, enza : enzalutamide, SA : suppression androgénique, SG : survie globale

Sur la base de ces données, l'ESMO a mis à jour ses recommandations concernant le cancer de la prostate naïf de castration : la SA plus le docétaxel ou SA plus abiratérone plus la prednisone sont proposés avec le niveau de preuve 1A pour le traitement des patients atteints d'une maladie métastatique hormono-naïve (Parker et al., 2015). Le NCCN adjoint aussi dans ses recommandations la possibilité de prescrire de l'enzalutamide en plus de la SA (NCCN v2021).

En raison de l'absence de comparaison directe entre ces deux modalités de traitement et de l'hétérogénéité des populations participant aux essais cliniques, un débat est en cours sur la sélection optimale des patients qui tireront le plus grand bénéfice de ces thérapies (Kyriakopoulos et al., 2018; Gravis et al., 2018). Cela se reflète dans les avis des experts de la conférence de consensus de St Gallen en 2017 (APCCC 2017), qui ont voté à l'unanimité en faveur du docétaxel plus suppression androgénique chez les patients atteints de mCPSC nouvellement diagnostiqués et présentant une maladie à haut volume tumoral (Gillesen et al., 2018). Toutefois, le panel d'experts s'est montré plus sceptique quant à la mise en œuvre de ce traitement chez les patients en rechute après un traitement local et surtout chez les patients atteints d'une maladie à faible volume tumoral (Gillesen et al., 2018). De même, les directives récemment publiées par l'ASCO reconnaissent que le docétaxel ou l'abiratérone plus suppression androgénique devraient constituer la nouvelle norme de soins uniquement pour les patients atteints de maladies à volume tumoral élevé (Morris et al., 2018), les directives de l'ASCO soulignent qu'aucune nouvelle recommandation en faveur du traitement SA-docétaxel ne peut être faite pour les patients atteints de maladies à faible volume tumoral.

Au contraire, il est suggéré que la SA plus abiratérone pourrait être envisagée chez les patients à faible volume, car il n'existe aucune donnée réfutant le fait que ces hommes puissent en bénéficier (Gillesen et al., 2018). Plus encore, les données récemment publiées de l'essai STAMPEDE fournissent des preuves supplémentaires que l'abiraterone confère un bénéfice

pour la survie globale qu'elle soit administrée à des patients à faible volume ou à faible risque (Hoyle et al., 2019).

Sur le même sujet, d'autres référentiels suggèrent que l'état général (performance status) et la charge tumorale doivent être considérés comme des facteurs pris en compte par les médecins avant de commencer une combinaison docétaxel plus suppression androgénique pour le cancer de la prostate métastatique sensible à la castration.

En ce qui concerne la préférence d'un traitement par rapport à l'autre, aucune recommandation spécifique ne peut être faite en l'absence de comparaison directe. Une comparaison indirecte présentée récemment suggère que l'analyse de la survie sans progression favorise la suppression androgénique plus l'abiratérone, tandis que les données de survie globale favorisent plutôt suppression androgénique plus docétaxel (Sydes et al., 2018). Toutefois, conformément aux conclusions de cette étude, les guidelines de l'ASCO suggèrent que des facteurs tels que la disponibilité des médicaments, l'éligibilité du patient et la durée du traitement devraient être pris en compte lors du choix du traitement optimal pour les patients atteints de mCPSC présentant un haut volume tumoral (Morris et al., 2018).

#### *b) Maladie résistante à la castration*

La première molécule de chimiothérapie vraiment performante chez les patients atteints de CPRC fut le docétaxel, mis en exergue en 2004 dans l'étude princeps de Tannock (Tannock et al., 2004). A cette époque, les seules alternatives lors de la progression sous docétaxel étaient la réintroduction de docétaxel en cas de stabilité tumorale pendant un délai suffisamment long (Eymard et al., 2010), la mitoxantrone en deuxième ligne (Tannock et al., 1996) avec une efficacité modeste ou encore les meilleurs soins de support seuls. Depuis 2010, la gestion du cancer de la prostate métastatique a fait de nombreux progrès avec l'émergence de nouvelles molécules développées en un laps de temps très court, et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

- Cancer non métastatique résistant à la castration (CPRC M0)

Une proportion non négligeable de patients atteints de CPRC, estimée à environ 5 %, progresse au décours d'un traitement de suppression androgénique administré en cas de récurrence biochimique (par élévation du taux de PSA) après des traitements locaux radicaux prostatiques, sans maladie métastatique évidente à l'imagerie classique de type scanner et à la scintigraphie osseuse. Jusqu'à récemment, il n'existait pas de traitement validé pour ce sous-groupe de patients. Trois études PROSPER, SPARTAN et ARAMIS ont montré le bénéfice d'associer un

traitement par inhibiteur des récepteurs aux androgènes au blocage androgénique simple en matière de survie sans métastase pour les patients en situation de résistance à la castration non métastatique à haut risque défini par un temps de doublement du PSA inférieur ou égal à 10 mois (Hussain et al., 2018; M. R. Smith et al., 2018; Fizazi et al., 2019) (Tableau 9).

Néanmoins, des données supplémentaires concernant l'effet de ces traitements sur la survie globale (données actuellement non matures) ainsi que l'efficacité des traitements ultérieurs sont nécessaires afin de déterminer une stratégie de traitement dans ce groupe de patients.

Type d'étude	Schéma	Principaux résultats
<b>PROSPER</b> (Hussain et al., 2018)	Phase 3 (randomisation 2 : 1) Enza 160mg/j plus SA versus placebo + SA	N = 1401 patients randomisés (933 groupe Enza, 468 groupe Placebo) Survie médiane sans métastases : 36.6 mois groupe Enza versus 14.7 mois groupe placebo (HR pour métastase ou décès, 0.29; 95% CI, 0.24 - 0.35; P<0.001).
<b>SPARTAN</b> (M. R. Smith et al., 2018)	Phase 3 (randomisation 2 : 1). Apa 240 mg/j plus SA versus placebo + SA.	N = 1207 patients randomisés (806 groupe Apa, 401 groupe Placebo) Survie médiane sans métastases : 40.5 mois groupe Apa versus 16.2 mois groupe placebo (HR pour métastase ou décès, 0.28; 95% CI, 0.23 - 0.35; P<0.001)
<b>ARAMIS</b> (Fizazi, Shore, et al., 2019)	Phase 3 (randomisation 2 : 1). Darolutamide 300mgX2/j plus SA versus placebo + SA.	N = 1509 patients randomisés (955 dans le groupe Daro, 554 placebo) Survie médiane sans métastases : 40.4 mois avec Daro, vs 18.4 mois avec placebo (HR pour métastase ou décès dans le groupe Daro, 0.41; 95% CI, 0.34 - 0.50; P<0.001).

**Tableau 9 : Résultats des essais cliniques princeps chez les patients atteints de cancer de la prostate non métastatique résistant à la castration.**

Apa : apalutamide ; Daro : Darolutamide ; Enza : Enzalutamide, HR : hazard ratio, SA : suppression androgénique



- Cancer de la prostate métastatique résistant à la castration
  - Choix de traitements

Le docétaxel plus prednisone, l'abiratérone plus la prednisone et l'enzalutamide sont des options de traitement possibles en première ligne pour les patients atteints de mCPRC, sur la base des résultats d'essais cliniques randomisés précédents (Tannock et al., 2004; Ryan et al., 2015; Beer et al., 2014). Il convient toutefois de noter que ces essais cliniques ont été réalisés avant l'introduction du docétaxel en association avec la suppression androgénique comme traitement standard pour les patients métastatiques hormono-naïfs de haut volume tumoral.

En outre, le radium 223 est dans de nombreux pays une option de traitement pour les patients symptomatiques présentant uniquement des métastases osseuses sans maladie viscérale suite aux résultats de l'essai ALSYMPCA (Parker et al., 2013) mais ce médicament n'est pas disponible en France. Par conséquent, il existe de manière permanente plusieurs options discutables concernant le traitement de première ligne du mCPRC. Jusqu'à présent, il n'existait pas d'essais cliniques randomisés de grande ampleur comparant l'efficacité de ces agents en première ligne. On note de rares preuves qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative dans l'efficacité du traitement par l'abiratérone et l'enzalutamide (Chi et al., 2017). Selon l'analyse finale de l'étude COU-AA-302, l'abiratérone a apporté un bénéfice de survie globale de 4,4 mois (Parker et al., 2013) tandis que le bénéfice correspondant pour l'enzalutamide était de 4,0 mois dans l'analyse étendue de l'essai PREVAIL (Beer et al., 2017).

Les recommandations sont basées sur les caractéristiques des patients participant aux essais cliniques. Par conséquent, aucune préférence entre l'abiratérone et l'enzalutamide n'est indiquée dans les guidelines (Dellis et al., 2019), mais ces deux agents sont également recommandés pour les patients asymptomatiques ou légèrement symptomatiques atteints de mCPRC. Il existe cependant des scénarios cliniques dans lesquels un agent pourrait être préféré à l'autre et cette question a été soulevée lors de la conférence de consensus de St Gallen APCCC 2017. Les experts ont favorisé l'abiratérone chez les patients ayant des antécédents de chutes, de fatigue importante à la baseline, de troubles neurocognitifs ou de métastases cérébrales. Au contraire, ils étaient favorables à l'enzalutamide pour les patients atteints de diabète mellitus, présentant un dysfonctionnement hépatique et une fraction d'éjection cardiaque inférieure à 45-50% (James et al., 2017).

Le docétaxel est également recommandé pour le traitement des patients symptomatiques dont l'état général est bon (OMS 0-1). Certains référentiels internationaux diffèrent cependant légèrement. Ces différences reflètent clairement l'absence de comparaison directe entre les options de traitement disponibles et le manque de certitude concernant les sous-populations de patients qui tirent le plus grand bénéfice de chaque traitement.

Les référentiels n'ont pas encore pu intégrer de nouvelles recommandations concernant les patients pré-traités par docetaxel ou à l'abiraterone et à la prednisone pour leur maladie métastatique sensible à la castration. Il convient toutefois de souligner que les patients qui ont reçu de l'abiraterone dans le cadre d'une maladie hormono-naïve ont moins bien répondu par la suite à une hormonothérapie de nouvelle génération dans le cadre d'un CPRC par rapport au docétaxel (James et al., 2017). En conséquence, la majorité des experts participant à l'APCCC2017 ont voté en faveur d'un traitement à l'abiraterone ou à l'enzalutamide chez les patients précédemment traités au docetaxel dans le cadre d'un mCPSC. Cependant, chez les patients symptomatiques dont l'état a progressé dans les six mois suivant le traitement au docétaxel, 43 % des experts ont voté pour des traitements alternatifs, principalement le cabazitaxel (APCC 2017). Des recherches cliniques supplémentaires sont donc nécessaires pour définir la meilleure séquence thérapeutique entre le CPSC et le CPRC.

- Choix de traitements en première ligne de résistance à la castration (Tableau 10)

Type d'étude	Schéma	Principaux résultats
<b>TAX327</b> (Tannock et al., 2004)	Phase III 5 mg de prednisone 2 fois par jour + mitoxantrone 12 mg/m <sup>2</sup> /3 sem (bras contrôle) ou docétaxel 75 mg/m <sup>2</sup> /3 sem ou docétaxel 30 mg/m <sup>2</sup> 5 semaines/6	N = 1006 pts Co-critères de jugement principal : survie sans progression radiologique + SG Résultats positifs en survie globale (critère de jugement principal) pour le groupe docétaxel 75mg/m <sup>2</sup> /3sem HR pour le décès : 0.76 (95%CI, 0.62 - 0.94; P=0.009) Résultats non significatifs pour le bras docétaxel hebdo 30mg/m <sup>2</sup> 5sem/6.
<b>COU-AA-302</b> (Ryan et al., 2013)	Phase III Abi 1000mg + prednisone 5mgX2/j ou placebo + prednisone 5mgX2/j	N = 1088 pts Co-critères de jugement principal : survie sans progression radiologique + SG Survie sans progression radiologique médiane : 16.5 mois vs 8.3 mois en faveur bras Abi (HR pour Abi-prednisone vs. prednisone seule, 0.53; 95% CI, 0.45 - 0.62; P<0.001). Après un suivi médian de 22.2 mois, SG augmentée dans le bras Abi+prednisone (médiane non atteinte).
<b>PREVAIL</b> (Scher et al., 2012)	Phase III Enza 160mg + ou placebo	N = 1717 pts Co-critères de jugement principal : survie sans progression radiologique + SG Taux de survie sans progression radiologique à 12 mois : 65% vs 14% en faveur bras Enza (HR pour Enza vs. placebo, 0.19; 95% CI, 0.15 - 0.23; P<0.001). 72% patients vivants vs 63% à la date de point (HR pour Enza vs. placebo, 0.71; 95% CI, 0.60 - 0.84; P<0.001).

**Tableau 10 : Résultats des essais cliniques princeps de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration en première ligne.**

Abi : abiraterone ; Enza : enzalutamide ; sem : semaine ; SG : survie globale ; pts : patients

o Choix de traitements à partir de la seconde ligne (Tableau 11)

Type d'étude	Schéma	Principaux résultats
<b>FIRSTANA</b> (Oudard et al., 2017)	Phase 3 Cabazitaxel 25mg/m2 (C25) vs Cabazitaxel 20 mg/m2 (C20) vs Docétaxel 75mg/m2 (D75)	N = 1168 SG médiane 24.5 mois avec C20, 25.2 mois avec C25, et 24.3 mois avec D75. Hazard ratio pour C20 vs D75: 1.01 (95% CI, 0.85 - 1.20; P = 0.997), hazard ratio pour C25 versus D75 0.97 (95% CI, 0.82 - 1.16; P = 0.757). Différents profils de toxicités entre cabazitaxel et docétaxel.
<b>COU-AA-301</b> (de Bono et al., 2011)	Phase 3, docétaxel pré-traités Rando 2 : 1 Abi 1000mg/j + prednisone 5mgX2/j versus placebo + prednisone 5mgX2/j	N = 1095 patients, 797 bras Abi vs 398 bras placebo Après 12.8 mois de suivi médian, SG (critère de jugement principal) 14.8 mois vs 10.9 mois en faveur bras Abi (HR : 0.65, CI95% 0.54-0.77, P<0.001).
<b>AFFIRM</b> (Scher et al., 2012)	Phase 3 Rando 2 : 1 Enza 160mg/j versus placebo	N = 1199 patients, 800 groupe Enza, 399 groupe placebo La SG médiane 18.4 mois vs 13.6 mois, en faveur bras Enza (HR pour le décès dans le groupe enzalutamide, 0.63; 95% CI, 0.53 - 0.75; P<0.001).
<b>TROPIC</b> (de Bono et al., 2010)	Phase III Cabazitaxel 25mg/m2/3sem + prednisone 10mg/j versus Mitoxantrone 12mg/m2 + prednisone 10mg/j	N = 755, 378 cabazitaxel, 377 mitoxantrone SG médiane 15.1 mois groupe cabazitaxel vs 12.7 mois groupe mitoxantrone. HR pour le décès 0.70 (95% CI 0.59-0.83, P<0.0001) en faveur cabazitaxel.
<b>ALSYMPCA</b> (Parker et al., 2013)	Phase III Rando 2 : 1 Radium 223 vs soins de support Cancers de la prostate avec métastases osseuses exclusives	N = 921 Bénéfice en survie globale (critère de jugement principal) SG médiane 14.9 mois vs 11.3 mois, HR : 0.70 ; 95%CI 0.58-0.83, P<0.001).
<b>PROFOUND</b> (de Bono et al., 2020)	Phase III Rando 2 : 1 Olaparib (cohorte A) vs hormonothérapie de nouvelle génération au choix du clinicien (Abi ou Enza, cohorte B)	N = 245 (cohorte A olaparib) vs 142 (cohorte B) Bénéfice significatif sur le temps jusqu'à progression radiologique (critère de jugement principal) qui passe à 7.4 mois vs. 3.6 mois (HR pour la progression ou le décès de 0.34; 95% IC95% 0.25-0.47; P<0.001).

**Tableaux 11 : Résultats des essais cliniques princeps chez les patients atteints de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration, au-delà la première ligne.**

Abi : abiraterone, Enza : enzalutamide, HR : hazard ratio SG : survie globale

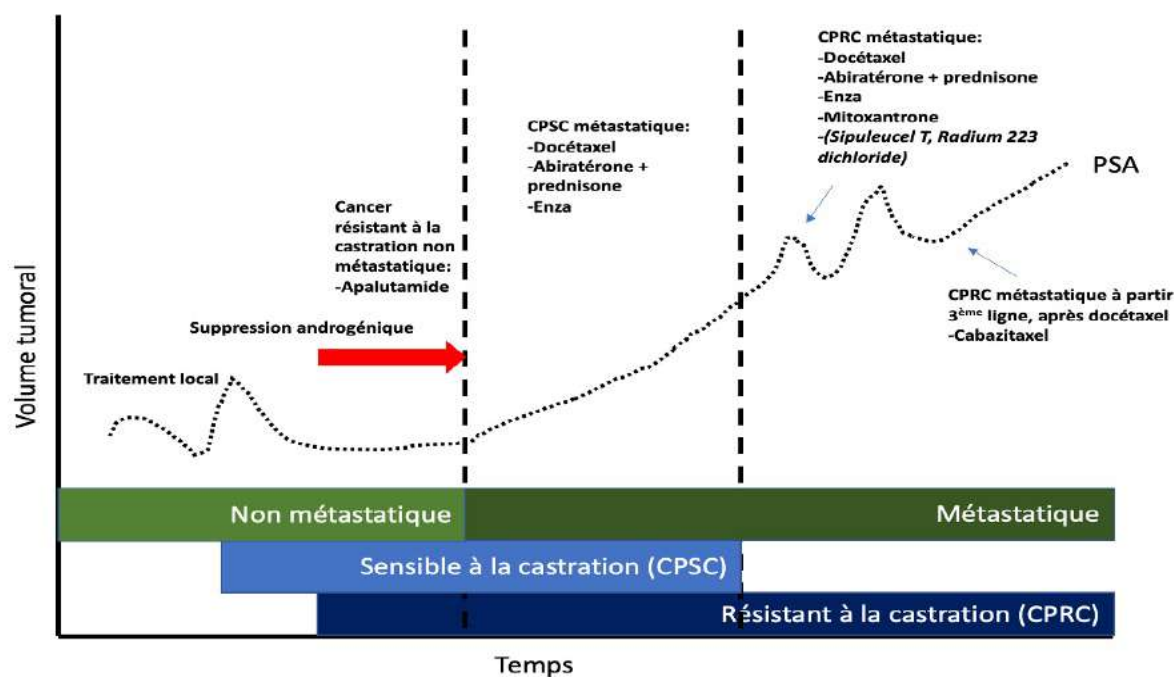
- Inhibiteurs de la résorption osseuse

Les Inhibiteurs de la résorption osseuse (IRO) dénosumab et acide zolédronique ont tous deux été approuvés pour la prévention des « skeletal related events » (SRE) chez les patients atteints de mCPRC. L'acide zolédronique s'est révélé supérieur au placebo dans la prévention des SRE (Saad et al., 2004), tandis que le dénosumab était supérieur à l'acide zolédronique pour le même résultat (Fizazi et al., 2011). Aucun de ces médicaments n'a cependant prouvé son efficacité en termes de survie.

Les recommandations européennes (ESMO) sont en faveur de l'utilisation de l'un ou l'autre de ces agents pour les patients atteints de mCPRC avec métastases osseuses (Parker et al., 2015). Cependant, la durée totale d'utilisation des IRO fait encore l'objet de débats. L'acide zolédronique a été utilisé pendant une durée de deux ans dans son essai d'enregistrement, tandis que le dénosumab a été utilisé de façon continue. La durée du traitement n'est pas abordée dans les recommandations, alors que le groupe d'experts de St Gallen a été divisé en 2015 entre l'utilisation continue et la durée totale jusqu'à 2 ans (Gillesen et al., 2015). Cette question a été de nouveau laissée en suspens dans la mise à jour de la conférence de consensus de 2017 (Gillesen et al., 2018).

Il convient de noter que l'effet bénéfique des IRO n'a pas été démontré jusqu'à présent chez les patients atteints de cancer de la prostate sensible à la castration. Plus particulièrement, les essais STAMPEDE ont montré que l'ajout d'acide zolédronique à un analogue de la LHRH n'entraînait aucune différence en termes de délai avant l'échec du traitement et de survie globale (James et al., 2016). De plus, le délai avant le premier événement osseux n'a pas été amélioré par l'ajout d'acide zolédronique dans STAMPEDE (James et al., 2016). Comme le taux de SRE est faible chez les patients atteints de mCPSC, une population beaucoup plus importante devrait sûrement être recrutée pour prouver le bénéfice des bisphosphonates.

La Figure 10 ci-dessous résume les principales options thérapeutiques dans le cancer de la prostate en fonction du stade de la maladie.



**Figure 10 : Synthèse des thérapies systémiques utilisées dans le cancer de la prostate et de leurs AMM en France.**

- **Problématique de la meilleure séquence thérapeutique dans le cancer de la prostate métastatique**

En France, une étude s'est intéressée à la question d'un audit en pratiques de vie réelle chez les oncologues français, et a fait l'objet d'une publication en anglais dans Bulletin du cancer en 2017 (Turpin et al., 2017) (ANNEXE 1). A l'heure où de plus nombreux médicaments sont disponibles et efficaces, y compris dès le stade de sensibilité à la castration, la meilleure séquence thérapeutique reste encore à définir.

## V. CAS PARTICULIER DU CANCER DE LA PROSTATE NEUROENDOCRINE : RESISTANCE AUX TRAITEMENTS ET TRANSDIFFERENCIATION

La place de plus en plus précoce, en pratique clinique des hormonothérapies de nouvelle génération, inhibiteurs de la fonction de AR, tels que l'abiratérone et l'enzalutamide, y compris chez certains patients naïfs de castration avec haut volume tumoral, a augmenté l'incidence d'une des formes agressives de CPRC, au phénotype neuroendocrine (NE). Encore mal connus et sans traitement efficace, les cancers de la prostate neuroendocrines (NEPC) sont hétérogènes et seraient issus d'une transdifférentiation épithélio-neuroendocrine de cellules tumorales résistantes à la castration (Campedel et al., 2017).

### A. Présentation clinique du NEPC

Le NEPC est une entité qui répond à différents critères, souvent non morphologiques, parmi lesquels :

- Progression tumorale rapide avec développement de métastases viscérales exclusives ou de lésions osseuses lytiques ;
- Résistance à la castration hormonale après un intervalle court, souvent < 6 mois ;
- Volume tumoral important (> 5 cm) ;
- Présence de marqueurs neuroendocrines circulants ;
- Taux de PSA faible

Les NEPC représentent environ 0,1 à 10 % des cancers de la prostate, avec des variants « purs » ou mixtes associés à un contingent adénocarcinomateux (Robinson et al., 2015; di Sant'Agnese et al., 1992; Helpap et al., 1999; Marcus et al., 2012). La forme mixte est prédominante et représente 50–65 % des cas (Parimi et al., 2014). La présence d'un contingent neuroendocrine confère un mauvais pronostic (di Sant'Agnese et al., 1992).

Les NEPC *de novo* sont extrêmement rares (incidence < 1 %), surviennent généralement tard dans l'histoire naturelle de la maladie, après résistance à la castration, sans doute liée à la « pression de sélection » clonale suite aux différents traitements anticancéreux parmi lesquels les hormonothérapies.

Cependant, ces définitions cliniques des NEPC ne peuvent pas remplacer une analyse anatomopathologique et moléculaire précise.

## B. Caractéristiques biologiques et histologiques de la différenciation neuroendocrine

Dans l'épithélium glandulaire prostatique normal, on distingue moins de 1% de cellules neuroendocrines (Parimi et al. 2014). Les cellules NE sont impliquées de manière physiologique dans le développement de la glande prostatique et le contrôle de la sécrétion via des mécanismes autocrines et paracrines (di Sant'Agnese et al., 1992). Une classification morphologique, immunohistochimique et biologique des NEPC a été proposée en raison de leur hétérogénéité (Epstein et al., 2014) puis intégrée dans la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Moch et al., 2016).

On distingue l'adénocarcinome avec différenciation neuroendocrine (avec pseudocellules type Paneth), la tumeur carcinoïde, le carcinome neuro-endocrine à petites cellules, le carcinome neuroendocrine à grandes cellules et le carcinome de type mixte associant adénocarcinome/carcinome neuro-endocrine (à grandes ou à petites cellules).

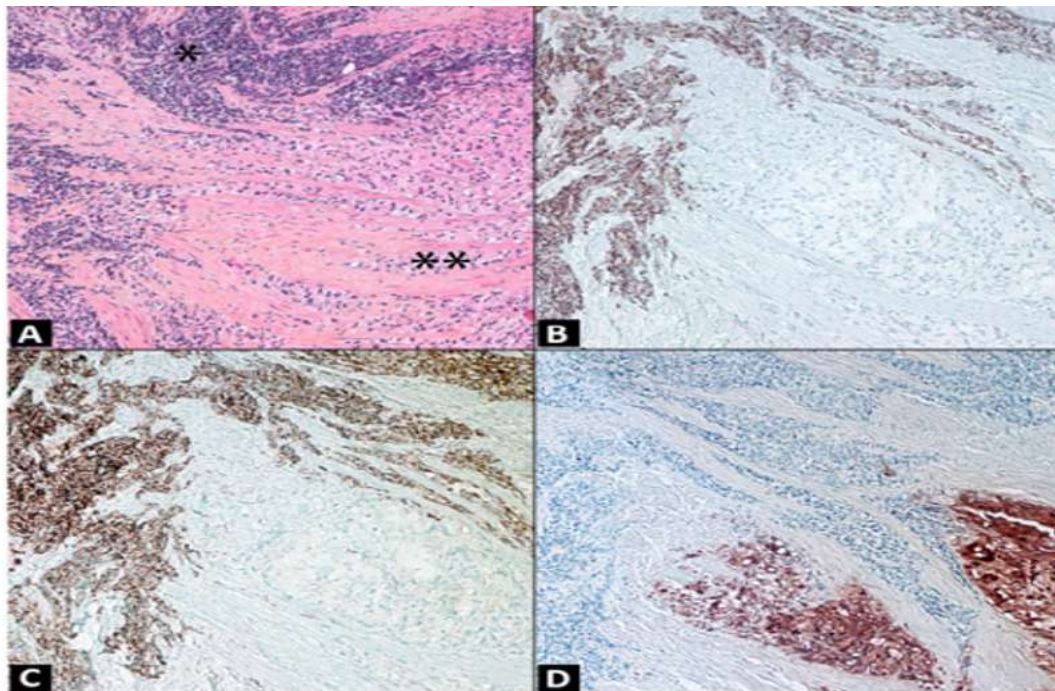
Le carcinome neuroendocrine à petites cellules est le principal variant neuroendocrine « pur » ayant les mêmes caractéristiques phénotypiques que les carcinomes neuroendocrines développés dans d'autres organes notamment au niveau de la sphère digestive ou du poumon. Sur le plan anatomopathologique, il existe une prolifération de petites cellules au cytoplasme peu abondant, aux bordures mal limitées, aux noyaux se moulant les uns aux autres (« molding »), avec chromatine fine d'aspect « poivre et sel », l'absence de nucléole proéminent, un index mitotique élevé, la présence de phénomènes d'apoptose, et des plages de nécrose tumorale extensive (Parimi et al., 2014).

Parmi les formes « pures », on distingue également le carcinome neuroendocrine à grandes cellules, très rare entité dont les caractéristiques histologiques sont celles du carcinome neuroendocrine à grandes cellules du poumon (Evans et al., 2006; Wynn et al., 2000).

Le diagnostic de cancer de la prostate neuroendocrine n'est pas toujours aisé. Il s'agit d'un diagnostic de prime abord morphologique mais l'immunohistochimie et la biologie peuvent être utiles dans un second temps. Généralement en immunohistochimie, la



chromogranine A (CgA), la synaptophysine (SYP), l'INSM Transcriptional Repressor 1 (INSM1) et la Neuron Specific Enolase (NSE) sont positives tandis que le récepteur aux androgènes est négatif (Yao et al., 2006; Xin et al., 2018). Les taux sanguins de CgA, NSE sont par ailleurs souvent élevés, même si leur négativité n'exclut pas le diagnostic (Beltran H et al., 2012). En raison de la présence d'un contingent adénocarcinomateux, le variant mixte adénocarcinome/NEPC peut exprimer le PSA et le récepteur aux androgènes en immunohistochimie dans 25% des cas environ (Lotan et al., 2011) (Figure 11).



**Figure 11 : Carcinome neuroendocrine de la prostate de type mixte associant un contingent adénocarcinomateux (\*) avec un contingent neuro-endocrine (\*\*).** Coloration hématoxyline HES (A). L'immunomarquage à l'aide des anticorps anti- chromogranine A (B), anti-synaptophysine (C) et anti-PSA (D) montre une positivité du contingent neuro-endocrine et une négativité du PSA, à l'inverse du contingent adénocarcinomateux (d'après Campedel et al., 2017)

Dans les formes métastatiques, l'origine prostatique d'une tumeur peut être affirmée par la détection d'une fusion *TMPRSS2:ERG* par FISH, spécifique de la prostate (Tomlins et al., 2005), retrouvée dans plus de 50 % des cancers de prostate (Lotan et al., 2011; Mosquera et al., 2009; Scheble et al., 2010; Beltran et al., 2011). Cette translocation est retrouvée de manière équivalente dans les NEPC (Beltran et al., 2011). Autre marqueur pouvant se révéler utile, la protéine HOXB13 a montré une sensibilité de 100 % et une spécificité de 89 % pour distinguer une origine prostatique, notamment pour différencier le NEPC d'une origine urothéliale, tant au stade localisé que métastatique (Varinot et al., 2013; Varinot et al., 2016). De nouveaux marqueurs tels que le facteur de transcription N-MYC et la kinase impliquée dans le cycle

cellulaire Aurora-kinase-A (AURKA) apparaissent prometteurs car fréquemment amplifiés dans les NEPC et facilement détectables par hybridation *in situ* en FISH, mais non encore validés dans la pratique clinique courante (Mosquera et al., 2013).

### C. Physiopathogénie de la différenciation neuroendocrine :

La question de l'origine des cellules au phénotype NE au sein de l'adénocarcinome prostatique se pose.

Une première hypothèse suggère que les cellules NE dérivent des cellules-souches de la couche basale des glandes prostatiques. Sous l'effet d'une « déplétion androgénique », ces cellules deviendraient malignes via des mécanismes de signalisation paracrine (Helpap et al., 1999; Ishida et al., 2009; Bonkhoff et al., 1995).

Une autre hypothèse, plus largement explorée, est celle de la transdifférenciation neuroendocrine ou transition épithélio-neuroendocrine post-traitement, aussi appelée « plasticité des lignées » (Yuan et al., 2007).

Sous l'influence de facteurs encore mal connus dont la déprivation hormonale, les cellules adénocarcinomateuses vont acquérir l'expression de marqueurs neuroendocrines. Il existe alors une diminution, en cas de transdifférenciation incomplète, ou une perte, en cas de transdifférenciation complète, de l'expression des marqueurs de la voie du récepteur aux androgènes (Yuan et al., 2007).

Des observations portant sur les adénocarcinomes pulmonaires EGFR mutés qui, après traitement par un inhibiteur de tyrosine kinase anti-EGFR, peuvent récidiver sous forme de carcinome neuroendocrine à petites cellules, illustrent cette théorie (Sequist et al., 2011). Dans des conditions de suppression androgénique, des cellules LNCaP acquièrent un phénotype neuroendocrine (Yuan et al., 2007). Ce phénomène est aussi décrit *in vivo* dans des modèles tridimensionnels et de xénogreffes (D. Lin et al., 2014; Mu et al., 2017). Les adénocarcinomes et les NEPC partageraient donc la même origine clonale (Lotan et al., 2011; Beltran et al., 2016; Williamson et al., 2011; Guo et al., 2011). Ainsi, dans les formes mixtes adénocarcinome/NEPC, il existe une concordance concernant le statut ERG entre le contingent neuroendocrine et le contingent adénocarcinomateux (Lotan et al., 2011; Williamson et al., 2011). On notera que la présence de la fusion *TMPRSS2:ERG* ne semble pas être un marqueur d'agressivité indépendant (Fine et al., 2010). L'amplification d'*AURKA* et de *MYCN*, est

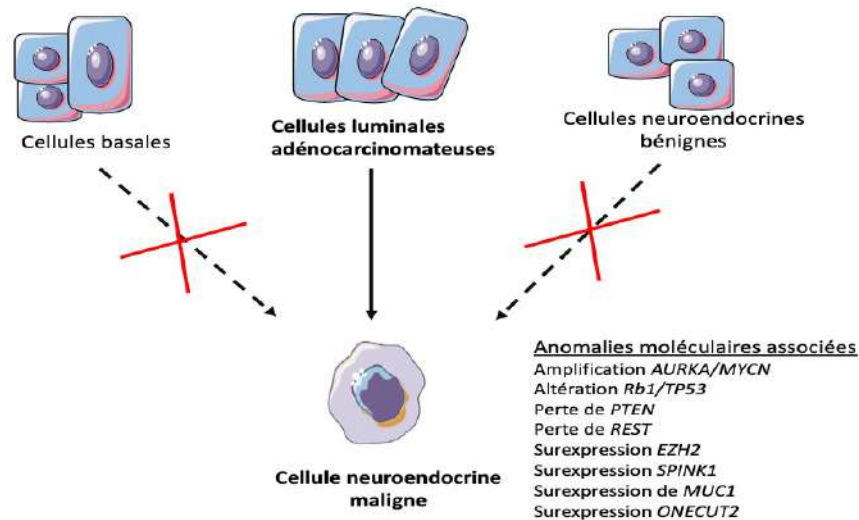
fréquente dans les NEPC par comparaison aux cancers prostatiques sensibles à la castration (Beltran et al., 2016; Mosquera et al., 2013). Dans 65 % des cas de cancers de la prostate primitifs qui ont par la suite développé un NEPC, l'amplification de ces deux gènes est identifiée, semblant indiquer que ces altérations sont des événements précoces « drivers » et persistant durant l'évolution de la maladie. Ces anomalies génomiques sont donc probablement des témoins d'une origine clonale commune.

Des travaux récents de Beltran ont porté sur 114 cas de CPRC métastatiques issus de 81 patients, dont 51 avec des caractéristiques histologiques et cliniques d'adénocarcinome (CPRC-adéno) et 30 avec des caractéristiques neuro-endocrines (CPRC-NEPC) (Beltran et al., 2016). À l'aide de techniques de séquençage de l'exome entier, 70 gènes différentiellement exprimés entre les CPRC-adéno et les CPRC-NEPC sont identifiés, définissant un score. Son application aux données transcriptomiques de 683 cas de cancer de la prostate de stades variés, issus de grandes cohortes telles que celle du consortium The Cancer Genome Atlas (TCGA), a montré un score élevé dans 8 % des formes métastatiques et absent dans les formes hormono-naïves et les prostates bénignes. Ce score a pour but d'identifier précocement des CPRC pouvant progresser en NEPC afin de les traiter. Il est associé à un phénotype neuroendocrine et inversement corrélé à l'expression de AR et des gènes dépendants de AR. Parmi les cancers ayant un score élevé, le phénotype NE est retrouvé dans plus de 80 % des cas. Cependant, il existe des chevauchements entre les profils d'expression des différents échantillons tumoraux, soutenant l'hypothèse d'un continuum entre les CPRC récepteur aux androgènes dépendants et les cancers de la prostate résistants à la castration récepteur aux androgènes indépendants, acquérant un phénotype NE en réponse aux traitements. Selon Mu et al. cette plasticité tissulaire « de lignée » pourrait être un état de transition multi-lignées représentant un mécanisme flexible de résistance. Ainsi, les cellules tumorales prostatiques peuvent acquérir le phénotype le plus adapté pour leur survie en fonction du traitement, en l'occurrence le phénotype neuroendocrine (Mu et al., 2017).

#### D. Caractéristiques moléculaires :

Les altérations les plus fréquentes, « drivers » du phénotype NE, sont représentées par l'amplification des gènes *AURKA* et *MYCN*, la délétion des gènes *RBI* et *PTEN*, l'activation de la voie PI3K, la régulation positive du gène *EZH2*, la perte ou la mutation de *TP53* et une diminution de l'expression de *RE1-Silencing Transcription factor (REST)*. Récemment, *SPINK*

*1* et *ONECUT 2* ont été impliqués, notamment lorsque l'expression de AR est inhibée (Figure 12).



**Figure 12 : Mécanisme de transdifférenciation épithélio-neuroendocrine basé sur la plasticité des lignées et principaux gènes impliqués.**

Les altérations du gène *TP53* sont plus fréquentes dans les cancers de la prostate métastatiques et résistants à la castration, ainsi que la délétion du gène *RBI* également retrouvée dans les NEPC (Beltran et al., 2016; Robinson et al., 2015; H.-L. Tan et al., 2014). Mu et al. ont montré que la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs *TP53* et *RBI*, étroitement liée à la surexpression du facteur de transcription *SOX2*, favorise le phénomène de plasticité de lignée promouvant une transition de cellules épithéliales dépendant de AR vers des cellules de type basal indépendantes de AR, à l'origine de la résistance aux thérapies anti-androgéniques (Mu et al., 2017).

D'autres résultats montrent la pertinence mécanistique de la perte de *RBI* et *TP53* dans les cancers de la prostate neuroendocrines et suggèrent le gène placentaire *PEG10* comme une autre cible spécifique des NEPC. En effet AR et la voie E2F/RB régulent de manière dynamique des isoformes distinctes post-transcriptionnelles et post-traductionnelles du gène placentaire *PEG10*, à différents stades du développement neuroendocrine. *In vitro*, *PEG10* promeut le passage de la phase G0 à la phase G1 du cycle cellulaire, dans un contexte de perte de *TP53* et d'expression régulée de *SNAIL* via la voie TGF- $\beta$  afin de promouvoir l'invasion cellulaire (Akamatsu et al., 2015).

En utilisant un modèle murin de cancer de la prostate résistant aux inhibiteurs du récepteur aux androgènes enzalutamide, le facteur de transcription neurale *BRN2* (codé par *POU3F2*) dépendant de la voie AR a également été identifié comme un élément majeur de la différenciation tumorale neuroendocrine et de la croissance tumorale agressive, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Bishop et al., 2017). Dans la même publication, des études mécanistiques ont montré que *AR* régule directement à la baisse la transcription de *BRN2*, nécessaire pour la différenciation neuroendocrine, et la régulation *BRN2*-dépendante du marqueur neuroendocrine *SOX2* (Bishop et al., 2017). *BRN2* est également surexprimé dans d'autres cancers neuroendocrines comme les cancers du poumon à petites cellules, en faveur d'un rôle conservé de *BRN2* pour la différenciation neuroendocrine indépendamment du type de tumeur (Davies et al., 2018).

*Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)*, gène codant pour une sous-unité catalytique des protéines polycomb, représente un régulateur épigénétique surexprimé dans les cancers de la prostate métastatiques et dans les carcinomes neuroendocrines de la prostate (Beltran et al., 2011; Varambally et al., 2002; Clermont et al., 2015). *EZH2* interagit avec le récepteur aux androgènes dans les NEPC dans des modèles de PDX dérivés de NEPC (Kleb et al., 2016). Le traitement de ces modèles par un inhibiteur d'*EZH2* augmenterait l'expression de *AR* dans les tumeurs ne l'exprimant pas à l'état basal. Cette levée d'inhibition de l'expression de *AR* corrobore les données montrant une sensibilité aux anti-androgènes accrue après traitement par cet inhibiteur (Tan et al., 2014; Varambally et al., 2002; Clermont et al., 2015; Kleb et al., 2016; Carver, 2016; Lee et al., 2016).

Zhang et al ont identifié que la voie *CREB/EZH2/TSP1* intervenait dans la différenciation neuroendocrine, soulignant le fait que la différenciation neuroendocrine et angiogénique sont moléculairement connectées à travers *EZH2* dans l'évolution du cancer de la prostate résistant à la castration (Zhang et al., 2018).

*AURKA* représente une autre cible dans les NEPC, car plus fréquente que dans les cancers sensibles à la castration (Beltran et al., 2011; Mosquera et al., 2013; Carver, 2016; Lee et al., 2016). Une étude de phase II a été menée sur une population de CPRC évaluant l'efficacité de l'inhibiteur d'*AURKA*, le danusertib, après échec du docétaxel. Cette étude n'a pas atteint la significativité pour son critère de jugement principal, la réponse au PSA (Meulenbeld et al., 2013). Une seconde étude de phase II sur la population particulière des NEPC histologiquement prouvées, pures ou mixtes, évaluant l'efficacité d'un autre inhibiteur *AURKA*, alisertib n'a pas

non plus montré de résultats probants, en n'atteignant pas non plus son objectif principal de survie sans progression radiologique à 6 mois. Cependant, des répondeurs exceptionnels ont été identifiés, avec des réponses complètes, sur des tumeurs ayant une suractivité de *N-MYC* et *AURKA* (Beltran et al., 2019).

De manière significative, dans le carcinome neuroendocrine de la prostate avec ou sans contingent adénocarcinomateux, Lapuk et al. (Lapuk et al., 2012) ont observé une réduction de l'expression du gène *REST*, facteur de transcription considéré comme le répresseur majeur de la différenciation neuronale (Ooi & Wood, 2007). Par ailleurs, la protéine REST agit comme un régulateur clé des gènes liés à l'hypoxie (Lin et al., 2016). L'expression de *SRRM4*, facteur d'épissage de l'ARN, est corrélée à l'inhibition du gène *REST*, suggérant le possible rôle de *SRRM4* dans la transdifférenciation neuroendocrine via la régulation de l'épissage de REST (Y. Li et al., 2017). Sur des modèles *in vitro*, l'inhibition de *RBI* et de *TP53* renforce l'activité de « driver » de transdifférenciation de *SRRM4*, alors qu'elle ne suffit pas isolément. *SRRM4* représenterait aussi une cible thérapeutique éventuelle.

Des études plus récentes ont identifié des mécanismes de résistance à la suppression androgénique via des gènes « drivers » dans la transdifférenciation NE.

C'est le cas de *SPINK1* dans l'étude de Tiwari et al. Dans cette étude, *SPINK1* est transcriptionnellement réprimé par *AR* et son co-represseur *REST*. Les inhibiteurs de *AR* diminuent cette répression aboutissant à une surexpression de *SPINK1*. De même, le facteur de transcription *SOX2* régule positivement *SPINK1* durant la transdifférenciation neuroendocrine. En particulier des niveaux élevés de *SPINK1* dans des modèles murins de xénogreffes réprimées en androgènes, soulignent son rôle possible dans la plasticité de lignées et le développement du phénotype neuroendocrine dans le cancer de la prostate (Tiwari et al., 2020).

Rotinen et al ont identifié *ONECUT-2* comme un gène impliqué dans la régulation des gènes liés au réseau d'*AR* dans le mCPRC. *ONECUT 2* supprime le programme de transcription de *AR* par régulation directe de ses gènes cibles et du co-facteur *FOXA1*, et active particulièrement les gènes associés à la différenciation neurale. Il s'agit donc d'une autre cible thérapeutique potentielle (Rotinen et al., 2018).

*MUC1* a également été identifié comme un gène se ré-exprimant lorsque *AR* est inhibé. Yasumizu et al ont démontré que la ré-expression de *MUC1-C* dans les cellules de cancer de la

prostate androgéno-dépendantes supprime la signalisation de AR et induit le facteur de transcription neural BRN2 (Yasumizu et al., 2020). Il s'agit donc d'un autre acteur important de la plasticité des lignées menant au phénotype NE.

#### E. Prise en charge thérapeutique des carcinomes neuroendocrines métastatiques

L'identification de l'ensemble des voies de signalisation impliquées dans le NEPC est prometteuse en termes de compréhension des mécanismes de développement et de résistance, apportant de potentielles alternatives thérapeutiques spécifiques pour ce groupe de tumeurs. Les dernières recommandations en onco-urologie du Comité de cancérologie de l'Association française d'urologie (CCAFU), conseillent, en l'attente de résultats plus probants sur les thérapies ciblées, en cas de tumeur indifférenciée (en particulier en différenciation neuro-endocrine), de métastases viscérales ou osseuses très symptomatiques, d'un échappement rapide après hormonothérapie initiale (inférieur à un an) une chimiothérapie chez les patients susceptibles de la recevoir (Rozet et al., 2020). Plusieurs études de phase II ont été réalisées afin de définir quel protocole de chimiothérapie serait le plus efficace pour ces tumeurs agressives, qui présentent souvent des analogies avec les autres localisations de carcinomes neuro-endocrines (Tableau 12).

Référence	Type d'étude	Nombre de patients	Chimiothérapie	SSP	SG
(Papandreou et al., 2002)	Phase 2	36	Doxorubicine-Etoposide-Cisplatine	5.8 (4.1-6.9)	10.5 (7.5-14.3)
(Aparicio et al., 2013)	Phase 2	114	Carboplatine-Docétaxel	5.1 (4.2-6.0)	16 (13.6-19.0)
(Fléchon et al., 2011)	Phase 2	55	Carboplatine-Etoposide	2.9 (1.7-3.5)	9.6 (9.7-12.7)
(Culine et al., 2007)	Phase 2	41	Cisplatine-Docétaxel	8(ND)	12(ND)
(Corn et al., 2019)	Phase 2	ND	Carboplatine-Cabazitaxel	5.6(4.4-8.0)	19.2 (17.0-29.3)

**Tableau 12 : Principales études évaluant le traitement des carcinomes neuroendocrines de la prostate métastatiques** (d'après Campedel L et al., 2017). SSP : Survie sans progression SG : Survie globale.

La disparité des résultats s'explique par des critères d'inclusion différents entre les études. Cela est dû à la nécessité pour les cliniciens d'identifier les tumeurs requérant un traitement plus agressif sans certitude sur la transformation neuroendocrine. Par exemple, pour ce qui est des marqueurs en immunohistochimie souvent utilisés dans les études comme critères

d'inclusion, Loriot Y. et al. sur une série de 40 patients, ne retrouvaient pas d'association significative entre le taux élevé de CgA ou de NSE et la réponse à la chimiothérapie par carboplatine- étoposide ou le pronostic (Loriot et al., 2009), ni même, selon une autre équipe, entre la présence ou non d'un contingent neuro-endocrine (morphologique ou en immunohistochimie) (Steineck et al., 2002). Ceci apporte deux informations majeures : il n'y a pas de corrélation systématique entre la présence de marqueurs neuroendocrines circulants et la présence d'une forme neuroendocrine histologique, et l'intensification thérapeutique n'est pas uniquement efficace en cas de forme transformée.

Pour l'instant la chimiothérapie recommandée pour ces tumeurs avec composante neuroendocrine majoritaire ne diffère pas des recommandations classiques. Il s'agit de taxanes, docétaxel ou cabazitaxel en seconde intention (CCAFU, 2020). Pour les tumeurs neuroendocrines « pures », une chimiothérapie orientée neuroendocrine par sels de platine et etoposide est une option (Pavel et al., 2016). Des essais cliniques sont néanmoins en cours (Tableau 13).

Enfin, des altérations génomiques de la voie de réparation de l'ADN telles que les mutations/délétions impliquant *BRCA1/2*, *ATM*, et la famille des gènes *FANC*, sont plus fréquentes dans les cancers de la prostate résistants à la castration (Robinson et al., 2015; Barbieri et al., 2012) pouvant mener à la prescription future d'inhibiteurs de PARP dans la population neuroendocrine. Des travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* à partir d'un NEPC avec délétion *FANCA* montraient également une sensibilité accrue aux platines (Beltran et al., 2015).



Référence	Molécule	Type d'étude	Mécanismes	Résultats
<b>Inhibiteurs IL6-STAT3</b>				
(Hudes et al., 2013)	Siltuximab (CNTO 328)	Essai de Phase I trial en combinaison avec docétaxel	Anticorps monoclonal chimérique qui se lie et neutralise la bioactivité d'IL-6 et l'activité de STAT-3	Efficacité dans le CPRC
(Tang et al., 2011; Lilly et al., 2015)	Lycopene	Essai de Phase I trial en combinaison avec docétaxel	Inhibe signal IL-6 et diminue l'expression de STAT3 et sa phosphorylation	Bien toléré avec le docétaxel ; analyse en cours
(Hellsten et al., 2011; Don-Doncow et al., 2014)	Galiellactone	Préclinique	Inhibe directement l'activité transcription de STAT3	NA
<b>Inhibiteurs CSC</b>				
(Ketola et al., 2012)	Disulfiram	Inhibiteur de l'activité de ALDH	Essai de phase Ib dans le mCPRC et NEPC (stoppé car manqué d'efficacité)	NA
NCT02963051				
(Puca et al., 2017)	Rovalpituzumab (Rova-T)	Anticorps conjugué ciblant le ligand DLL3 de NOTCH	Essai de Phase I chez les patients exprimant DLL3, avec un bras dédié NEPC	NA
NCT02709889				
<b>Inhibiteurs MYCN et AURKA</b>				
(Lee et al., 2016; Beltran et al., 2019)	Alisertib (MLN8237)	Inhibe AURKA et rompt le complexe AURKA – MYCN pour inhiber la transcription dépendant de MYCN.	Essai de Phase II chez les NEPC confirmés ou suspects.	Réponse clinique 30% patients, survie sans progression clinique de 2.3 mois dans le bras NEPC
NCT01799278				
(Attwell et al., 2016)	ZEN003694	Inhibe protéine BET et induit apoptose dans les lignées cellulaires de NEPC	Essai de Phase I simple agent ou en combinaison avec enzalutamide dans les mCPRC	NA
NCT02711956				
(Antonarakis et al., 2016)	GS-5829	Inhibe les protéines BET	Essais de Phase I et II comme un simple agent et en combinaison avec enzalutamide dans les mCPRC.	NA
NCT02607228				
<b>EZH2 inhibitors</b>				

(Yap et al., 2019)	GSK2816126	Inhibe l'activité de EZH2 et réduit H3K27me3 et diminue la prolifération	Essai de Phase I dans les lymphomes et tumeurs solides incluant CPRC	Bonne tolérance. Stabilité chez 7/30 patients. Mais pas d'investigation clinique ultérieure
(Knutson et al., 2014) NCT02875548	Tazemetostat (EPZ-6438)	Inhibe EZH2 et force la différenciation terminale et/ou l'apoptose	Essai de Phase II dans les lymphomes et tumeurs solides	Activité antitumorale dans les lymphomes à grandes cellules B et folliculaires avec activation mutations EZH2
(Vaswani et al., 2016) NCT03480646	CPI-1205	Inhibe activité EZH2 et réduit H3K27me3	Essai de Phase Ib/II en combinaison avec enzalutamide ou abiraterone plus prednisone dans les mCPRC (PROSTAR)	NA
<b>Autres</b>				
(Aggarwal et al., 2020) NCT03910660	BXCL701	BXCL701 est un activateur immunitaire inné expérimental administré par voie orale, conçu pour déclencher une inflammation dans le microenvironnement tumoral.	Essai de Phase 1b/2 pour déterminer le taux de réponse composite du BXCL701 administré par voie orale combiné avec le pembrolizumab, chez les patients avec cancers neuroendocrines à petites cellules.	Bonne tolérance chez les patients avec mCPRC.

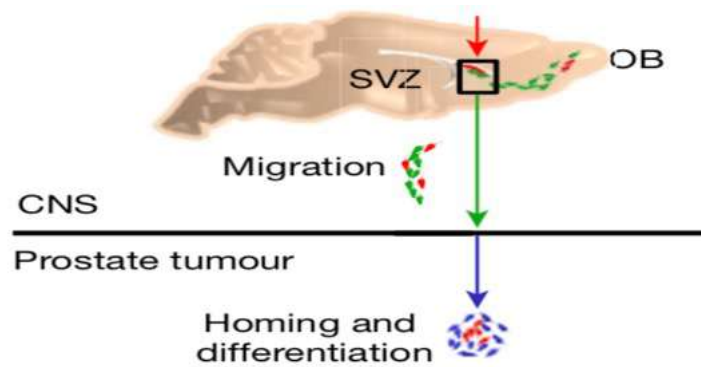
**Tableau 13 : Principales études cliniques en cours dans le traitement des carcinomes neuroendocrines de la prostate métastatiques.**

## VI. GUIDAGE AXONAL ET CANCEROGENESE

### A. Interactions entre le système nerveux central et périphérique dans le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est un cancer innervé, et à l'instar d'autres cancers innervés (notamment du tractus digestif) la question du rôle de cette innervation dans son évolution et par conséquent du guidage axonal se pose.

Une étude parue dans la revue Nature en 2019 illustre un concept d'interférence unique (« crosstalk ») entre le système nerveux central et les tumeurs de la prostate, et révèle des cibles neurales pour le traitement du cancer (Mauffrey et al., 2019) (Figure 13). A partir de modèles murins de cancer de la prostate, les auteurs ont montré que les fluctuations de progéniteurs neurales exprimant la doublecortine (DCX+) dans la zone sous-ventriculaire, une zone neurogène du système nerveux central, sont associées à une rupture de la barrière hémato-encéphalique et à la sortie des cellules DCX+ dans la circulation sanguine. Ces cellules s'infiltrèrent et se logent ensuite dans la tumeur primitive, et peuvent générer de nouveaux neurones adrénérgiques. La déplétion génétique sélective des cellules DCX+ inhibe les phases de développement précoce de la tumeur dans les modèles murins de cancer de la prostate, tandis que la transplantation de progéniteurs neuronaux DCX+ favorise la croissance de la tumeur et la formation de métastases. Chez l'homme, la densité des progéniteurs neuronaux DCX+ est fortement associée à l'agressivité et à la récurrence des adénocarcinomes de la prostate. Il est donc révélé dans ce travail un processus de néo-neurogenèse associée à la tumeur dans lequel les précurseurs neuronaux quittent la SVZ et atteignent, par le biais du sang, la tumeur primitive ou les métastases, dans lesquels ils peuvent se différencier en néo-neurones adrénérgiques connus pour soutenir les premiers stades du développement du cancer (Magnon et al., 2013). D'autres études sont néanmoins nécessaires pour caractériser les événements cellulaires et moléculaires qui contrôlent la sortie des cellules progénitrices neurales des niches neurogènes chez les rongeurs et les humains.



**Figure 13 : Un dialogue unique entre le système nerveux central et les tumeurs de la prostate** (d'après Mauffrey et al., 2019).

OB : bulbe olfactif ; SVZ : zone sous-ventriculaire, CNS : système nerveux central

## B. Molécules impliquées dans le guidage axonal

Le guidage axonal (« axon guidance ») correspond à la territorialisation axonale du cerveau en développement impliquant une famille de récepteurs membranaires Plexines et Neuropilines interagissant avec des ligands appelés Sémaphorines. Il existe une vingtaine de Sémaphorines réparties en 8 classes dont 5 appartenant aux vertébrés (classes Sema3 à Séma7) sur la base de leur structure de domaine. Les classes de Sémaphorines 1 et 2 et 5c sont trouvées chez les invertébrés, et la classe V chez les virus. Les récepteurs Plexines, qui sont les récepteurs prédominants pour les Sémaphorines sont groupées en 4 classes (A-D) et chaque classe de récepteur Plexine peut interagir avec une ou plusieurs classes particulières de Sémaphorines pour induire un signal.

D'autres récepteurs ont également été identifiés comme appartenant à cette grande famille comme les récepteurs Roundabout (ROBO) et leurs ligands Slit, mais aussi les récepteurs Nétrines ou Ephrines (Suchting et al., 2006) ou encore plus récemment les familles de morphogènes Wnt, Sonic hedgehog (Shh) et la fibronectin leucine-rich transmembrane (FLRT) qui est une famille de protéines d'adhésion cellulaires impliquées dans le développement neuronal (Tableau 14).

Famille	Membres
Semaphorines, Plexines, Neuropilines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuropilines : -Neuropiline 1,2 (NRP1, 2)</li> <li>• Plexines -Plexines A1-4, Plexines B1-4, Plexine C1, Plexine D1</li> <li>• Sémaphorines -Séma 1a,b; Séma 2a,b ; Séma 3a -h; Séma 4a-h</li> </ul>

	(Tamagnone et al., 2012)
Slit et récepteurs Robo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Slit 1-3, Robo 1-4</li> </ul> (Jiang et al., s. d.)
Ephrines et Récepteurs Eph	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chez l'homme : EphA1–8, EphA10, EphB1–4, and EphB6</li> </ul> (Seiradake et al., 2016; Suchting, et al., 2006)
Netrines et récepteurs Nétrines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Netrins 1, 3, 4 ; récepteurs DCC et UNC5 (UNC5A, UNC5B, UNC5C and UNC5D</li> <li>• Netrins G1, G2 (« membrane-anchored), récepteurs NGL1 and NGL2 (pour G1/G2)</li> </ul> (Seiradake et al., 2016)
Autres (décrites plus récemment)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protéines FLRT et récepteurs Unc5</li> <li>• Morphogènes Wnt et Shh</li> </ul> (Seiradake et al., 2016)

**Tableau 14 : Focus sur les molécules impliquées dans le guidage axonal.**

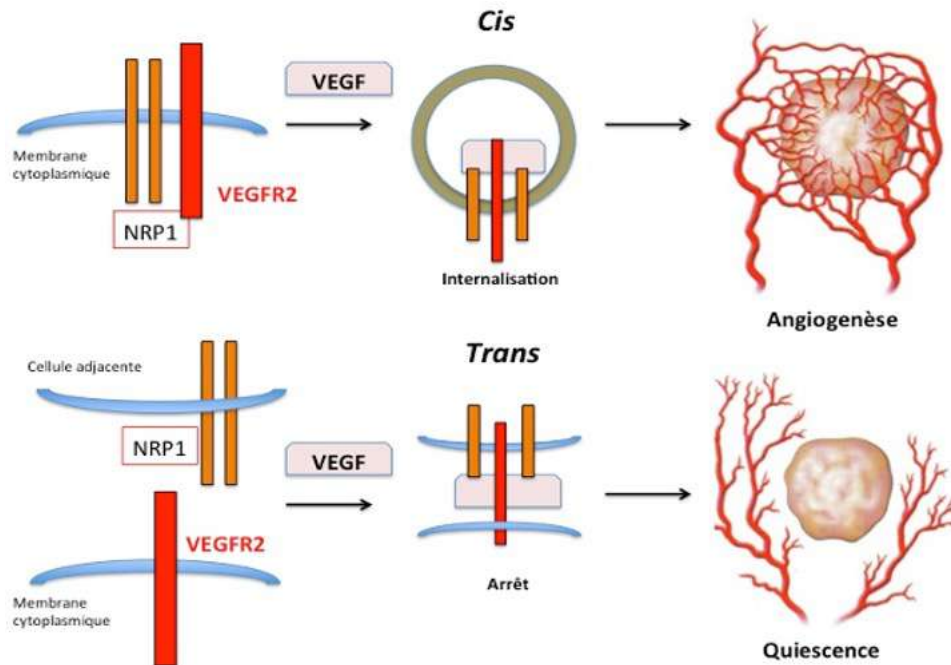
Un grand nombre d'autres récepteurs et co-récepteurs membranaires sont également importants pour la transduction du signal « Sema ». Ces protéines se lient directement aux Semas et initient la signalisation (par exemple, les intégrines), agissent comme des co-récepteurs se liant à un ligand (par exemple, NRP1, NRP2), et/ou travaillent dans le cadre de récepteurs multimériques complexes (tels que, les récepteurs à tyrosine kinase RTK).

Les Sémaphorines du groupe 3 ont été les plus décrites, ce sont des protéines sécrétées, contrairement aux Sémaphorines des autres classes qui sont des protéines membranaires (« membrane-anchored »). Les Sémaphorines sécrétées de la classe 3 ont des propriétés spécifiques car n'étant pas seulement liées aux récepteurs Plexines mais aussi aux Neuropilines 1 et 2 (qui agissent plutôt comme corécepteurs obligatoires) (Rehman & Tamagnone, 2013).

Les récepteurs Plexines et Neuropilines interagissent également avec des corécepteurs membranaires dont certains sont décrits dans l'angiogenèse tels que VEGFR mais aussi activant des voies de signalisation connues dans la cancérisation comme MET, HER2 ou encore la voie de l'HGF (Hepatocyte Growth factor) (Neufeld & Kessler, 2008).

Certaines Semaphorines transmembranaires peuvent également fonctionner comme récepteurs « inverses » (voir Figure 14 : sur le schéma, les flèches vers la gauche) et participent aux interactions « en cis » (dans la même cellule) avec les récepteurs Plexine. Le fonctionnement « en cis » c'est-à-dire présentation du couple ligand/récepteur au sein de la même cellule et « en trans » c'est-à-dire présentation du couple ligand-récepteur à partir de cellules adjacentes, renforce la complexité des liens entre membres du guidage axonal. De ce fait, les conséquences fonctionnelles peuvent se faire au gré du type de présentation, inverses en faveur d'un signal d'attraction ou alors de répulsion. A titre d'exemple Koch et al ont montré

qu'une interaction entre NRP1 et VEGFR2, via le VEGF en « cis » entraînait une induction de l'angiogenèse via une internalisation des corécepteurs. Au contraire, la présentation en « trans » entraîne plutôt une quiescence vasculaire (Koch et al., 2014).



**Figure 14 : Présentation en *cis* et en *trans* de NRP1 et implication dans l'angiogenèse (d'après Koch et al., 2014).**

**La particularité la plus remarquable des signaux des sémaphorines/ plexines est donc de fournir des signaux répulsifs ou attractifs pour les cellules en migration et les neurites en croissance, y compris des signaux « stop and go » impliqués dans la territorialisation du cerveau en développement.**

### C. Molécules du guidage axonal impliquées dans les cancers.

Les gènes associés au guidage axonal sont de plus en plus associés dans la littérature aux processus de d'évolution cancéreuse notamment dans le cancer du pancréas (Biankin et al., 2012), dans le cancer du sein (Luchino et al., 2013), dans le cancer de la prostate avec NRP1 (Neuropiline 1), déjà identifié comme étant un marqueur de cancer de la prostate (Yacoub et al., 2009), ou encore PLXNA2 (Plexine A2) identifié par l'équipe comme étant un gène cible régulé par ERG (Tian et al., 2014).

Les sémaphorines inhibitrices qui limitent la migration des cellules et l'angiogénèse pendant le développement sont souvent régulées à la baisse dans les tumeurs avancées, et se sont révélées être des molécules suppressives de tumeurs efficaces dans les modèles de souris précliniques. D'autres sémaphorines et plexines, telles que Sema4D, Plexine B1, Sema3E et Plexine D1, sont fréquemment régulées à la hausse dans les tumeurs car elles favorisent la progression du cancer et la propagation métastatique (Rehman & Tamagnone 2013).

Dans le cancer, la combinatoire ligand-récepteur peut donc entraîner des signaux inverses pro ou anti-tumoraux selon le mode de présentation. Cette particularité, couplé au grand nombre de molécules impliquées dans le guidage axonal explique la complexité d'étude de ces interactions.

#### 1. Dans le cancer de la prostate

De nombreux gènes appartenant au guidage axonal ont été décrits dans le cancer de la prostate ces dernières années. Nous nous concentrerons ici sur les gènes appartenant à la famille des Plexines-Neuropilines et Sémaphorines.

##### a) *SEMA3A, NRP1 et NRP2*

L'équipe française du Pr Fromont a identifié en 2009 le rôle de l'association du ligand SEMA3A au récepteur NRP1 comme pouvant être impliqué dans la progression du cancer de la prostate, par l'intermédiaire d'une boucle autocrine entraînant une sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) (Yacoub et al., 2009). La surexpression de *NRP1* était même déjà associée au grade pronostic du cancer de la prostate (Gleason) dans une étude plus ancienne de Latil et coll (Latil et al., 2000). NRP2 est un corécepteur de NRP1 et aussi du VEGFR, également mis en évidence comme associé aux cancers de la prostate de hauts grade (Goel et al., 2012).

De plus Hayashi et coll ont mis en évidence l'effet ostéoprotecteur de SEMA3A via l'axe NRP1/SEMA3A qui aboutit à une inhibition de la résorption ostéoclastique et à une stimulation de l'ostéogénèse induite par les ostéoblastes (Hayashi et al., 2012).

Dans les cancers de la prostate, la différenciation ostéoblastique induite par les cancers de la prostate est au moins partiellement médiée par SEMA3A et pourrait être régulée par la voie de la Béta-Caténine (Liu et al., 2015).

En 2017, une publication dans la revue *Oncogene* par Tse et al. a mis en évidence *NRP1* comme un gène directement réprimé par les androgènes (et notamment le récepteur aux androgènes AR) surexprimé pendant l'adaptation des cancers de la prostate aux thérapies ciblées anti-androgéniques, et la progression vers un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (mCPRC) (Tse et al., 2017).

b) *SEMA3C, SEMA4D et PLXNB1*

*SEMA3C* est associée à *SEMA3A* et entraîne une augmentation des propriétés invasives et adhésives des cellules PC3 transfectées (Herman & Meadows, 2007).

Des mutations de *PLXNB1* ont été retrouvées dans 89% (8/9) des métastases osseuses de cancer de la prostate, 41% (7/17) des métastases ganglionnaires, 46% (41/89) des cancers primitifs. En effet, la liaison du ligand *SEMA4D* avec *PLXNB1* entraîne une augmentation de la motilité cellulaire, l'invasion, l'adhérence, et l'extension de lamellipodes via l'inhibition de la liaison Rac et R-Ras et l'activité de R-RasGAP (Wong et al., 2007).

L'équipe Canadienne de Ong a mis en évidence que AR régule la transcription de *SEMA3C* qui est impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse et le caractère souche des cellules (Tam et al., 2017). Dans une étude, *SEMA3C* entraîne l'activation de multiples RTK incluant EGFR, HER2, MET d'une manière indépendante du ligand apparenté, via Plexin B1. L'expression de *SEMA3C* augmente dans les CPRC où ses fonctions sont de promouvoir la croissance des cellules tumorales et la résistance aux thérapies anti-androgéniques (Peacock et al., 2018).

Plexin B1 et ses ligands *SEMA4D/3C* jouent par ailleurs, d'après les résultats d'une autre étude un rôle dans le transfert et l'activation du récepteur aux androgènes dans le noyau (Williamson et al., 2016) et aussi du récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes ce qui constitue des preuves supplémentaires de son rôle dans la résistance aux thérapies ciblées anti-androgéniques dans les cancers de la prostate à un stade avancé (Williamson et al., 2019).

c) *SEMA3E et PLXND1*

L'équipe londonienne de Williamson a étudié l'expression des Sémaphorines et de leurs récepteurs Plexines et Neuropilines dans le cancer de la prostate par RT-qPCR et par Western-blot, mettant en évidence une surexpression de *SEMA3C* et une sous-expression de *SEMA3A* et



*SEMA3E* dans les cellules de la prostate par l'hypoxie (Blanc et al., 2011). La surexpression anormale de *SEMA3E* dans le tissu tumoral et le rôle de l'axe *SEMA3E/PLXND1* dans la cancérisation identifié par V.Blanc et coll a également été décrit dans d'autres cancers, notamment le cancer du sein où *PLXND1* agit comme un récepteur à dépendance (Luchino et al., 2013).

d) *SEMA4F*

En 2013, Ding et coll ont mis en évidence l'augmentation de l'expression de *SEMA4F* dans le cancer de la prostate par rapport au tissu prostatique sain. Cette expression de *SEMA4F* est corrélée au degré d'innervation péri-prostatique. Les cancers prostatiques de haut grade ou de stade localement évolué ont une innervation péri-prostatique plus importante et il existe donc une implication de *SEMA4F* dans les interactions entre cellules tumorales et cellules nerveuses dans le microenvironnement tumoral (Ding et al., 2013).

e) *Autres gènes :*

Il existe un lien d'influence entre l'expression de *PLXNA2* et l'expression du gène *FYN* codant pour une protéine de 59 kDa appartenant à la famille des Src kinases, identifiée comme surexprimée dans le cancer de la prostate (Posadas et al., 2009).

*ROBO2* a été impliqué dans les cancers de la prostate. Il existe une perte fréquente de *ROBO2* dans les cancers de la prostate ce qui implique un rôle de ce dernier dans la pathogenèse de cette maladie comme éventuel gène suppresseur de tumeur (Choi et al. 2014). On a également constaté une augmentation importante de l'expression de *SLIT1* dans les tumeurs prostatiques (Latil et al., 2003).

2. Autres cancers (liste non exhaustive du Tableau 15)

<b>Cancer</b>	<b>Membre du guidage axonal</b>
Prostate	NRP1, SEMA3B, PLEXINB1, PLXNA2.
Poumon	SEMA3B, SEMA3C, SEMA4D, SEMA3F, SEMA6A, NRP1, NRP2.
Sein	SEMA3A, SEMA3B SEMA3E, SEMA3F SEMA4D, SEMA6B, SEMA7A PLXNA1, PLXNA2, PLXNA3, PLXNB1, PLXND1, NRP1.
Côlon	SEMA3E, SEMA3F, SEMA4D, PLXND1.
Pancréas	SEMA3C, SEMA3D SEMA3E, SEMA5A, PLXND1, NRP2.  En particulier, la voie SEMA3D/PLXND1 a été montrée comme associée à la médiation de la signalisation paracrine entre les cellules tumorales et les nerfs pour améliorer l'innervation et l'invasion (Jurcak et al. 2019).
ORL	SEMA3A, SEMA4D, SEMA7A PLXND1
Estomac	SEMA3C, SEMA5A, SEMA6B, SEMA6D, PLXNB3, NRP1  Les tissus du cancer gastrique expriment des niveaux plus élevés de NRP1 par rapport à la muqueuse gastrique normale. Son expression est corrélée à la stadification clinique, à la différenciation de la tumeur et aux formes pathologiques (Li et al., 2016)
Mélanome	SEMA3E, SEMA3F, SEMA7A, PLXNA4, PLXNB1, PLXNB3, PLXNC1, PLXND1.
Ovaire	SEMA3B, SEMA3E, PLXNA3, NRP2.
Gliomes	SEMA3A, SEMA3C, SEMA3D.
Neuroblastome	SEMA3C, NRP1. A partir de modèles d'embryons de poulets, la dissémination des cellules de neuroblastome humain est régulée par une signalisation de cohésion contrôlée par SEMA3C via des complexes NRP/PLXN. L'expression diminuée de SEMA3C était associée à une perte de la cohésion cellulaire, un effet pro-métastatique majeur (Delloye-Bourgeois et al., 2017)
Rénal	SEMA5B.
....	....

**Tableau 15 : Membres du guidage axonal (famille des sémaphorines, plexines et neuropilines) impliqués dans les cancers non prostatiques (d'après Rehman & Tamagnone, 2013; Neufeld et al., 2016).**

## **PROJET DE THESE**



## I. AVANT PROPOS

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 fusions impliquent d'une part la partie promotrice non-codante du gène hormono-dépendant *TMPRSS2*, et d'autre part la partie codante des gènes de la famille des facteurs de transcription ETS, le gène *ERG* dans plus de 50% des cas, et les gènes *ETV1*, *ETV4* et *ETV5* dans environ 10% des cas (Tomlins et al., 2009). Sachant que les gènes de fusion *TMPRSS2-ERG* existent dans plus de 50% des cas de cancer de la prostate, il est important de rechercher s'ils jouent un rôle dans l'évolution du cancer de la prostate. L'expression de ces facteurs de transcription constituent un réseau anormal de régulation qui conduit au déséquilibre du transcriptome des cellules tumorales prostatiques. En outre, une grande partie de ces gènes partagent la capacité à être régulés par *AR* et par *ERG*, via les mêmes séquences régulatrices (Chng et al., 2012).

*AR* est l'acteur majeur dans l'évolution du cancer de la prostate. Pour exercer son action, la DHT se fixe au récepteur *AR*, membre de la famille des récepteurs nucléaires, qui joue un rôle-clé dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. Les patients atteints de cancer de la prostate de stades avancés reçoivent une hormonothérapie qui consiste à une privation androgénique par castration médicale (Attard et al., 2016). Cependant, après 18 à 24 mois de traitement, les cancers de prostate métastatiques deviennent résistants à la castration, phase associée à une moindre sensibilité de la suppression androgénique et à une plus grande agressivité. La place de plus en plus précoce, prise en pratique clinique par les hormonothérapies de nouvelle génération, inhibiteurs de la fonction de *AR* tels que l'abiraterone et l'enzalutamide, y compris chez certains patients naïfs de castration avec haut volume tumoral, a augmenté l'incidence d'une des formes agressives de CRPC, au phénotype neuroendocrine.

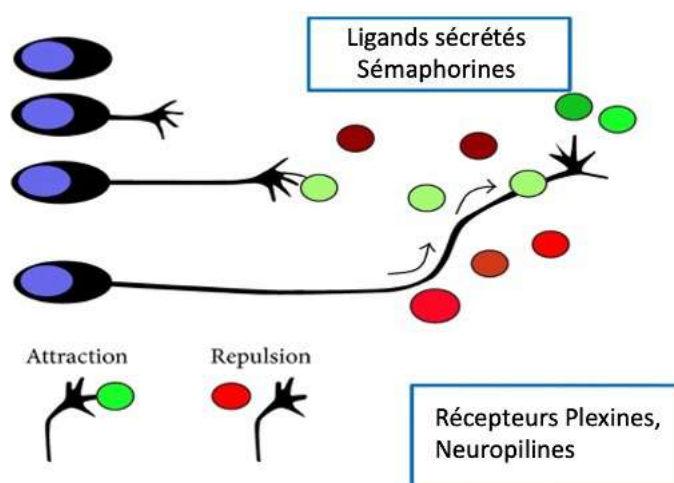
Encore mal connus et sans traitement efficace, les NEPC sont hétérogènes et seraient issus d'une transdifférenciation épithélio-neuroendocrine de cellules tumorales résistantes à la castration (Beltran et al., 2011). Lors de l'évolution du cancer de la prostate, il existe en effet des gènes normalement réprimés par le récepteur *AR* activé par les hormones, qui pourraient être « ré-exprimés » dans les cellules qui n'expriment plus *AR* ou sont résistantes à la castration. La ré-expression de ces gènes pourrait contribuer à la progression tumorale ou métastatique et à la transdifférenciation neuroendocrine. En plus de l'absence ou de l'inactivité de *AR*, ces gènes, impliqués dans les formes neuroendocrines, pourraient être activés par *ERG*, en fonction

de la présence des gènes de fusion, via la fixation directe de ces facteurs sur leurs régions régulatrices.

Depuis le début du projet, l'objectif principal de l'équipe est d'identifier les mécanismes moléculaires qui impliquent les facteurs de transcription ETS, principalement ERG, dans le développement des métastases du cancer de la prostate, et particulièrement les métastases osseuses. Dans ce but, plusieurs modèles cellulaires ont été construits pour exprimer de façon ectopique la fusion *TMPRSS2:ERG (TIE4)*. Ces modèles sont hormono-indépendants pour s'affranchir du rôle des androgènes et identifier les gènes cibles des fusions (Tian et al, 2014). Ces modèles, grâce à une étude transcriptomique ont permis d'identifier environ 2000 gènes modulés par la protéine ERG. Parmi ces gènes, plusieurs sont connus pour être impliqués dans la formation des métastases osseuses, tel que le gène *Endothéline-1*, ou dans le métabolisme physiologique osseux, tels la *phosphatase alcaline* et le *collagène de type 1* ou encore dans l'invasion tumorale comme *MMP9* (Tian et al., 2014; Delliaux et al., 2018).

**Pour mon projet de thèse, nous avons choisi d'étudier deux gènes encore inconnus dans le cancer de la prostate, le gène *Plexine A2* et le gène *Fascin 1*.**

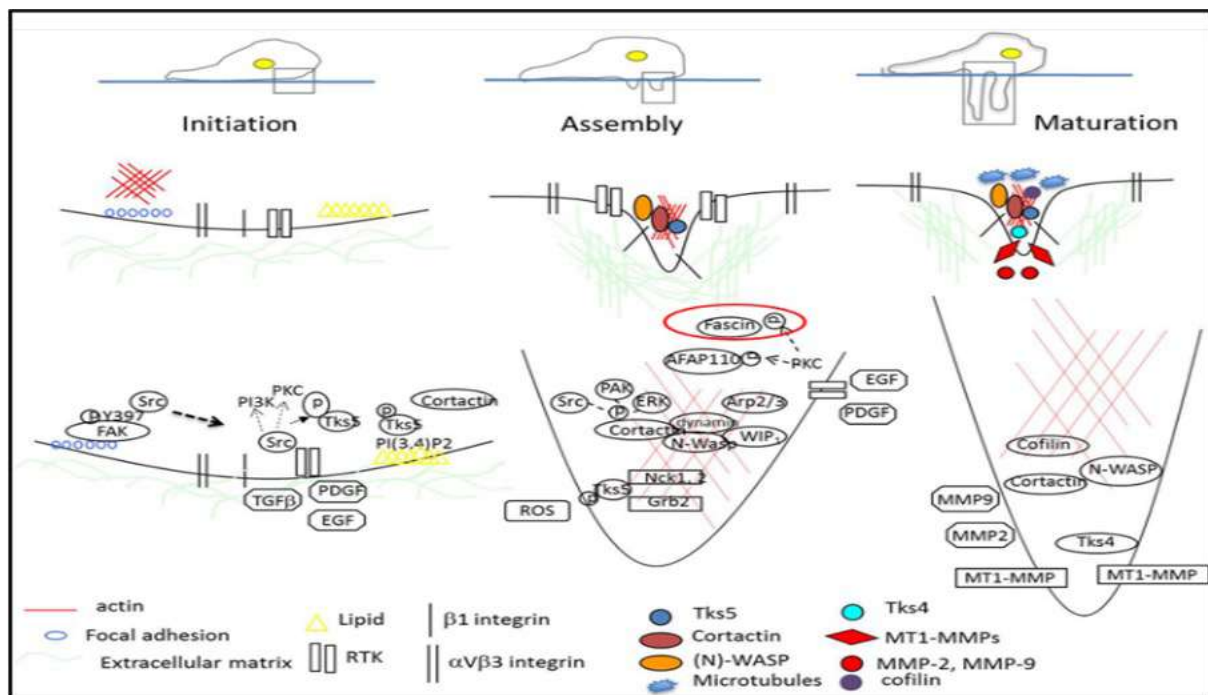
Le gène de la *PLXNA2*, membre de la famille des *Plexines*, code un des récepteurs des *Sémaphorines* (Tamagnone, 2012). Ces protéines, associées aux Neuropilines, sont impliquées dans le guidage axonal, qui correspond à la territorialisation du cerveau en développement en particulier par des phénomènes de migration cellulaire ciblée (Figure 15). Les Neuropilines sont des récepteurs multifonctionnels connus pour être également impliqués dans la tumorigenèse et l'immunité (Prud'homme & Glinka 2012). Leur rôle est inconnu dans les cancers de la prostate, et son identification ouvre la perspective intéressante de définir de nouvelles familles de gènes, non encore associées aux cancers de la prostate et régulées par la fusion *TMPRSS2:ERG*



**Figure 1 : Schéma représentatif du guidage axonal.**

Cette perspective semble d'autant plus intéressante que le cancer de la prostate est un cancer innervé, et qu'une communication unique entre territoires cérébraux et zones tumorales prostatiques innervées a été récemment mise en évidence (Magnon et al., 2013; Mauffrey et al., 2019). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette interaction cerveau-prostate restent à déterminer mais pourraient faire appel à certains acteurs du guidage axonal.

Le gène *Fascin-1* (*FSCN1*) code pour une protéine globulaire de 55kDa qui permet de regrouper les filaments d'actine (appelés F-actine) de manière très ordonnée et étroitement serrée grâce à ces deux domaines de liaison avec celle-ci. Ce regroupement permet la formation de structures transitoires et dynamiques telles que les lamellipodes des cellules normales ou les invadopodes des cellules cancéreuses. Elles sont riches en métalloprotéases et peuvent dégrader la matrice extra-cellulaire.



**Figure 2 : Formation des invadopodes** (d'après Murphy & Courtneidge, 2011).

Physiologiquement, chez l'adulte, elle est absente des cellules épithéliales, contrairement aux cellules endothéliales et dendritiques. Au cours du développement embryonnaire, l'expression de *FSCN1* est retrouvée au niveau des régions de différenciation et de migration cellulaire (Hashimoto et al., 2005). En pathologie cancéreuse, *FSCN1* est un élément clé de la migration et de l'invasion tumorale (Machesky & Li, 2010). Elle est surexprimée et est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers. En effet, une méta-analyse a révélé qu'une expression forte de *FSCN1* en immunohistochimie (IHC) était

corrélée à la mortalité, à la progression de la maladie et au risque de développer des métastases chez plus de 900 patients atteints de cancer digestif ou du sein (Tan et al., 2013).

Concernant le cancer de la prostate, peu de données sont disponibles dans la littérature : une seule étude a mis en évidence la présence de FSCN1 dans des cellules tumorales prostatiques et a établi une corrélation entre son expression et l'évolutivité du cancer (Darnel et al., 2009). A l'inverse, Özdemir et ses collègues ont visualisé FSCN1 en IHC au niveau des métastases osseuses et des cellules endothéliales et non sur les coupes de cancer de la prostate primaires (Özdemir et al., 2014).

## II. OBJECTIFS

Notre objectif est d'identifier, dans les cellules tumorales prostatiques *in vitro* et *in vivo*, les partenaires protéiques fonctionnels de PLXNA2, récepteurs et ligands, dont la fonction pourrait être modifiée à cause de sa surexpression directement régulée par la présence de la fusion *TMPRSS2:ERG*. Plus précisément, nous chercherons à étudier l'impact de la surexpression de la voie *ERG/PLXNA2* puis de *ERG/FSCN1* dans le tropisme des cellules tumorales et dans la transdifférentiation neuroendocrine des cancers de la prostate.

Notre point de départ est une étude transcriptomique réalisée à partir d'un modèle cellulaire de cellules de cancer de prostate, PC3c, que nous étudions au laboratoire. Ce modèle fait partie des modèles neuroendocrines puisqu'il est hormono-indépendant, n'exprime pas AR et exprime les marqueurs neuroendocrines CgA et SYP (Puca, Vlachostergios, et Beltran 2019). Parmi les gènes identifiés dans cette étude transcriptomique, nous avons privilégié une sélection de gènes candidats, naturellement réprimés par AR, puis ré-exprimés dans les cas de NEPC où AR est absent ou inactif tels que *PLXNA2* et *FSCN1*.



## **RESULTATS**



# I. PREMIERE PARTIE : GENES DU GUIDAGE AXONAL IMPLIQUES DANS LA CANCEROGENESE PROSTATIQUE

## A. Avant-propos :

Des altérations génomiques ont été décrites dans le cancer de la prostate métastatique. Cependant leur rôle dans la cancérogenèse prostatique est encore incertain, et pour la majorité sans réelle applicabilité clinique (Attard et al., 2015; Abida et al., 2019).

La découverte des gènes de fusion *TMPRSS2:ERG* (Tomlins et al., 2005; Rubin et al., 2011) à partir de réarrangements chromosomiques a ouvert la voie à la description d'un sous-groupe moléculaire particulier de cancer de la prostate en raison de modifications du transcriptome prostatique induites par la fusion (Attard et al., 2016; Berger et al., 2011).

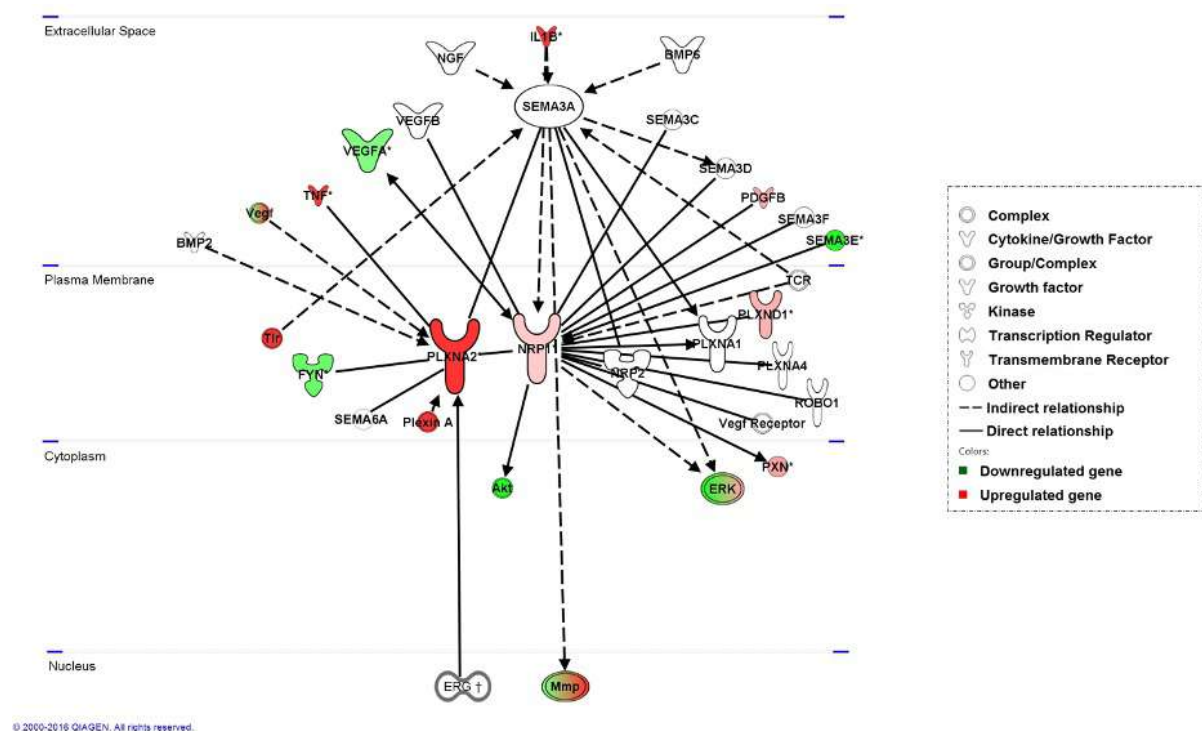
Nous avons précédemment identifié une série de gènes régulés par le facteur de transcription ERG (Flajollet et al., 2011; Tian et al., 2014). Parmi eux *Plexin A2 (PLXNA2)*, gène cible de la fusion *TMPRSS2:ERG*, n'a jamais été décrit dans le cancer de la prostate (Tian et al., 2014). *PLXNA2* a de prime abord été décrit comme ayant un rôle dans le guidage axonal, puis dans de nombreux autres processus physiopathologiques, notamment le processus de remodelage osseux (Neufeld & Kessler, 2008; Tamagnone, 2012). En particulier, la famille des Plexines, à laquelle appartient *PLXNA2*, et leurs corécepteurs Neuropilines et ligands Sémaphorines sont impliqués dans le guidage axonal et associées à des cancers innervés, parmi lesquels le cancer du pancréas (Jurcak et al., 2019; Göhrig et al., 2014). En parallèle, les cancers de la prostate ayant un statut de fusion *TMPRSS2:ERG* positif, présentent également une densité nerveuse accrue (Hänze et al., 2018).

L'identification de *PLXNA2* dans le cancer de la prostate a ouvert un nouveau champ de recherche dans le cancer de la prostate exprimant la fusion *TMPRSS2:ERG*, et nous a incité à rechercher des gènes fonctionnellement liés à *PLXNA2*.

## B. Identification de gènes partenaires fonctionnels de *PLXNA2*, issus du guidage axonal, comme dérégulés par l'expression des fusions *TMPRSS2:ERG* dans le cancer de la prostate.

Sur la base de précédentes analyses de puces à haut débit, l'équipe d'accueil a identifié *PLXNA2* comme un gène directement régulé par la fusion *TMPRSS2:ERG* (Tian et al., 2014). Nous avons

réalisé une étude *in silico* via le logiciel Ingenuity Pathway Analysis® (IPA), après avoir téléchargé les données transcriptomiques précédemment publiées (Tian et al., 2014). Cette analyse a suggéré un réseau de gènes lié à la régulation du *PLXNA2* (Figure 1). Dans ce réseau on identifie des gènes régulés à la hausse (en rouge) comme *Neuropiline 1 (NRPI)*, et des gènes régulés à la baisse (en vert) comme *Vascular-Endothelial Growth Factor A (VEGFA)*, *FYN* et *Sémaphorine 3E (SEMA3E)*. L'analyse via Ingenuity Pathway Analysis® met en évidence des gènes fonctionnellement liés, non présents dans notre étude transcriptomique, tels que *Neuropiline 2 (NRP2)*, *Plexine D1 (PLXND1)*, *Robo1 (ROBO1)*, *Sémaphorine 3A (SEMA3A)*, *Sémaphorine 3C (SEMA3C)*, *Sémaphorine 3D (SEMA3D)*, *Sémaphorine 3F (SEMA3F)* et *Vascular-Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2)*.



**Figure 1 : Réseaux de gènes fonctionnellement liés à *PLXNA2* dans les lignées cellulaires PC3c-H (haute expression de la fusion T1E4) par rapport aux lignées contrôle.** Le logiciel Ingenuity Pathway Analysis® a été utilisé pour analyser les gènes identifiés (n = 1414). Les gènes modifiés (fold-change  $\geq 1.3$  ; p-value  $\leq 0.01$  en utilisant le test exact de Fisher) ont été soumis à Ingenuity Pathway Analysis® pour identifier le régulateur en amont présumé. L'intensité de la couleur d'un nœud indique le degré de régulation positive (rouge) ou négative (vert).

Ces résultats bio-informatiques (Figure 1) ont été confrontés à une revue de la littérature effectuée en décembre 2016, pour confirmer l'intérêt de les étudier dans un modèle cellulaire PC3c. En particulier, le récepteur membranaire NRP1 (Yacoub et al., 2009; Latil et al., 2000; Goel et al., 2012; Hayashi et al., 2012) a déjà été associé à la cancérogenèse prostatique comme

son co-récepteur NRP2 (Hayashi et al., 2012). Leurs ligands sémaphorines de classe 3 (SEMA3A, C, E) sécrétées dans le microenvironnement pourraient également être impliquées dans le cancer de la prostate comme SEMA3E qui est un des ligands de PLXND1 (Blanc et al., 2011; Herman & Meadows, 2007; Luchino et al., 2013).

*FYN* code pour une protéine de 59 kDa appartenant à la famille des kinases Src, identifiée comme surexprimée dans le cancer de la prostate (Posadas et al., 2009). Si l'analyse par Ingenuity Pathway Analysis® a mis en évidence des liens fonctionnels indirects de *FYN* avec *PLXNA2*, nous avons choisi d'écarter l'analyse de *FYN* pour privilégier les interactions avec les partenaires directs de Plexines tels que Sémaphorines et Neuropilines.

Enfin, Sémaphorine 6A (SEMA6A), le ligand du PLXNA2 lors du processus d'axonogenèse semble intéressant à évaluer (Rünker et al., 2008) (Tableau 1).

Gene	Impliqué dans "migration/invasion"	Impliqué dans "prostate"	Impliqué dans "bone disorders"	Référence
<i>NRP1</i>	X	X	X	(A. Latil et al., 2000; Hayashi et al., 2012)
<i>NRP2</i>	X	X	X	(Verlinden et al., 2013)
<i>PLXND1</i>	X	X		(Rehman et al., 2016),
<i>VEGFA</i>	X	X	X	(Lee et al., 2018)
<i>SEMA3A</i>	X	X	X	(Yacoub et al., 2009; Hayashi et al., 2012)
<i>SEMA3C</i>	X	X	X	(Herman & Meadows, 2007; Binch et al., 2015)
<i>SEMA3E</i>	X	X	X	(Blanc et al., 2011)
<i>SEMA6A</i>	X			(Nogi et al., 2010; Segarra et al., 2012)

**Tableau 1 : Résultats de la revue de la littérature effectuée en 2016 pour confrontation des résultats obtenus par Ingenuity Pathway Analysis®.**

**Nous avons sélectionné les gènes *NRP1*, *NRP2*, *VEGFR2*, *PLXND1* et ceux de leurs ligands i.e. les gènes *SEMA3A*, *3C*, *3E*, *6A* *VEGFA* à étudier plus précisément *in vitro*.**

### C. Étude *in vitro* des gènes sélectionnés dans le modèle cellulaire PC3c

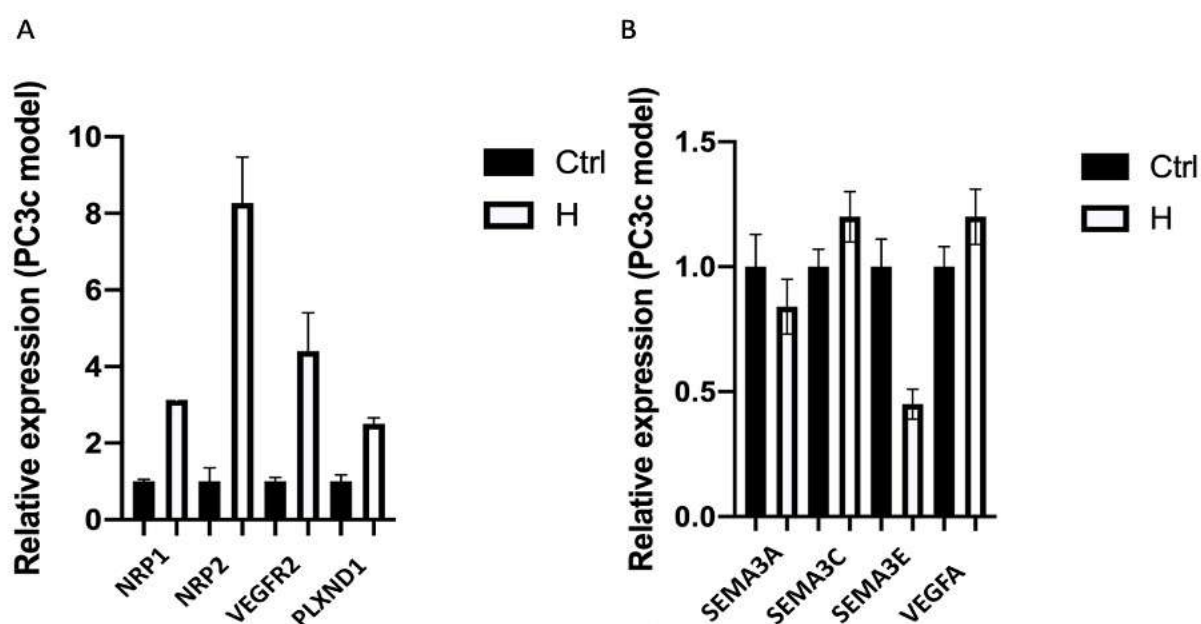
#### 1. Le modèle PC3c

Les PC3c dérivent des cellules PC3 et ont été obtenues par l'équipe du docteur Philippe Clézardin (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. Il s'agit d'une lignée fusion-négative 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., 2008; 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. Deux types de clones ont été retenus en fonction du niveau d'expression de la fusion : les PC3c-contrôle (sans fusion) et -T1E4-H (High) correspondant à une expression forte de la fusion.

## 2. Résultats *in vitro*

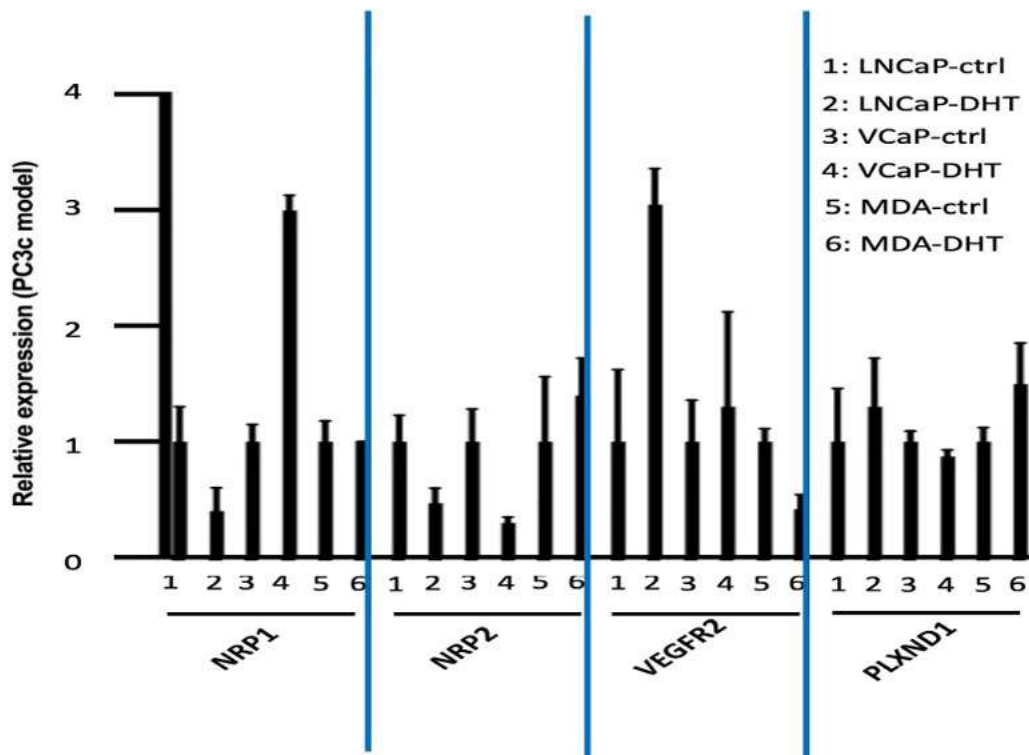
En réalisant des expériences de RT-qPCR à partir d'ADN de cellules PC3c-contrôle (PC3c-Ctrl) et PC3c exprimant fortement la fusion (PC3c-H), la plupart des gènes ont été régulés à la hausse (*NRP1* : 3 fois ; *NRP2* : 9 fois ; *VEGFR2* : 4,5 fois et *PLXND1* : 2,5 fois) dans les cellules PC3c-H par rapport aux cellules PC3c-Ctrl (Figure 2A). Parmi les gènes des ligands, seul *SEMA3E* a été régulé à la baisse 2 fois dans les PC3c-H (Figure 2B). Nous n'avons pas pu déterminer l'expression de *SEMA6A* dans nos lignées cellulaires en raison d'un dysfonctionnement des oligonucléotides. D'autres gènes, codant notamment pour des sémaphorines comme *SEMA3A*, *SEMA3C* n'avaient pas de variation d'expression ARNm, ni même le *VEGFA* (Figure 2B).



**Figure 2 : Expression ARNm des gènes du guidage axonal sélectionnés dans des clones stables PC3c-H (haute expression de la fusion T1E4) par rapport aux lignées contrôle (Ctrl).**

A : Expression ARNm des gènes codant pour les « récepteurs » *NRP1*, *NRP2*, *VEGFR2* et *PLXND1*. B : Expression ARNm des gènes codant pour les « ligands » *SEMA3A*, *SEMA3E*, *SEMA3C*, *VEGFA*.

Nous avons également déterminé la variation de l'expression de l'ARNm des gènes dans d'autres lignées de cellules prostatiques, induites ou non par les androgènes LNCaP, VCaP, MDA-PCa-2b. L'expression ARNm de *NRP1* et *VEGFR2* a été augmenté de 3 fois dans les VCaP induites par la DHT pendant 24 heures (Figure 3). Par contre l'expression ARNm de *NRP1* se trouve diminuée dans les LNCaP en cas de stimulation par la DHT. Ces résultats témoignent d'une potentielle régulation de l'expression de *NRP1* par la DHT et sont à étudier de manière plus approfondie.



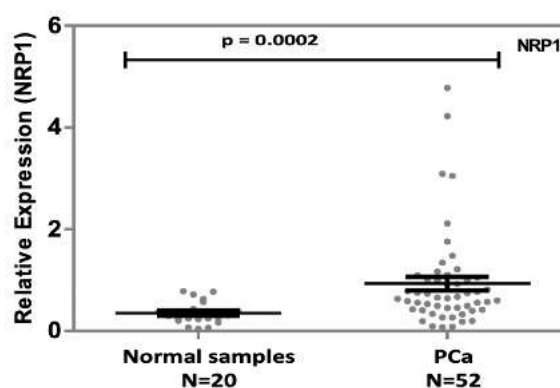
**Figure 3 : Expression ARNm des gènes du guidage axonal sélectionnés *NRP1*, *NRP2*, *VEGFR2* et *PLXND1*, dans des cellules prostatiques induites par des androgènes (DHT 100 micromol/L pendant 24h) dans les lignées LNCaP, VCaP, MDA-PCa-2b.**

Au total, les gènes *NRP1*, *NRP2*, *SEMA3E*, *PLXND1* ont été sélectionnés pour une validation clinique dans des échantillons humains de cancer de la prostate. Cette étape a pour but de tester la pertinence clinique des gènes sélectionnés.

D. Expression *in vivo* des gènes sélectionnés dans une cohorte de tumeurs primitives de cancers de la prostate.

Au laboratoire, nous disposons grâce à la collaboration avec l'équipe d'urologie (Pr Villers) et la tumorotheque du CHU de Lille (Pr X.Leroy) d'un accès à des échantillons de cancer primitifs de la prostate. Parmi 52 échantillons, dont le statut *TMPRSS2:ERG* a été déterminé, on distingue 20 échantillons positifs et 32 échantillons négatifs pour la fusion. Nous disposons également d'une vingtaine d'échantillons de prostate dite « saine », c'est-à-dire indemne de cellules tumorales car prélevé à distance de la zone pathologique.

En réalisant des expériences de RT-PCR à partir des ARNm extraits de ces échantillons humains de cancers de la prostate primitifs (n = 52) et des échantillons normaux (n = 20), nous avons établi une corrélation significative (p = 0.0002) de l'expression de l'ARNm de *NRPI* avec le tissu du cancéreux prostatique (Figure 4).



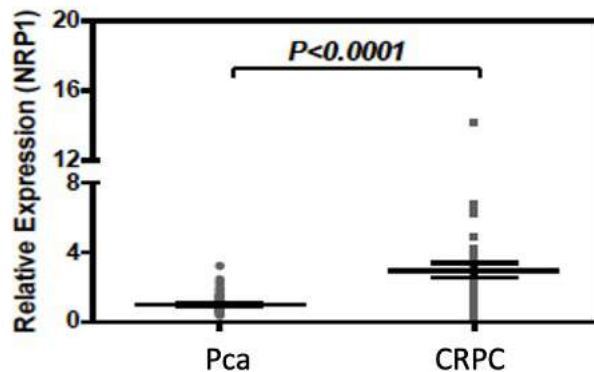
**Figure 4 : Corrélation entre l'expression ARNm de *NRPI* et le cancer de la prostate (p = 0.0002, test bilatéral de Mann Withney). PCa : cancer de la prostate primitif.**

E. Expression *in vivo* des gènes sélectionnés à partir de données publiées de cancers métastatiques

Étant donné le faible nombre d'échantillons de métastases disponibles, les patients métastatiques n'étant que rarement rebiopsié et disposant pour la plupart d'anatomopathologie de tumeur primitive, nous avons réalisé une méta-analyse (p<0,0001) utilisant des analyses d'ensembles de données de puces à ADN publiées, provenant d'une cohorte indépendante de cancer de la prostate (GSE35988 ; Grasso et al., 2012). L'expression de *NRPI* est significativement augmentée dans les échantillons de cancer de la prostate métastatiques (n=35)

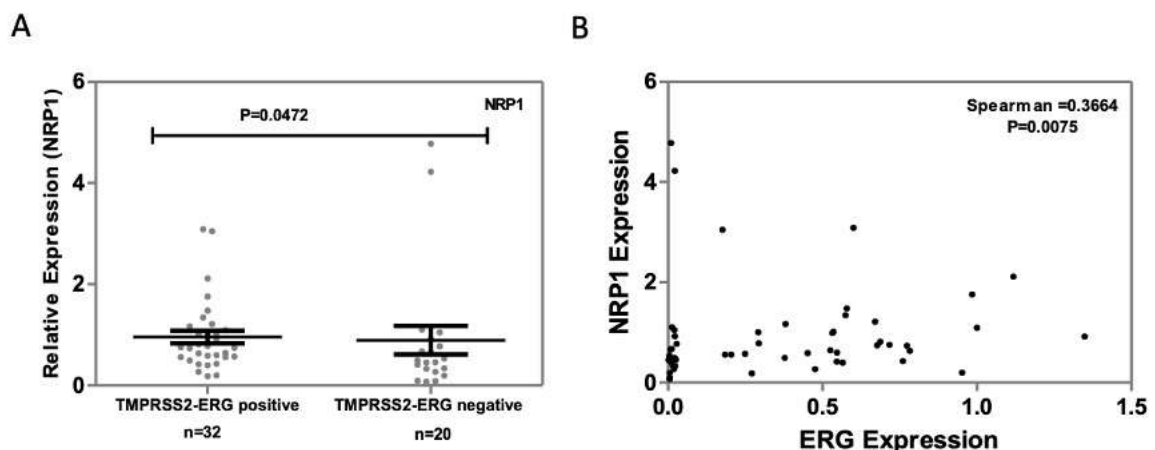


par rapport aux échantillons de cancer de la prostate primitif (n=59) dans cette méta-analyse ( $p < 0,0001$ ) (Figure 5).



**Figure 5 : Méta-analyse de l'expression ARNm de *NRPI* dans des cancers de la prostate avec métastases versus cancers de la prostate primaires sans métastases** dans le dataset indépendant GSE35988 (Grasso et al., 2012) dont les données sont publiées et disponibles. PCa : cancer de la prostate primitif, CRPC : cancer de la prostate résistant à la castration.

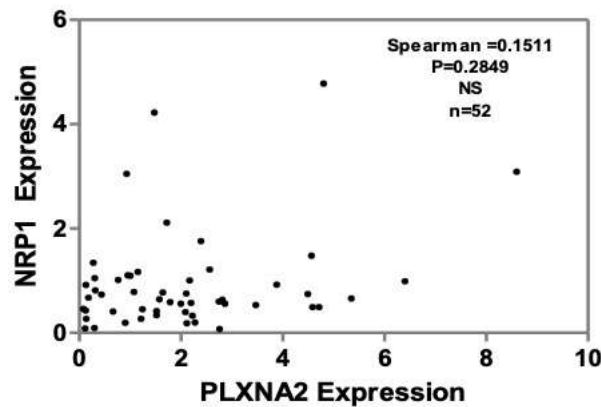
Après avoir montré que l'expression du gène *NRPI* était associé au cancer de la prostate métastatique, nous avons cherché à savoir s'il existait une corrélation avec la présence de la fusion. Nous avons utilisé notre cohorte de 52 échantillons de cancer de la prostate primaire et montré que l'expression de *NRPI* est significativement augmentée si la fusion *TMPRSS2:ERG* est présente ( $p = 0,0472$ ) (Figure 6A). Elle est également associée de manière significative à l'expression de ERG (Spearman = 0,3664,  $p = 0,0075$ ) (Figure 6B).



**Figure 6 : Corrélations entre expression ARNm de *NRPI* et la fusion *TMPRSS2:ERG*.**  
 A: Expression ARNm de *NRPI* dans des échantillons humains *TMPRSS2:ERG* positif (n = 32) ou *TMPRSS2:ERG* négatif (n = 20) échantillons de cancers de la prostate primitifs évalués par RT-qPCR ( $p = 0,0472$ , test bilatéral Mann-Whitney). B: Diagramme de dispersion montrant

l'expression relative ARNm de *NRPI* et l'expression correspondante de *ERG* (n = 52, Spearman = 0,3664, p = 0,0075, corrélation bilatérale et non paramétrique de Spearman).

Par ailleurs, *NRPI* ayant été identifié à partir de l'analyse transcriptomique réalisée dans notre modèle cellulaire PC3c, comme potentiel partenaire fonctionnel de *PLXNA2*, nous avons évalué dans la cohorte d'échantillons de cancers de la prostate disponibles (n= 52), les expressions ARNm de *NRPI* et *PLXNA2* et leur corrélation. Dans la cohorte que nous possédons, l'expression de *NRPI* ne présente pas de corrélation significative avec l'expression de *PLXNA2* (Figure 7).



**Figure 7 : Diagramme de dispersion montrant la corrélation entre l'expression ARNm de *NRPI* avec l'expression ARNm de *PLXNA2* (n = 52, Spearman = 0,2849, p = >0.005 corrélation bilatérale et non paramétrique de Spearman). NS : non significatif.**

Une telle démarche d'étude de corrélation d'expression a été appliquée à l'ensemble des gènes sélectionnés. Les principaux résultats concernant les différents gènes sont résumés dans le Tableau 2.

	<b>NRP1</b>	<b>NRP2</b>	<b>SEMA3E</b>	<b>PLXND1</b>
Corrélation avec le cancer de la prostate primitif	+	+	-	+
Corrélation avec le cancer de la prostate métastatique	+	+	+	+
Corrélation avec <i>TMPRSS2:ERG</i>	+	-	-	-
Corrélation avec l'expression mARN de <i>ERG</i>	+	-	-	-

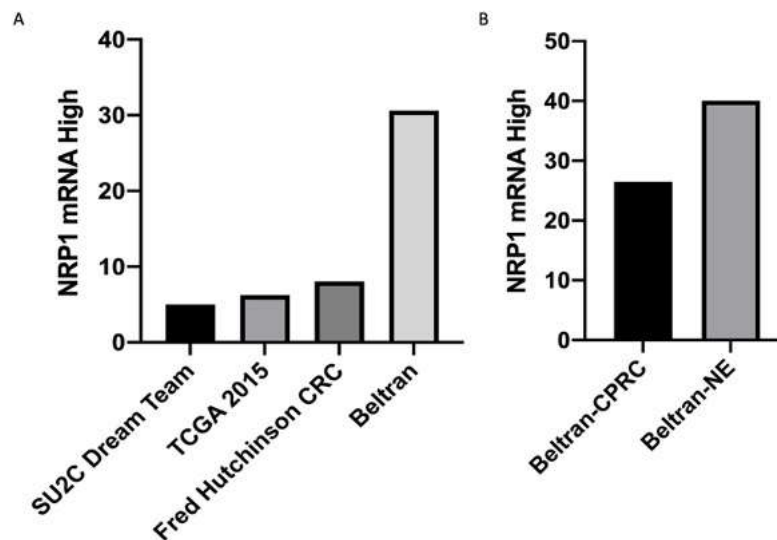
**Tableau 2 : Tableau de synthèse des corrélations entre l'expression de l'ARNm des gènes sélectionnés et le cancer de la prostate primaire, corrélation avec la présence de la fusion *TMPRSS2:ERG* et avec l'expression ARNm d'*ERG*.**

A l'issue de ces expériences, *NRP1* est le gène potentiellement lié à la présence de la fusion *TMPRSS2:ERG*, avec la plus grande relevance clinique. Nous avons donc choisi d'étudier plus précisément le rôle de *NRP1*, en lien avec la fusion *TMPRSS2:ERG* dans l'évolution du cancer de la prostate.

Nous avons, dans les expériences suivantes, voulu aller plus loin et voir si *NRP1* est associé aux cancers de la prostate plus avancés et plus agressifs, en particulier résistants à la castration et avec composante neuroendocrine.

F. *NRP1* est-il exprimé dans les cancers de la prostate avancés, résistants à la castration ?

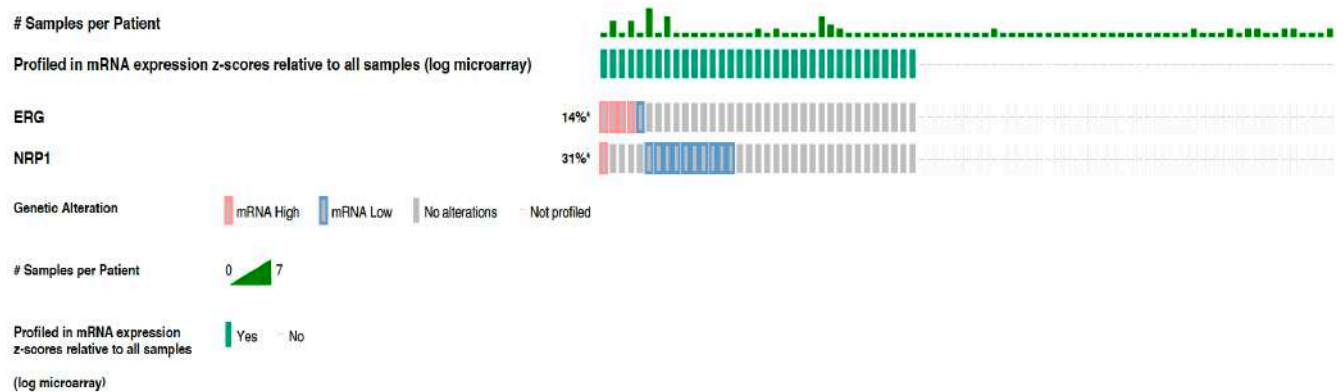
Dans les datasets publiés de CPRC comportant des données d'expression publiquement disponibles, on observe une surexpression de *NRP1* entre 5 et 8% (SU2C-Dream-Team 2015 ; TCGA, 2015 ; Fred Hutchinson) versus 31% pour le dataset de Beltran comportant des CPRC (CaP-CRPC) et des cancers neuroendocrines (CaP-NE) (Beltran et al. 2016). Dans ce dernier dataset, si les échantillons à composition strictement neuroendocrine CaP-NE sont isolés des CRPC ayant également une composante NE, dans les 49 échantillons dont on dispose de données d'expression mRNA, *NRP1* est altérée dans 40% des cas contre 26.47% pour les CPRC, témoignant d'un potentiel rôle fonctionnel dans ce sous-groupe (Figure 8).



**Figure 8 : Expression mARN de *NRP1* dans les datasets de cancers de la prostate avancés publiés.** A : Datasets comportant des CPRC. Dataset SU2C Dream Team : Abida, PNAS, 2019 (n= 444 échantillons) ; Dataset TCGA 2015 : Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer (n=333 échantillons) ; Dataset Fred Hutchinson CRC : Kumar, Nat Med, 2016 (n= 176 échantillons) ; B : Dataset de Beltran et al (Beltran, Nature Medicine, 2016) comportant des

cancers de la prostate neuroendocrines (n= 44 CaP-NEPC). Données disponibles sur cBioportal®.

Nous avons ensuite étudié la corrélation de NRP1 avec ERG dans le dataset de Beltran (Trento/Cornell/Broad 2016) (cbioportal.org), qui est à l'heure actuelle l'unique base publique comportant des données disponibles concernant les cancers neuroendocrines. Nous n'avons pas trouvé de corrélation de NRP1 avec ERG dans ce dataset Neuroendocrine ( $P > 0.99$  selon test exact de Fisher) (Figure 9).



**Figure 9 : Oncoprint représentant la présence d'altérations d'expression de ERG et NRP1** Patients pour lesquels les données d'expression ARNm sont disponibles sur cBioportal® (Trento/Cornell/Broad d'après Beltran et al., 2016).

**NRP1 est surexprimé dans le cancer de la prostate neuroendocrine. Il s'agit d'un potentiel acteur de la différenciation neuroendocrine des adénocarcinomes prostatiques.**

Afin d'étudier plus précisément le rôle de NRP1 dans les cellules neuroendocrines du cancer de la prostate, il était nécessaire de travailler sur un modèle cellulaire d'étude adapté.

#### G. Utilisation d'un modèle cellulaire neuroendocrine

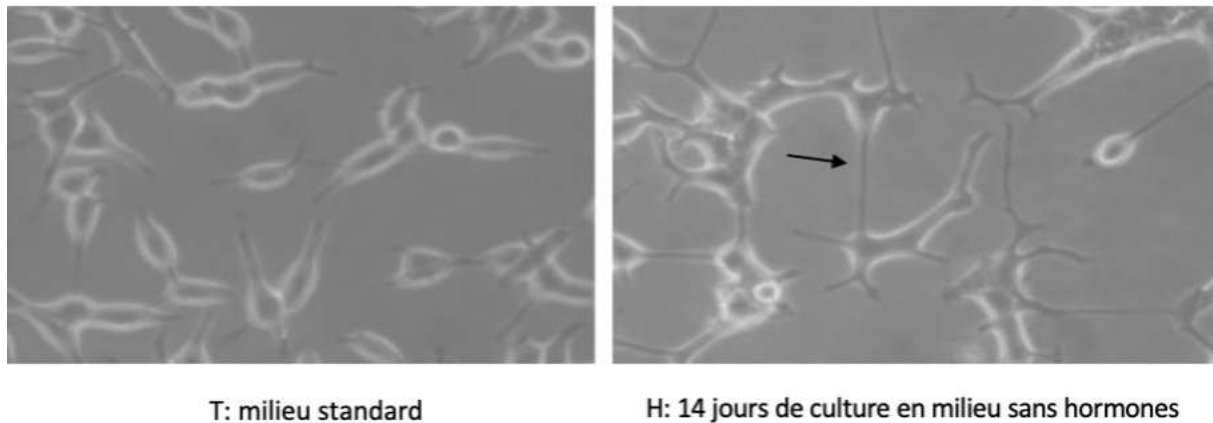
A partir de recherches bibliographiques, nous avons mis en place un modèle de culture cellulaire capable d'induire un phénotype NE à partir de cellules LNCaP, en les cultivant en milieu dépourvu d'hormone (Yuan et al., 2006 ; Yuan et al., 2007).

Afin de réaliser la culture cellulaire en milieu déplété en hormone et en potentiel précurseur, le milieu utilisé et la trypsine ne contiennent pas de rouge de phénol. Le SVF est dépourvu d'hormone après le traitement suivant : pour 500 millilitres (mL) de milieu, 50mL de SVF est traité avec 2 grammes de charbon actif pendant une nuit à 4°C. Celui-ci est ajouté ainsi que

2mM de L-glutamine aux milieux RPMI et DMEM sans rouge de phénol. Le milieu final est filtré (filtre 0.2 $\mu$ ). Les cellules sont ensuite cultivées d'après la méthode décrite précédemment.

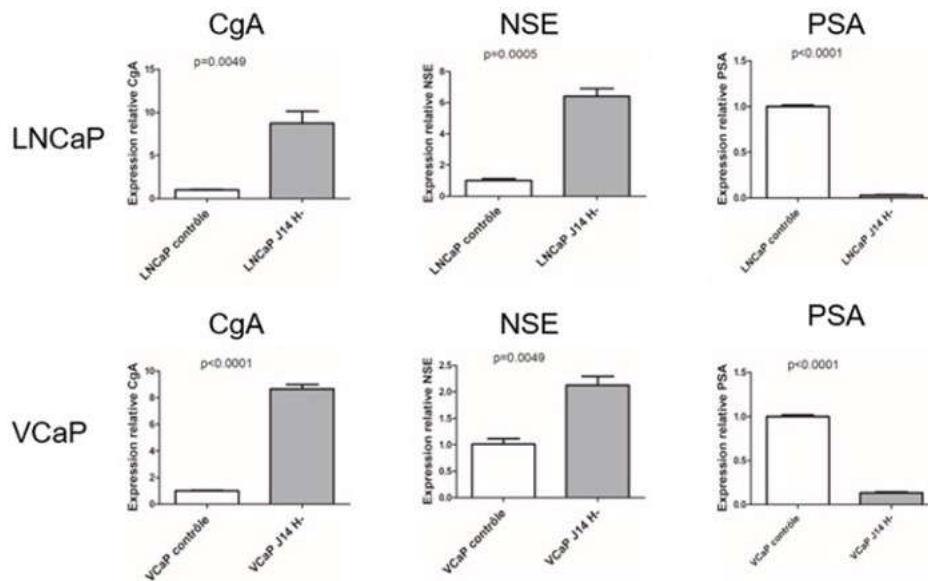
Nous avons choisi de cultiver, dans ces conditions, les LNCaP lignée androgéno-dépendante mais aussi les VCaP qui, en plus d'être sensibles aux androgènes, expriment la fusion *TMPRSS2:ERG* de manière endogène.

Après 14 jours de culture en milieu sans hormone, la morphologie des cellules se modifie : elles acquièrent un phénotype apparenté à celui des cellules neuronales (Figure 10)



**Figure 10 : Acquisition d'un phénotype neuroendocrine par les cellules LNCaP, cultivées sans hormones.** Cellules LNCaP cultivées en milieu standard 10% sérum fœtal de veau (T) et dépourvues d'hormones pendant 14 jours (H-). Grossissement X100 au microscope.

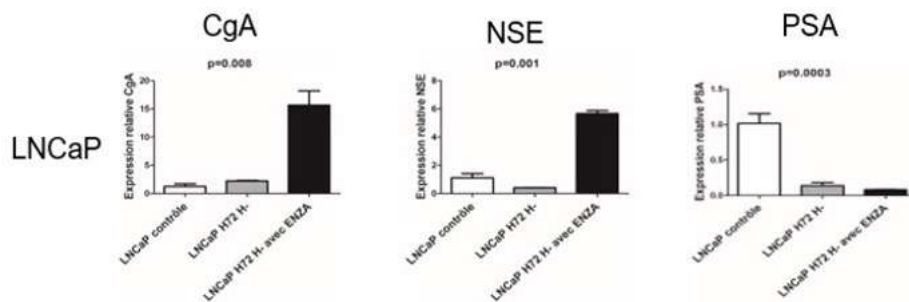
Par ailleurs, la Chromogranine A (CgA) et l'Enolase neurospécifique (NSE) sont des marqueurs de la différenciation NE utilisés en pratique médicale (Nobels, 1997). Dans les LNCaP cultivés pendant 14 jours en milieu privé d'hormone (LNCaP J14 H-), le niveau d'ARN de ces 2 gènes est augmenté, la variation est statistiquement significative pour NSE ( $p=0.0005$ ) (Figure 11). D'autre part, le niveau d'ARN du PSA, gène hormono-dépendant, est effondré dans les LNCaP J14 H- ( $p<0.0001$ ) témoignant de l'absence d'hormone, malgré un taux d'ARNm d'AR qui est étonnamment systématiquement augmenté ( $p=0.0002$ ) (Figure 11). Cependant en l'absence d'androgènes, AR n'est pas activé comme en témoigne l'effondrement de PSA. Les résultats sont similaires dans la lignée cellulaire VCaP, lignée exprimant la fusion ERG de manière endogène. Ces analyses ont été effectuées 3 fois sur les 2 lignées (Figure 11).



**Figure 11 : Étude de l'expression de marqueurs neuroendocrines dans le modèle cellulaire.** Expériences de RT-qPCR à partir de cellules LNCaP et VCaP cultivées en milieu sans hormone pendant 14 jours : surexpression de CgA, de NSE, diminution de l'expression de PSA. Statistiques : Test t de student ( $p < 0.005$ ).

**L'absence d'hormone induit un phénotype NE pour les cellules LNCaP et VCaP.**

Pour compléter, nous avons obtenu l'induction d'un phénotype neuroendocrine avec l'addition d'Enzalutamide (Enza), antagoniste de AR, à la concentration  $10\mu\text{M}$  pendant 72h (LNCaP H72 H-). Après analyse en RT-qPCR, les expressions de NSE et de CgA sont augmentées dans les LNCaP en culture en milieu sans hormone et traitées à l'Enza (Figure 12).



**Figure 12 : Étude de l'expression de marqueurs neuroendocrines dans le modèle cellulaire, en milieu sans hormone pendant 72h +/-Enza (n=3).**

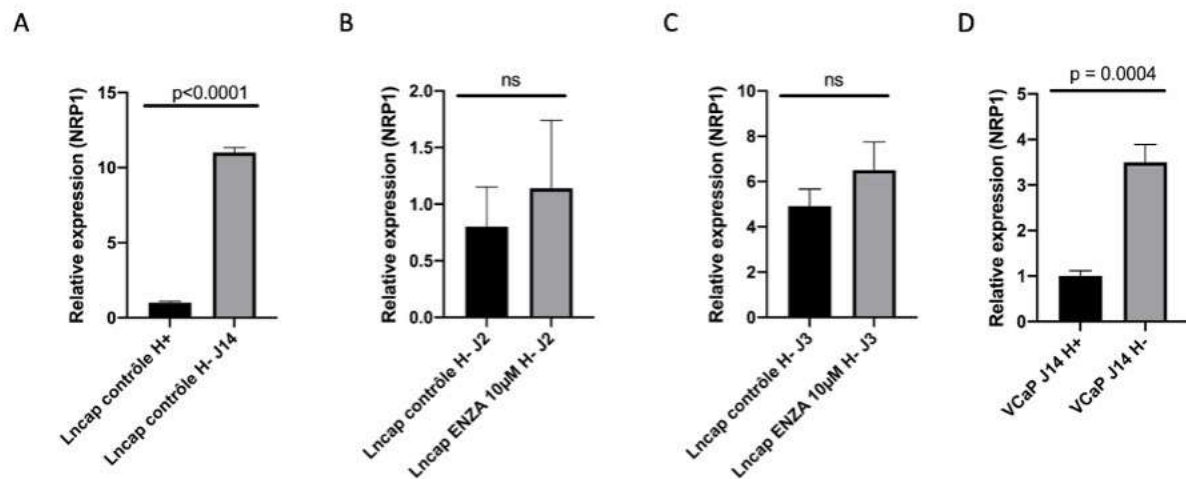
Expériences de RT-qPCR sur des LNCaP traitées ou non avec Enza à la concentration  $10\mu\text{M}$  pendant 72 heures, en milieu standard (LNCaP H72H+) ou sans hormone (LNCaP H72H-) : surexpression de CgA, NSE dans les LNCaP H72H- traitées avec de l'Enza, diminution de l'expression de du PSA dans les LNCaP H72H- traitées ou non avec de l'Enza. Statistiques : Test t de student ( $p < 0.005$ ).

## H. Suivi de l'expression de NRP1 dans les CaP-NE

### 1. En RT-qPCR dans le modèle cellulaire neuroendocrine

Après avoir induit un phénotype NE sur les LNCaP et les VCaP, nous avons suivi l'expression de NRP1 au cours de la différenciation NE. Nous avons observé une augmentation relative significative du niveau d'expression d'ARN de NRP1 à 11 fois, lorsque les LNCaP étaient cultivées en milieu déplété en hormones pendant 14 jours (Figure 13). Dans les LNCaP traitées ou non avec de l'ENZA mais cultivées en milieux sans hormones pendant 72h, le taux d'ARNm de NRP1 était également augmenté de 6 fois. (Figure 13). Le traitement par ENZA n'a pas accentué cette l'augmentation de manière significative.

Dans les VCaP, les résultats sont similaires avec une augmentation relative de l'expression de NRP1 de 3.5 fois observée dans les cellules en milieu déplété en hormone ( $p = 0.0004$ ) pendant 14 jours (Figure 13).



**Figure 13 : Suivi de l'expression ARNm de NRP1 dans le modèle cellulaire neuroendocrine.**

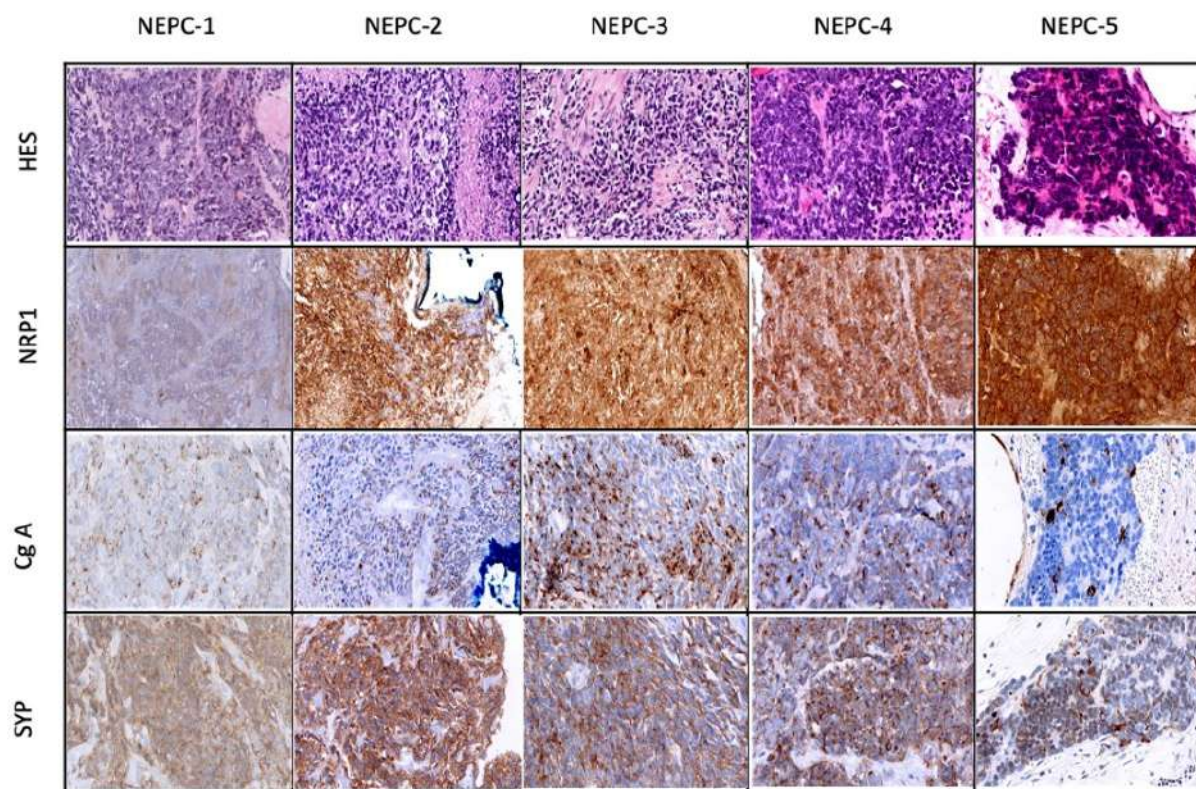
Expériences de RT-qPCR. A : cellules LNCaP milieu sans hormone pendant 14 jours versus milieu standard; B : cellules LNCaP milieu sans hormones avec ENZA 10M pendant 2 jours versus milieu sans hormones; C : cellules LNCaP milieu sans hormones avec ENZA 10 µM pendant 3 jours versus milieu sans hormones. D : cellules VCaP milieu sans hormone pendant 14 jours versus milieu standard.

**Par conséquent, une augmentation de l'expression de *NRP1* apparaît lorsque les cellules sont dans un environnement sans hormone dès 72h, c'est-à-dire en absence d'AR actif.**

On a ensuite cherché à évaluer la pertinence clinique de ces résultats obtenus sur le plan cellulaire dans des échantillons humains de cancer de la prostate neuroendocrines.

2. Recherche de l'expression protéique de NRP1 dans les cancers de la prostate neuroendocrines en immunohistochimie.

Compte-tenu des résultats obtenus précédemment, à la fois par la méta-analyse et *in vitro* à partir de deux modèles cellulaires cultivés sans hormone, nous avons cherché à évaluer la pertinence clinique de ces résultats dans les cas d'évolution neuroendocrine des cancers de la prostate. Grâce à une collaboration avec le Centre Oscar Lambret (Dr Aurélien Carnot) et la Tumorothèque du CHU de Lille (Dr Jonathan Olivier, Pr Xavier Leroy) et malgré la rareté des échantillons de NEPC, nous avons réussi à obtenir 6 échantillons humains de NEPC dont 5 exploitables. La détection de NRP1 est ubiquitaire dans les NEPC, non localisée dans les zones tumorales. Néanmoins l'intensité de la détection est forte dans 4/5 des échantillons de NEPC (Figure 14).



**Figure 14 : Détection de la protéine NRP1 sur des échantillons de NEPC.**

Expériences d'immunohistochimie à partir de 5 échantillons de NEPC, indépendamment de la présence de fusion *TMPRSS2:ERG*. CgA : chromogranine A, HES: Hematoxiline, NEPC: cancer de la prostate neuroendocrine, SYP: synaptophysine.



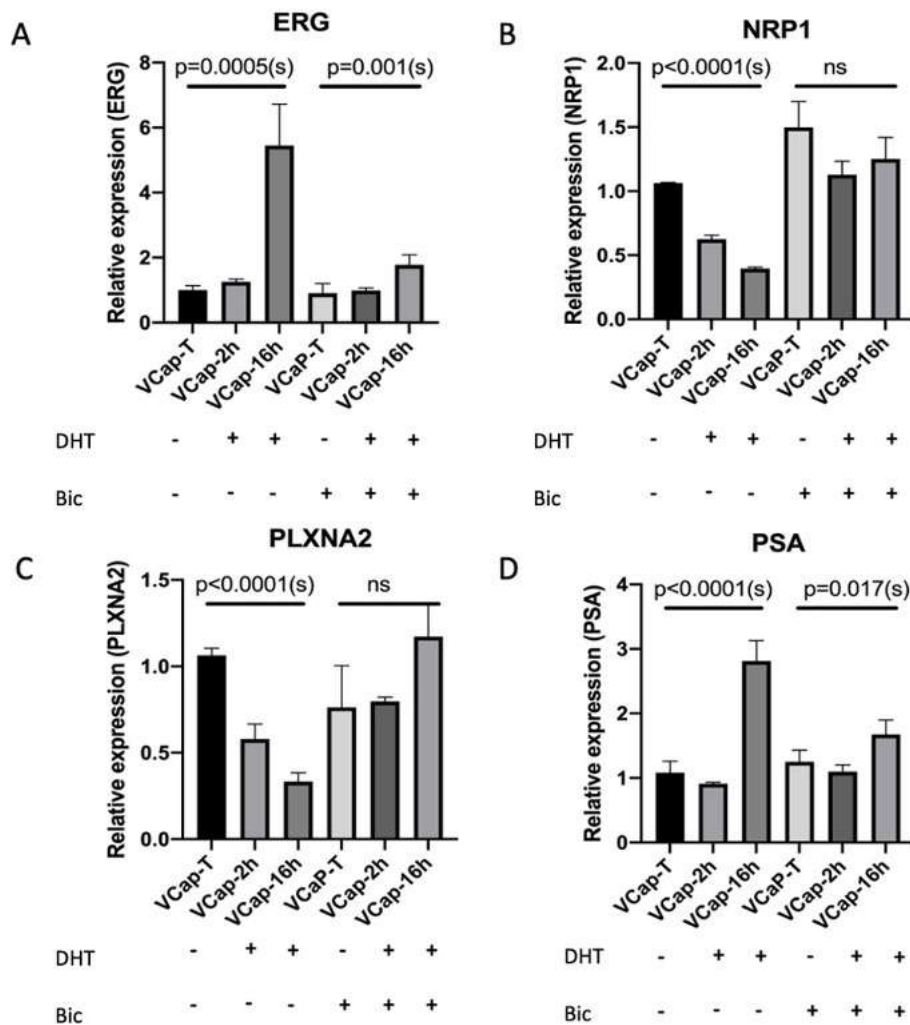
**NRP1 est détecté dans les NEPC. Le lien fonctionnel entre NRP1 et AR est à étudier puisqu'une des caractéristiques des NEPC est l'inactivité ou l'absence de AR.**

I. *NRP1* est-il androgéno-dépendant ?

Figure 15 on observe une diminution significative de l'expression de *NRP1* après 2h puis 16h d'exposition à la DHT dans les cellules VCaP ( $p < 0.0001$ , analyse de la variance en ANOVA). L'administration de Bic, inhibiteur de AR, provoque une ré-augmentation de l'expression de *NRP1*, et la différence d'expression n'est plus significative ( $p = 0.007$ , analyse de la variance en ANOVA).

Des résultats similaires sont décrits avec *PLXNA2* qui semble également être réprimé par AR dans les cellules VCaP. Ainsi on observe une diminution significative de l'expression de *PLXNA2* après 2h puis 16h d'exposition à la DHT dans les cellules VCaP ( $p < 0.0001$ , analyse de la variance en ANOVA) et la différence d'expression n'est plus significative avec du Bic ( $p = 0.0059$ , analyse de la variance en ANOVA).

Concernant l'expression de *ERG*, issu de la présence de la fusion *TMPRSS2:ERG*, on note, comme attendu, une androgéno-dépendance dans les VCaP. Les variations de l'expression de *PSA* sont le contrôle positif d'androgéno-dépendance.



**Figure 15 : Expression ARNm de *NRP1*, *PLXNA2*, *ERG*, et *PSA* selon la présence de DHT ou de l'inhibiteur Bic.** Expériences de RT-qPCR à partir des ARN des cellules VCaP, après 2h puis 16h de stimulation par DHT (100 micromoles/L) versus contrôle (VCaP-Témoin ou VCaP-T) +/- Bic (50 micromoles/L). *18S* housekeeping gene en normalisateur. P-value, avec analyse de la variance en ANOVA).

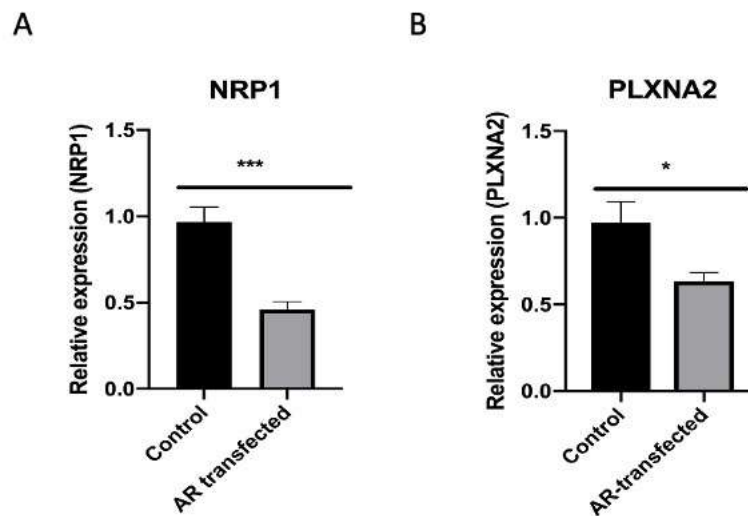
Pour étudier l'hormono-régulation de l'expression de *NRP1*, nous avons utilisés les lignées LNCaP et VCaP hormono-dépendantes et modulé l'activité de AR par traitement au DHT ou par antagonistes Bic. *NRP1* est donc réprimé lorsque AR est activé par la DHT.

Ces résultats sont discordants avec ceux présentés en Figure 3, page 101 réalisés en 2017. Par contre ils concordent avec les données de la littérature, publiés *a posteriori* de ces expériences, en faveur d'une down-régulation de *NRP1* lorsque stimulation par DHT et réexpression en présence de Bic (Tse et al. 2017). Ces expériences présentées en Figure 15, refaites de nombreuses fois (n=3) peuvent être considérés comme solides et nous avons pu affiner le délai de stimulation des cellules VCaP par la DHT (2 heures, 16 heures plutôt que 24 heures).

Par ailleurs, sachant que nous avons initialement observé une expression de NRP1 dans les cellules PC3c, hormono-indépendantes, surexprimant la fusion T1E4, nous avons repris ces clones cellulaires pour exprimer AR via un vecteur d'expression.

Nous avons choisi de confirmer ces résultats en transfectant des cellules PC3c-H (ne surexprimant pas AR) avec un vecteur d'expression AR.

Lorsque les cellules PC3c-H sont transfectées transitoirement avec un vecteur d'expression AR, on mesure une diminution significative de l'expression de NRP1 ( $p = 0.0009$ , two-tailed unpaired T test) et de PLXNA2 ( $p = 0.0117$ , two-tailed unpaired t test) (Figure 16).



**Figure 16 : Expression relative ARNm de NRP1 et PLXNA2, après transfection transitoire de AR dans un modèle hormono-indépendant.**

Expériences de RT-qPCR à partir de cellules PC3c-H avec transfection transitoire d'un vecteur d'expression de AR versus contrôle.

Ces résultats montrent que *NRPI*, comme *PLXNA2* pourraient être des gènes androgéno-dépendants, inhibé par l'activité de AR.

On peut se poser la question du rôle joué par ERG dans ce contexte. Au vu de nos précédents résultats, nous avons choisi d'étudier *NRPI* afin de déterminer s'il s'agit d'un gène cible direct de AR et de ERG.

J. NRPI est-il un gène cible direct de AR et ERG ?

Grâce à une collaboration avec la plateforme de bio-informatique BiLille (<https://wikis.univ-lille.fr/bilille/>) via Franck Bonardi et Hélène Touzet, une ré-analyse des

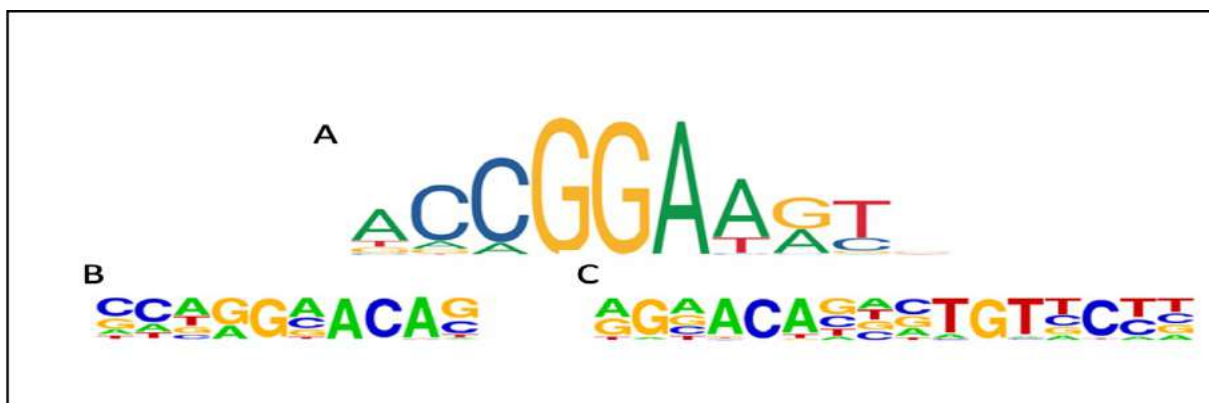
ensembles de données ChIP-Seq publiés a été effectuée. Une sélection de régions d'activité transcriptionnelle potentielle, avec liaison des facteurs ERG et AR, a été élaborée et nous avons ensuite effectué une identification de séquences génomiques (FASTA). Enfin, des expériences de ChIP *in vitro* ont été réalisées pour prouver la fixation de ERG et AR aux régions régulatrices du gène *NRPI*.

1. Analyse bio-informatique *in silico*

a) Analyse des données de ChIP-seq publiées et recherche de motifs de sites de fixation

Les sites de fixation de ERG et de AR sur le génome humain sont disponibles publiquement et sont issus de données de ChIP-seq portant sur des cellules VCaP non traitées ou traitées au DHT ou au Bic (Asangani et al., 2014; Sharma et al., 2014; Chng et al., 2012; Pomerantz et al., 2015). L'appel de pics avait déjà été réalisé, nous permettant d'accéder à la séquence des fragments immunoprécipités par l'anticorps ERG ou l'anticorps AR. Nous avons sélectionné les séquences de pics correspondant au gène *NRPI*. Ces données de ChIP-seq ont été renforcées en y ajoutant des données publiques de marques épigénétiques (H3K4Me1, H3K4Me3 et H3K27ac) et de DNase afin de visualiser les zones transcriptionnellement actives.

Les positions potentielles des sites de fixation de AR et ERG dans la version hg19 du génome humain ont ensuite été calculées de manière bioinformatique (Figure 18). Pour cela, nous avons utilisé la base de données JASPAR 2018 avec la fonctionnalité *scan* pour ERG (ERG binding sites ou EBS), et JASPAR et la suite HOMER pour AR (ARE). Les motifs correspondant aux matrices utilisées sont représentés en Figure 17.



**Figure 17 : Motifs AR et ERG issus de la base de données JASPAR et HOMER.** A : Site EBS issu de la source JASPAR 2018, identifiant MA0474.2. Le site EBS comporte un cœur GGAA ou GGAT. B et C : Motifs 7 et 6 de la collection de motifs de la suite HOMER. Le site ARE a la particularité d'exister sous la forme d'un demi-site (B) ou d'un site complet (C) en répétition inversée.

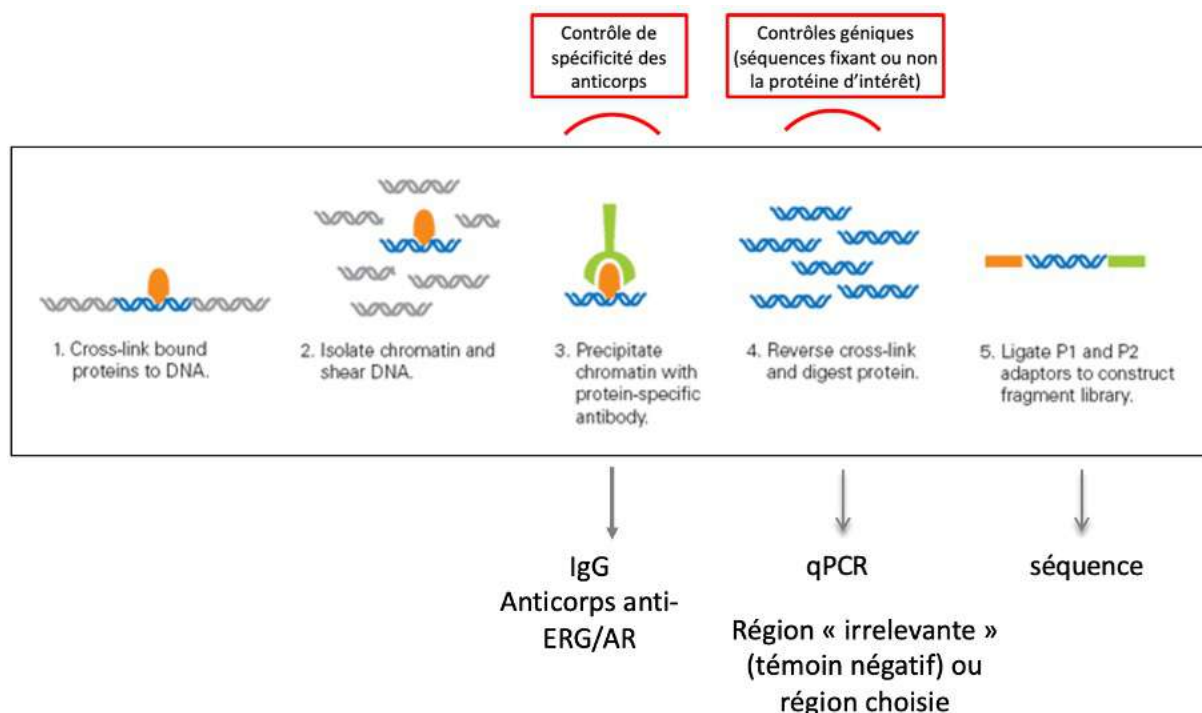


**Figure 18 : Analyse des données ChIP-seq pour la liaison des facteur AR et ERG au locus *NRPI* dans les cellules VCaP à l'aide du UCSC genome browser.**

Les pics des sites de liaison AR sont en rouge ou rose, et les pics des sites de liaison ERG en vert, pour respectivement des AR-ChIP ou ERG-ChIP dérivés de tissus normaux et tumoraux, ou de cellules VCaP ou LNCaP non traitées, traitées par DHT ou traitées par un antagoniste, comme indiqué. Les pics AR/ERG communs sont surlignés en jaune. Les lignes supérieures, correspondant aux marques H3K27Ac, H3K4Me1 et H3K4Me3, ainsi qu'aux groupes de pics d'hypersensibilité à la DNase-1, proviennent du projet ENCODE humain. Les profils sont indiqués pour les marques H3K27Ac et H3K4Me1 (souvent trouvées près des éléments régulateurs), les marques H3K4Me3 (souvent trouvées près des promoteurs), les groupes de pics d'hypersensibilité à la DNase-1 correspondent à la liaison des protéines à l'ADN.

a) *Expériences de ChIP*

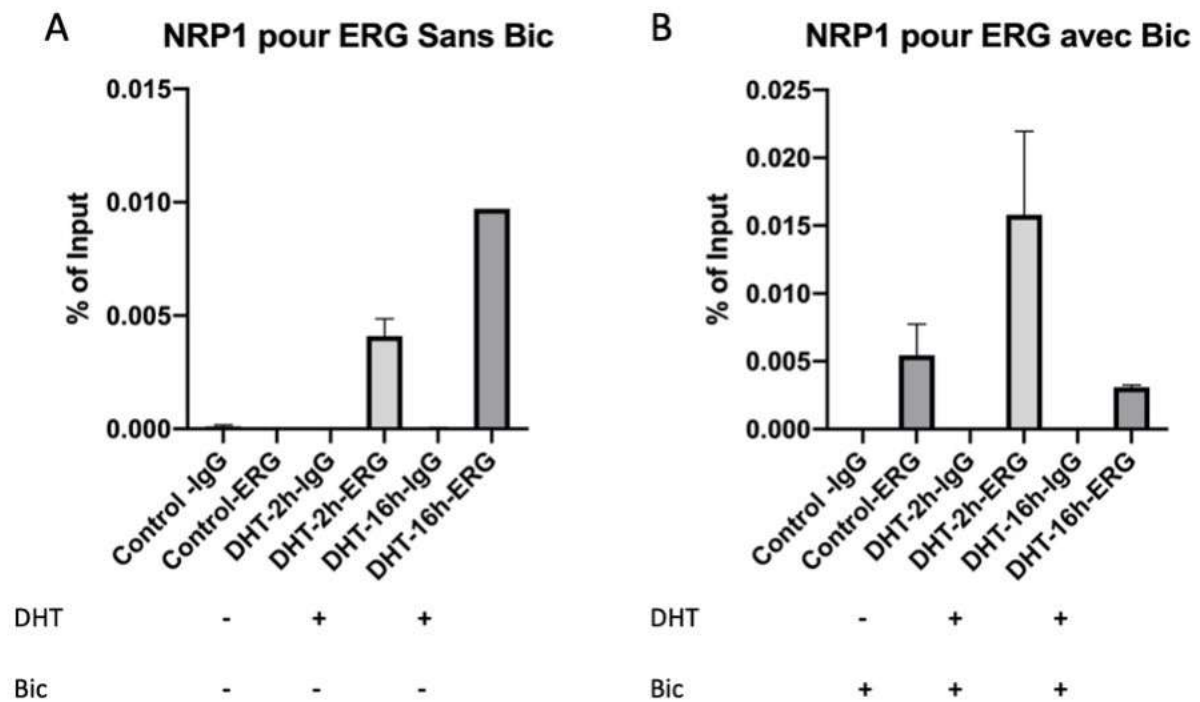
Pour compléter ces prédictions bio-informatiques, nous avons réalisé des expériences de ChIP à partir de cellules VCaP, traitées ou non par DHT pendant 2 heures ou 16 heures. Les expériences de ChIP nécessitent un double contrôle à la fois de spécificité d'anticorps (IgG) et aussi génique (séquences fixant ou non la protéine d'intérêt via une région génomique irrelevante) (Figure 19).



**Figure 19 : Principales étapes de la réalisation d'une expérience de ChIP ou ChIPSeq.**

Le premier contrôle d'anticorps IgG est vérifié : les IgG sont négatifs. Le deuxième contrôle (région génomique irrelevante) est également vérifié. Par rapport à une région génomique « irrelevante », la plus grande intensité de liaison d'ERG et d'AR au promoteur *NRPI* se fait après 16 heures de stimulation par la DHT dans des cellules VCaP. Par conséquent, ERG est

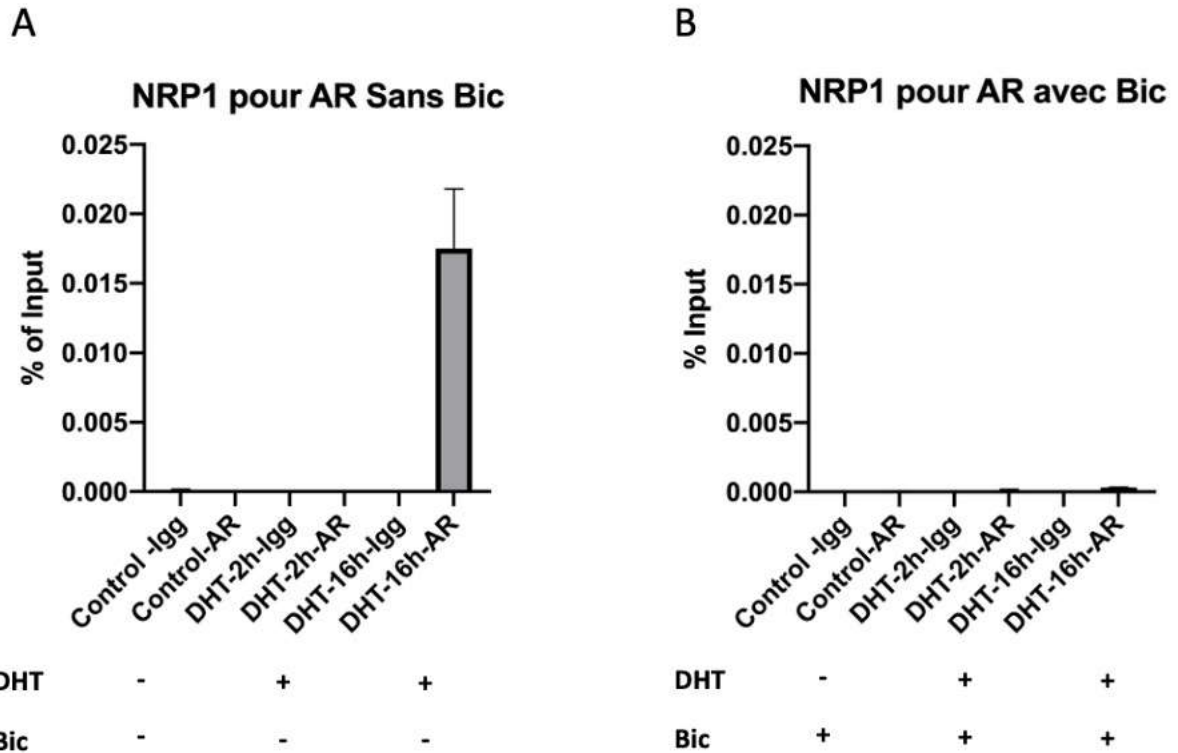
fixé sur la région sélectionnée et nous avons pu valider les prédictions de l'étude bio-informatique (Figures 20A) Lorsque l'inhibiteur de AR, Bic est ajouté, la fixation ERG reste cependant élevée (Figure 20B).



**Figure 20 : Étude en CHIP de la fixation de ERG sur NRP1.**

Expériences réalisées à partir de cellules VCaP avec des oligonucléotides *NRPI* sélectionnés pour les régions *ERG* valides (logiciel PRIMER3-Roche®). A : après stimulation par l'hormone DHT (concentration 100micromoles/L) à 2h, 16h versus contrôle B : après stimulation par l'hormone DHT à 2h, 16h versus contrôle avec la présence d'un inhibiteur AR (le bicalutamide à 50 micromoles/L). Il y a deux contrôles, un contrôle de gène (région génomique non pertinente) et un contrôle d'anticorps (IgG) pour ERG.

Dans un deuxième temps nous avons effectué des expériences de CHIP-AR à partir de cellules VCaP. AR est également fixé sur la région sélectionnée, après 16 heures de stimulation des cellules VCaP par DHT (Figure 21A). Lorsque l'inhibiteur de AR, Bic est ajouté, la fixation AR sur *NRPI* s'effondre à 16h (Figure 21B).



**Figure 21 : Étude en CHIP de la fixation de AR sur NRP1.**

Expériences réalisées à partir de cellules VCaP avec des oligonucléotides de *NRP1* sélectionnés pour les régions AR valides (logiciel PRIMER3-Roche®).

A : après stimulation par l'hormone DHT (concentration 100 micromoles/L) à 2h, 16h versus contrôle B : après stimulation par l'hormone DHT à 2h, 16h versus contrôle avec la présence d'un inhibiteur AR (le bicalutamide à 50 micromoles/L). Il y a deux contrôles, un contrôle de gène (région génomique non pertinente) et un contrôle d'anticorps (IgG) pour AR.

**Au total, *NRP1* est un gène cible de AR. La régulation de *NRP1* via ERG n'est pas confirmée.**

Comme le montrent nos expériences précédentes, *NRP1* est un gène réexprimé quand AR est inactif ou absent, en situation de résistance à la castration et dans les NEPC. Il convient de se poser la question de l'impact fonctionnel de *NRP1*, en lien avec *PLXNA2* et les principaux ligands de *NRP1*, à savoir Sémaphorine 3A et VEGFA.

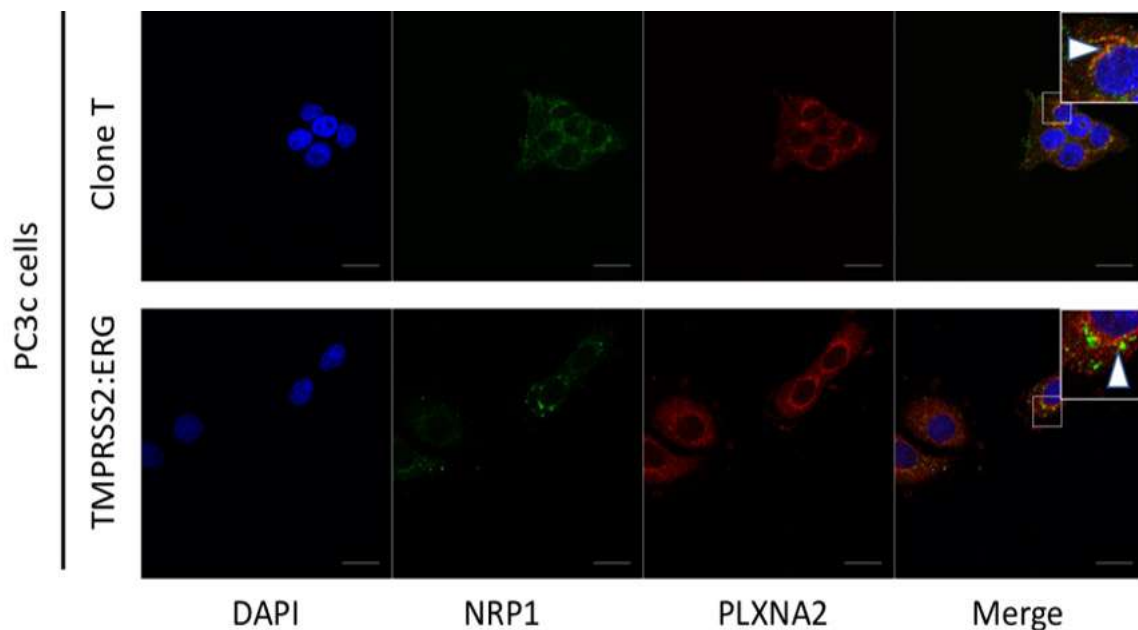
La présence préférentielle d'un ligand de *NRP1* modifie-t-elle ses interactions avec *PLXNA2* ou alors sa fonction pro-tumorale ou anti-tumorale ?

Pour tenter d'investiguer ces questions scientifiques, nous avons dans un premier temps tenté de déterminer s'il y a une interaction, par des expériences de colocalisation cellulaire en immunofluorescences. Par la suite, nous avons réalisé des expériences de migration/invasion en Transwell®.



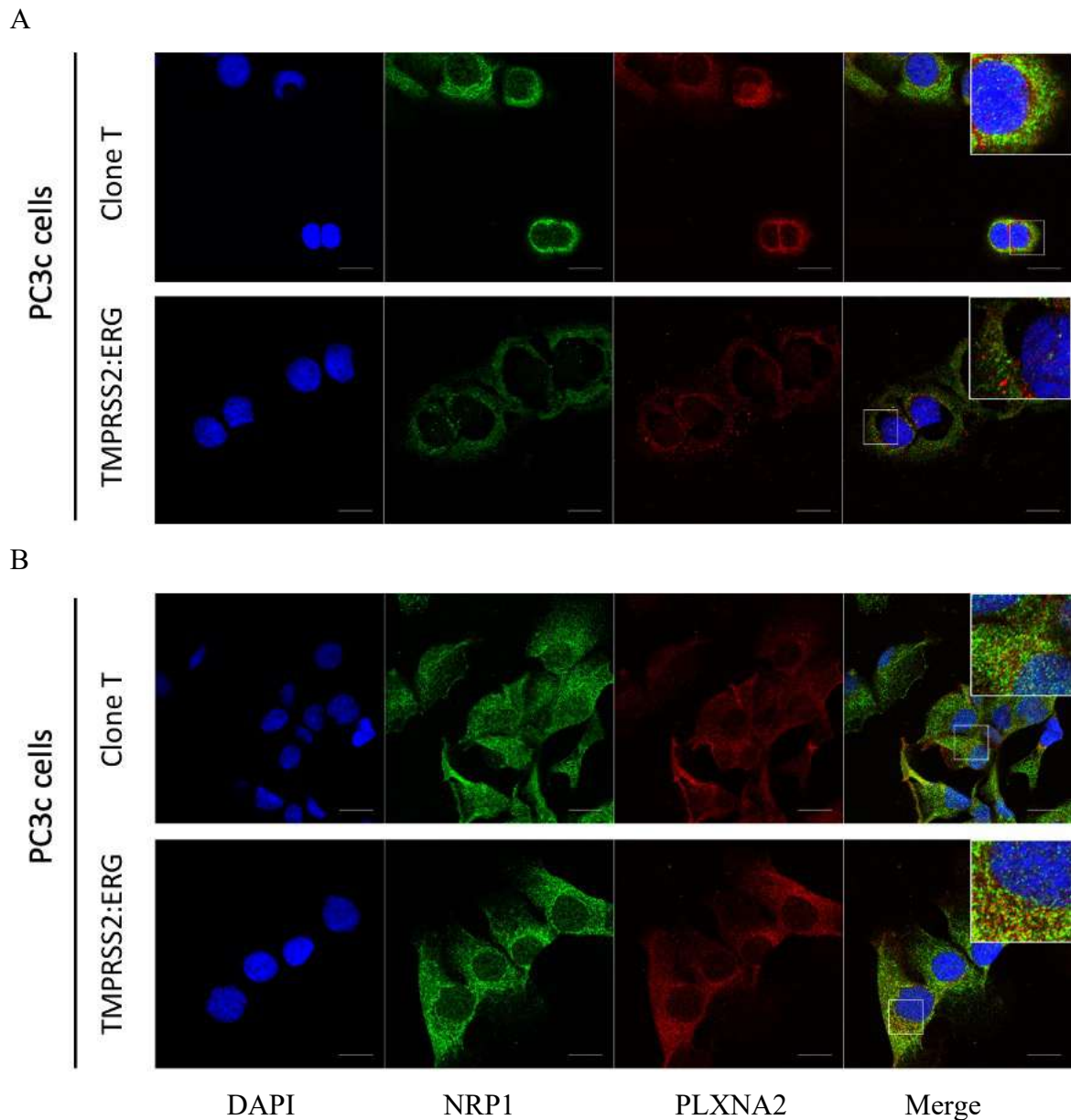
K. Détection des protéines NRP1/PLXNA2 en présence de leurs ligands SEMA3A/VEGFA/SEMA6A dans la modification de localisation cellulaire.

Des expériences d'immunofluorescence en microscopie confocale ont permis d'exprimer les protéines PLXNA2 et NRP1 dans des clones PC3c stables en surexprimant la fusion *TMPRSS2:ERG* (Figure 22). L'intérêt de cultiver les cellules en présence des ligands de PLXNA2 et NRP1 est de vérifier si ces ligands sont nécessaires à l'interaction de NRP1 et PLXNA2.



**Figure 22 : Expériences d'immunofluorescences montrant PLXNA2 (en rouge) et NRP1 (en vert) en milieu contrôlé, sans les ligands.** Cultures des cellules avec DMEM 10% Sérum de Veau Fœtal (contrôle). DAPI : marqueur de l'ADN, et Merge : fusion des images.

Par la suite, en présence des ligands SEMA3A, on distingue une modification de la localisation cellulaire entre PLXNA2 et NRP1. A contrario, en présence de ligand VEGFA, on observe une meilleure colocalisation entre PLXNA2 et NRP1. Une modification de la localisation au niveau de la membrane des cellules suggère que ces récepteurs pourraient interagir (Figure 23). Cette interaction n'a cependant pas été confirmée par des expériences de co-immunoprécipitation et de tests de ligation de proximité « Proximity Ligation Assay » (PLA), ne pouvant prouver de ce fait une véritable colocalisation.



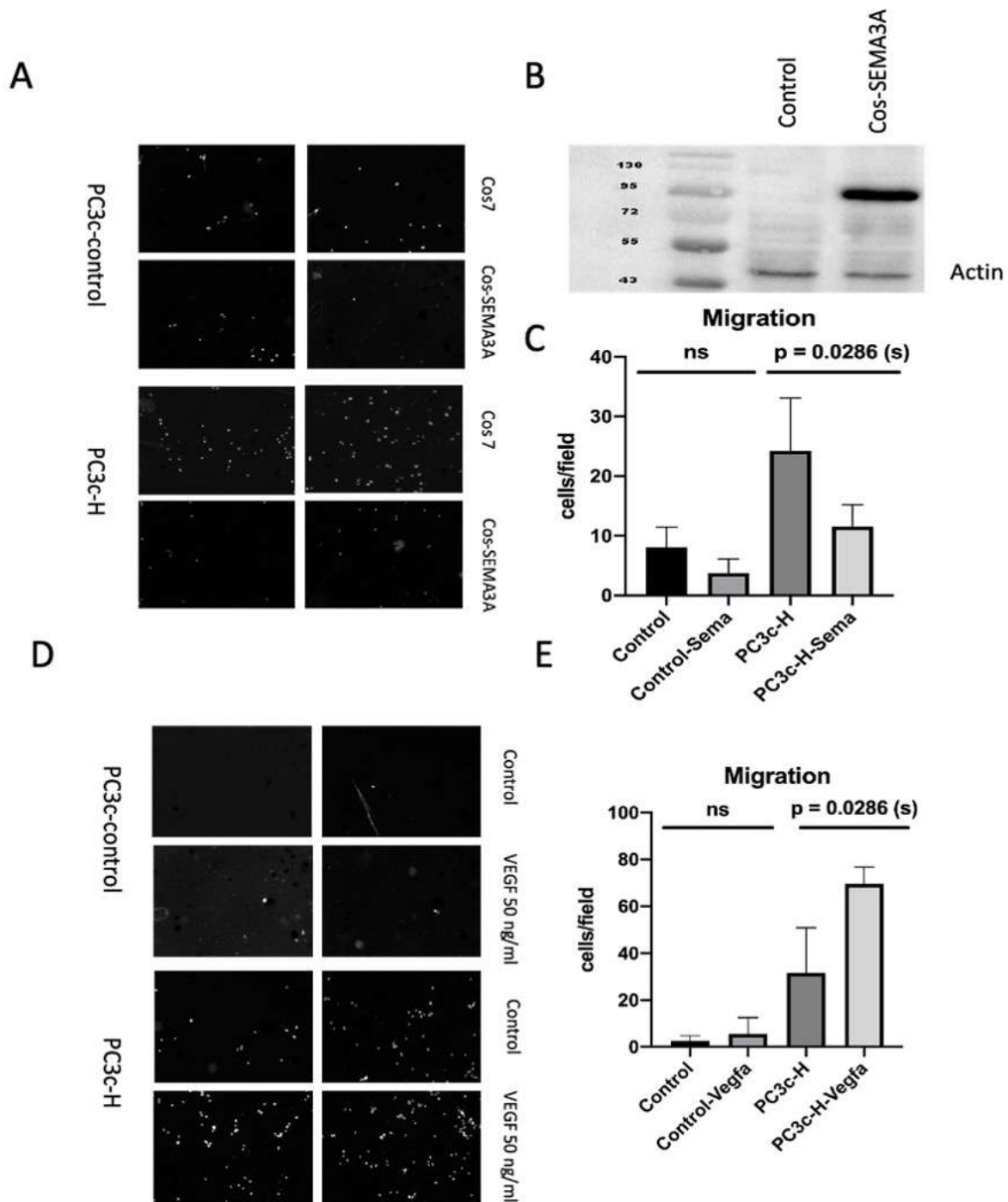
**Figure 23 : Expériences d’immunofluorescences montrant PLXNA2 (en rouge) et NRP1 (en vert) en présence de leurs ligands. A : culture des cellules avec SEMA3A (80ng/ml, « starved cells » 2h), et B : culture des cellules avec VEGFA (50 ng/ml, « starved cells» 2h). DAPI : marqueur de l’ADN, Merge : fusion des images.**

**Au final, ces modifications de localisations cellulaires en présence des ligands SEMA3A, et VEGFA, suggérées en Immunofluorescences n’ont pas été formellement démontrées. Il faudrait, pour ce faire réaliser des expériences de ligation de proximité (Proximity Ligation Assay : Duolink®)**

## L. Rôle fonctionnel en migration et invasion de l'axe NRP1 en rapport avec ses ligands respectifs.

Nous avons dans un deuxième temps cherché à étudier l'impact fonctionnel de la présence de ligands de NRP1, SEMA3A ou VEGFA, sur la migration et invasion cellulaire. Pour ce faire nous avons utilisé des cellules Cos7, transfectées avec un vecteur SEMA3A afin de parvenir à une sécrétion de SEMA3A de manière « physiologique ». A contrario, afin d'étudier le rôle du ligands VEGFA, les concentrations de VEGFA utilisées pour la culture des cellules PC3c étaient mieux décrites dans la littérature (Nilsson et al., 2010).

Premièrement, on distingue une diminution de la migration cellulaire matérialisée par le comptage des noyaux, en cas de sécrétion de SEMA3A par les cellules Cos7 (Figure 24A). Les cellules Cos7 transfectées SEMA3A expriment la protéine SEMA3A (Figure 24B). Cette migration des cellules PC3C-H a diminué de manière significative avec le SEMA3A ( $p = 0,0311$ ) (Figure 24C). En revanche, en présence de VEGF-A, on a constaté une augmentation significative de la migration (Figure 24D, 24E).



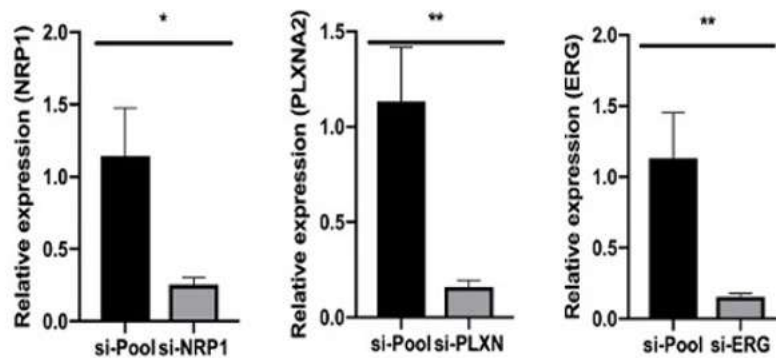
**Figure 24 : Expériences de migration en Transwell® avec cellules PC3c-H versus contrôle mis en contact avec des ligands de NRP1.**

Pour SEMA3A, Cos7 transfectées ou non. A : Comptage cellulaire des noyaux lors de la migration en Transwell® B : Western Blot de SEMA3A dans les Cos7 contrôle versus les Cos7-SEMA3A. C : Représentation en histogramme de la migration par comptage cellulaire dans les expériences de Transwell®, unpaired t test. Ns : non significatif, s : significatif.

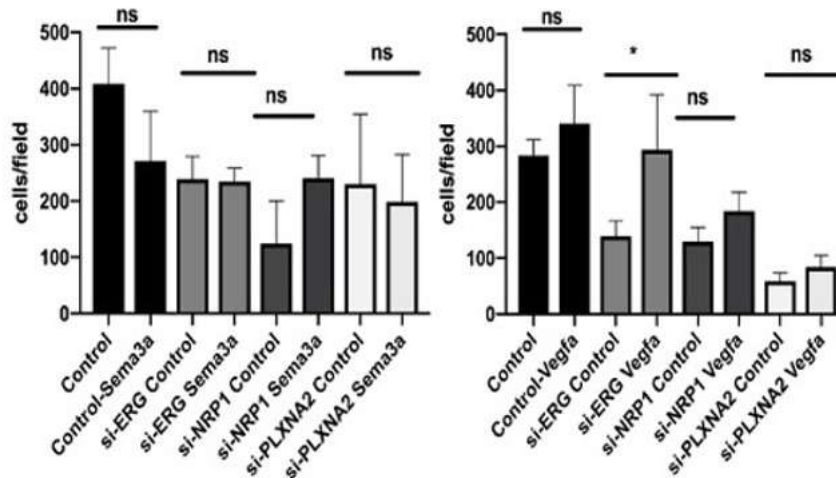
Pour VEGFA, mis en contact sérum contenant VEGFA à la concentration de 50 ng/mL. D : Comptage cellulaire des noyaux lors de la migration en transwell E : Représentation en histogramme de la migration par comptage cellulaire dans les expériences de Transwell®, unpaired t test. Ns : non significatif, s : significatif.

La migration ne dépend pas d'une seule interaction ligand-récepteur car dans les expériences de migration représentées ci-dessous, lorsqu'un si-ARN efficace est réalisé, qu'il soit si-ERG, si-NRP1, si-PLXNA2 (Figure 25A), il n'y a pas de variation significative de la migration par rapport au contrôle (Figure 25B).

**A**



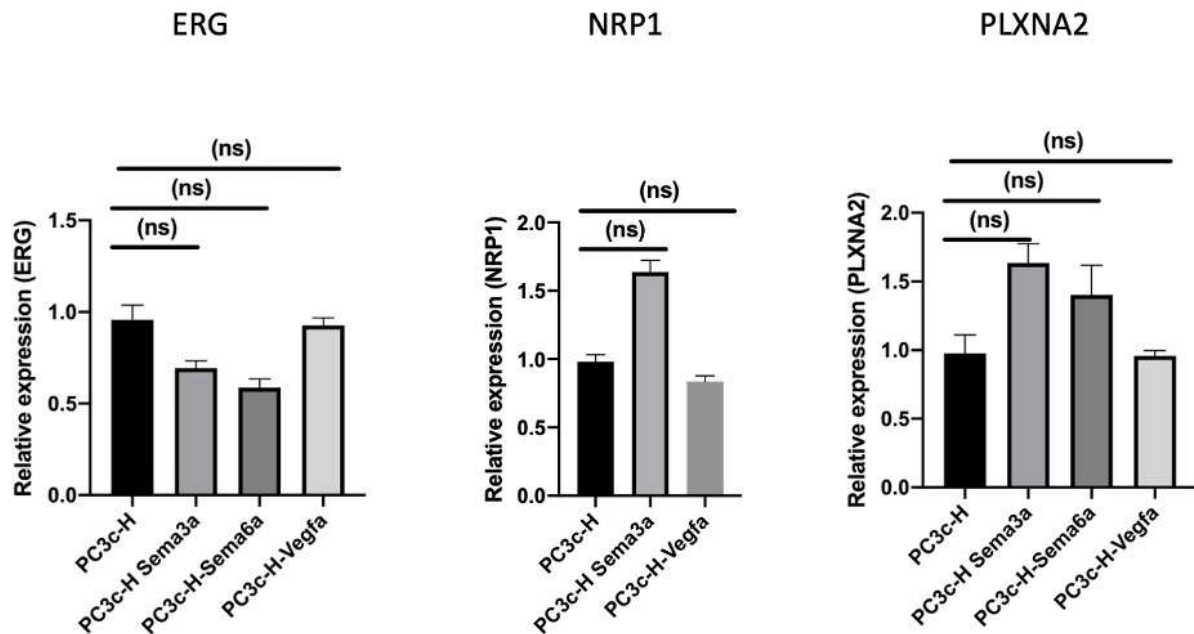
**B**



**Figure 25 : Impact des extinctions de gènes par Si-NRP1, Si-PLXNA2 et Si-ERG sur la migration d'un modèle cellulaire PC3c-H avec présence de la fusion *TMPRSS2:ERG* co-cultivées avec les ligands de NRP1.**

Expériences de migration en Transwell® d'un modèle cellulaire PC3c avec présence de la fusion *TMPRSS2:ERG* co-cultivées avec SEMA3A (80ng/mL), VEGFA (50 ng/mL) versus DMEM 10% Sérum Fœtal de Veau. Les cellules ont été respectivement cultivées dans deux conditions : transfectées avec un siNRP1, siPLXN, siERG versus contrôle. A : Résultats pour l'efficacité des siRNA. B : Représentation en histogramme de la migration par comptage cellulaire dans les expériences de Transwell®, unpaired t test. Ns : non significatif, s : significatif.

De même, en RT-qPCR, le suivi de l'expression des différents gènes *NRP1*, *PLXNA2* et *ERG* dans les cellules PC3c-H ne varie pas de manière significative en fonction de la présence ou de l'absence de ligands SEMA3A ou VEGFA (Figure 26). Cette interaction NRP1/ligands ne dépend pas de la transcription des gènes en raison de la présence de la fusion *TMPRSS2:ERG*.



**Figure 26 : Expression ARNm des gènes ERG, NRP1 et PLXNA2 dans les cellules PC3c-H (haute expression de la fusion T1E4) en fonction de la présence ou non des ligands de NRP1, SEMA3A ou VEGFA.** Expériences de RT-qPCR des gènes ERG, NRP1 et PLXNA2 à partir d'ADN extrait de cellules PC3c-H cultivées avec respectivement SEMA3A (80 ng/mL), SEMA6A (80 ng/mL) et VEGFA (50 ng/mL) versus contrôle.

**Le rôle fonctionnel de NRP1 en lien avec ses ligands et son partenaire PLXNA2 dans les phénomènes de migration et invasion reste à démontrer.**

M. Conclusion de la première partie

Nous sommes partis, au début de mon projet de thèse de l'hypothèse que l'expression de la fusion *TMPRSS2:ERG* déséquilibre la signalisation plexine/neuropiline/semaphorine pour contribuer à la progression du cancer de la prostate .

Le lien fonctionnel entre ERG, PLXNA2 et NRP1 n'a pas été formellement démontré. Néanmoins, nous avons pu mieux caractériser *NRP1*, gène cible de AR, ré-exprimé en phase de résistance à la castration et pouvant être impliqué dans l'évolution neuroendocrine des cancers de la prostate (Figure 27).

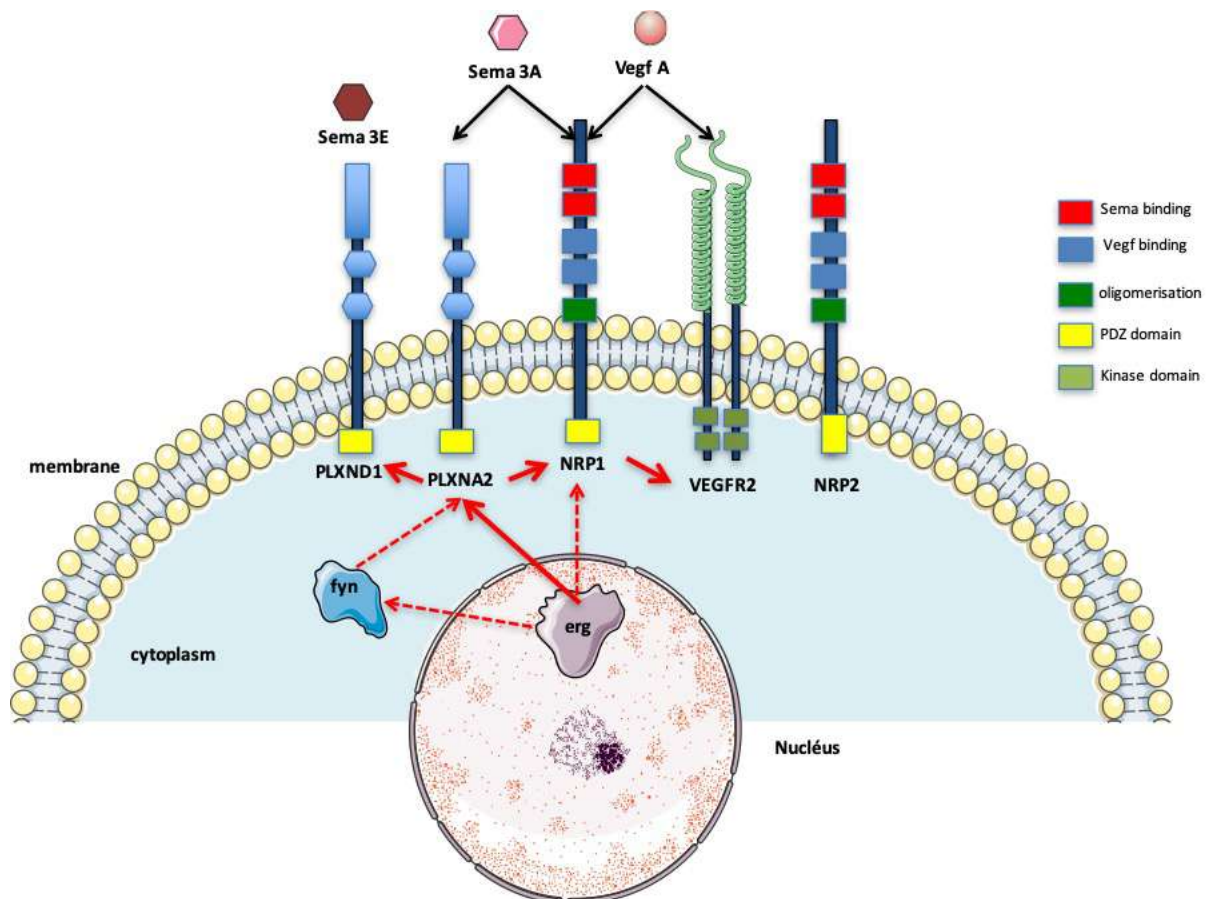


Figure 27 : Hypothèses de déséquilibre de la signalisation impliquant les acteurs du guidage axonal Plexine/Neuropilines/Sémaphorines dans les cancers de la prostate exprimant la fusion *TMPRSS2:ERG*.





## II. DEUXIEME PARTIE : GENE *FASCINE-1* IMPLIQUE DANS LA CANCEROGENESE PROSTATIQUE

Parmi les gènes identifiés lors de l'étude transcriptomique réalisé antérieurement par l'équipe, à partir de clones cellulaires prostatique du modèle PC3c surexprimant la fusion *TMPRSS2:ERG* de manière stable, le gène *Fascin 1 (FSCN1)* a été sélectionné (Tian et al., 2014).

La FSCN1 est une protéine globulaire de 55kDa, conservée au cours de l'évolution, qui présente deux sites de liaison à l'actine lui permettant de lier étroitement les filaments d'actine. C'est donc un régulateur clé du cytosquelette. Elle intervient dans les interactions et la mobilité cellulaire par la formation de protrusions membranaires telles que les dendrites, les microvillosités ou les lamellipodes. Elle est normalement exprimée dans les cellules endothéliales, le tissu nerveux, les dendrites mais très peu dans les tissus épithéliaux sains. Une expression faible est décrite au niveau des tissus cutanés, de l'œsophage et du col utérin (Zhang et al., 2008; Hashimoto et al., 2005). Au cours du développement embryonnaire, son expression est également marquée au niveau des régions de différenciation et de migration cellulaire (De Arcangelis et al., 2004).

Dans les cancers, son rôle pronostic avait déjà été montré dans plusieurs localisations puisque la présence de la protéine FSCN1 dans les tissus cancéreux de l'ovaire ou du côlon est associée à un plus fort potentiel invasif et une plus grande agressivité (Tan et al., 2013; McGuire et al., 2019). Les études physiologiques ont montré que la FSCN1 était impliquée dans le développement de structures membranaires particulières, appelées invadopodes, jouant un rôle dans l'invasion tumorale (Murphy & Courtneidge 2011). Ces structures sont composées d'un étroit réseau d'actine liées par la FSCN1, sont riches en métalloprotéases et possèdent la capacité de dégrader la matrice extra-cellulaire, permettant ainsi la diffusion métastatique.

La deuxième partie des résultats de la Thèse concerne l'étude du gène *FSCN1*, impliqué dans la migration cellulaire tumorale via la formation d'invadopodes, dans la cancérogenèse prostatique. Les résultats présentés dans les pages suivantes correspondent à la préparation d'un article original en anglais, qui sera soumis prochainement dans la revue à comité de lecture *Oncogene* (IF 7.9)

## **Titre**

Fascin-1 gene expression is directly suppressed by androgen receptor and associated to neuroendocrine prostate cancer

## **Running head**

Fascin-1 in neuroendocrine prostate cancer

## **Authorship :**

**Anthony Turpin<sup>1</sup>, Pauline Parent<sup>1</sup>, Hortense Chevalier<sup>1</sup>, Carine Delliaux<sup>1</sup>, Nathalie Vanpouille<sup>1</sup>, Anne Claire Flourens<sup>1</sup>, Xavier Leroy<sup>1,2</sup>, Tristan Lanel<sup>1,2</sup>, Arnaud Villers<sup>1,3</sup>, Jonathan Olivier<sup>1,3</sup>, Franck Bonardi<sup>4</sup>, Hélène Touzet<sup>4,5</sup>, Anne Chotteau-Leli evre<sup>1</sup>, Yvan de Launoit<sup>1</sup>, Tian V Tian<sup>1,6</sup>, Martine Duterque-Coquillaud<sup>1</sup>.**

1-Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020–UMR-S 1277, CANTHER – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, 59000 Lille, France.

2-Institut de Pathologie, CHU Lille, Avenue Oscar Lambret, F-59000 Lille, France

3-Department of Urology, Hospital Claude Huriez, CHRU Lille, France; Université de Lille Faculté de médecine Henri Warembourg, Lille, France.

4- Bilille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

5-CNRS, Univ. Lille, Inria, UMR 9189 - CRIStAL - Centre de Recherche en Informatique Signal et Automatique de Lille, Lille, France.

6-Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain.

Corresponding author: Martine Duterque-Coquillaud

**Keywords :** Prostate cancer, Neuroendocrine phenotype, Fascin1

Abstract (250 words max)

The neuroendocrine prostate cancer (NEPC) is an aggressive form of the disease, arising from resistance to androgen-deprivation therapies (ADT). However the molecular mechanisms associated with NEPC development and invasiveness are still poorly understood. Here we demonstrate that Fascin1 (FSCN1), the pro-metastasis actin-binding protein associated with poor prognostic of several cancers, is upregulated during neuroendocrine differentiation *in vitro*, corresponding to phenotypical changes and NEPC marker expressions. Importantly, in human prostate cancer samples, FSCN1 expression is restricted to NEPC tumors. During prostate cancer progression, androgen receptors (AR), known to play essential roles, acts either as a transcriptional activator or as a repressor. Using AR-dependent prostate cell lines, we successfully showed that the androgen-activated AR down-regulates FSCN1 expression and works as a transcriptional repressor of FSCN1. Moreover, AR antagonists alleviate this repression. Next, using mechanistic studies, we showed that AR directly suppresses FSCN1 expression suggesting a mechanism of AR-dependent control of NEPC differentiation. In addition, FSCN1 silencing further impairs aggressive and invasive cellular behavior assessed by migration and invasion *in vitro*. Collectively, our findings identify FSCN1 as a new mediator of NEPC aggressiveness and as a marker of invasiveness.

## INTRODUCTION:

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer in males worldwide. The early detection of the disease and the local therapies, with surgical and radiation treatments, has improved the overall survival of PCa patients. However, the majority of mortality is caused by metastatic progression of the disease. Since PCa is driven by androgen through androgen nuclear receptor (AR), androgen deprivation therapy (ADT) alone or combined with radio or chemotherapies has been used as treatment. However, despite the initially high response rate to ADT, nearly all patients evolve to castration resistance prostate cancer (CRPC) associated with poor prognosis (Watson et al., 2015; Attard et al., 2016). Patients with CRPC develop resistance owing to multiple molecular mechanisms such as increased androgen biosynthesis in the tumor microenvironment, alterations of AR signaling including AR mutations, AR variants constitutively active in absence of ligand, AR gene amplifications, use of other signaling pathways or reliance on non-AR mediated pathways (Watson et al., 2015; Karantanos et al., 2015; Nuhn et al., 2019). Finally, a small proportion of CRPC tumoral cells acquires a neuroendocrine phenotype with neuronal marker expression including chromogranin A (CgA), synaptophysin (SYP) or neuro-specific enolase (NSE) (Oberge et al., 2015; Terry & Beltran 2014).

Neuroendocrine prostate cancer (NEPC), rarely arising *de novo*, is a highly aggressive form of PCa with proliferative area of tumor mass and metastasis progression (Rickman et al., 2017; Aggarwal et al., 2014). The origin of NEPC has been suggested to arise from a selection pressure of ADTs inducing neuroendocrine trans-differentiation of CRPC cells (Zou et al., 2017; Abrahamsson, 1996; Burchardt et al., 1999). A hallmark of NEPC is the loss of AR signaling during neuroendocrine transdifferentiation, resulting in resistance to ADT (Hu et al., 2015). Therefore, with the introduction of AR-targeted therapies, such as enzalutamide, a second-generation non-steroidal AR inhibitor (Tran et al., 2009), the incidence of NEPC is expected to increase (Beltran et al., 2012; Bluemn et al., 2017).

In our previous studies, showing the role of the *TMPRSS2:ERG* fusion gene, one of the most frequent genomic rearrangement in PCa, we identified a series of genes involved in metastasis progression (Tian et al., 2014; Deplus et al., 2017; Delliaux et al., 2018). Among the identified genes, we selected the *fascin-1 (FSCN1)* gene originally identified as a gene which encodes an actin-binding protein known to stabilize filopodia and invadopodia by regulating the parallel bundling of actin filaments (Yamashiro et al., 1998; Li et al., 2010). FSCN1 is a key regulator of cell cytoskeleton remodeling which drives cell adhesion, migration and invasion (Kureishy

et al., 2002). FSCN1 is not expressed in most adult human epithelia but high FSCN1 expression has been associated with increased mortality in breast, ovarian, colorectal, pancreatic carcinomas and metastasis (Hashimoto et al., 2005; Pelosi et al., 2003; Tan et al., 2013; Li et al., 2014).

In PCa, FSCN1 expression has been reported in PCa stromal cells in high Gleason score tumors (Jefferies et al., 2017) and in tumor cells in a CRPC sample (Darnel et al., 2009). In addition, only some ERG-positive tumors had high FSCN1 score without statistical significance (Jefferies et al., 2017). Therefore, it was of interest to assess *FSCN1* implication in PCa progression. In this study, we report that *FSCN1* gene is repressed by AR in androgen-dependent cell lines. Moreover, *FSCN1* expression, absent in primary PCa, is detected in NEPC tumors and could be involved in tumor progression.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cell lines and treatments**

Human prostate cancer cell lines VCaP, LNCaP, MDA-PCA-2b, DU145 and PC3 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cell lines were grown in appropriate media as recommended by ATCC supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PC3M-luc-C6 (PC3M-luc) cell lines were purchased from Caliper (Perkin Elmer). PC3c cell line was obtained from Edith Bonnelye and cultured as described by Fradet et al. (Fradet et al., 2013). PC3c clones, stably transfected with either empty pcDNA3.1 vector or *TMPRSS2:ERG* expression vector, were obtained as described previously (Tian et al., 2014). All cells were sub-cultured every 3-4 days and maintained in a humidified incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were not used beyond fifteen passages, they are tested for Mycoplasma contamination with MycoAlert™ mycoplasma detection kit every six months (Lonza, Basel, Switzerland). To activate the androgen receptor, VCaP and LNCaP cells were respectively treated with 100nM and 10nM of dihydrotestosterone (DHT, Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) during 2 or 16 hours after being starved in hormone with charcoal-stripped serum containing medium during 8 hours. The activity of androgen receptor was inhibited by 50µM of bicalutamide (BIC) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

### **Transfection of constructs or siRNA in PC3c and LNCaP cells**

Pre-designed and pooled siRNAs (siFSCN1: ON-TARGETplus Human FSCN1 siRNA) and the control siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Pool D001810-10) were obtained from GE Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Cells were transfected with the siRNA (50 nM) using Lipofectamine 2000 reagent (ThermoFisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instructions. Gene-knockdown or overexpression effects were evaluated 72 hours after the transfection. Transient overexpression experiments were performed by cell transfection with the AR expression plasmid (PSG5-AR) (4 $\mu$ g) or with the empty vector (PSG5) using Lipofectamine 2000 reagent.

### **RNA extraction and gene expression analysis**

Total RNA was extracted from cells using the NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. For retrotranscription, 1  $\mu$ g of total RNA was used to generate cDNA using the High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real time 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. All reactions were normalized to human 18S and L32 genes and run in triplicate. 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.

### **Western blotting and ChIP**

Cells proteins were extracted, separated in 4 to 10% SDS-Page. After migration, samples were transferred by electrophoresis to PVDF Membrane (Transfert-blot Turbo Transfer system, Bio-RAD, Hercules, CA, USA). Membrane was incubating with blocking buffer during 3 hours, then with primary antibody over the night. Sections were incubated with secondary antibody HRP-conjugated during 1 hour. After washing, the sections were revealed by Clarity™ Western ECL substrate (Bio-RAD, Hercules, CA, USA). Antibodies used were as follow: anti-FSCN1 (ab126772, Abcam Epitomics, Cambridge, UK), anti-AR (sc-816, N-20 Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA), anti-vinculin (Invitrogen VIN-01, ThermoFisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and anti- $\beta$ -actin (Clone AC-15, Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA).

ChIP assays were performed as described (Delliaux et al., 2018) using either a polyclonal rabbit anti-AR antibody (AR sc-7305, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA) or a control rabbit IgG

antibody (Rabbit DA1E Ab IgG XP®, Cell Signaling technology, Danvers, Massachusetts, 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 qPCR, and the primers used in this study can be found in Supplementary Table S2.

### **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). As described in Tian et al. (Tian et al., 2014), these tumor tissue samples, which had been extracted and subsequently frozen, originated from radical prostatectomies or trans-urethral prostatic resections performed at Lille University Hospitals (CHU de Lille). All patients were informed and consent was obtained by the referring physician.

### **Bioinformatic analysis of expression**

To analyze *FSCN1* mRNA expression levels in PCa, metastasis, CRPC and NEPC samples, expression microarray data were downloaded from GEO database with accession numbers GSE6919, GSE35988, GSE8511, GSE3325. We obtained the data from Beltran et al. by using cBioPortal for Cancer Genomics database (<http://www.cbioportal.org>). Specifically, we selected the cohort named “Neuroendocrine Prostate Cancer (Trento/Cornell/Broad)”.

To determine the recruitment of AR on *FSCN1* promoter, we analyzed publicly available ChIP-Seq data (GSE32345, GSE28126) for AR binding in untreated or DHT- or BIC-treated VCaP cells (Asangani et al., 2014, Sharma et al., 2014, Chng et al., 2012 and Pomerantz et al., 2015). The call of peaks had already been realized, allowing us to access the sequence of fragments immunoprecipitated by the AR antibody. We selected the peak sequences corresponding to the *FSCN1* gene. Tracks from the human ENCODE project for H3K27Ac and H3K4Me1 marks, often found near regulatory elements, H3K4Me3 marks, often found near promoters, as well as DNase I hypersensitivity peak clusters have been added. The potential positions of the AR binding sites in the hg19 version of the human genome were then calculated bioinformatically. For this, we used the JASPAR 2018 database and the HOMER suite for AR (ARE).

### **Immunohistochemistry and immunofluorescence**

Immunohistochemistry of human and mouse tissue sections was performed using anti-FSCN1 (ab126772, Abcam Epitomics, Cambridge, UK) at 1/100. Sections were incubated with

secondary HRP-conjugated antibody. Counterstaining was performed using Mayer's hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany).

Immunofluorescence assays were performed as described in Tian et al. (Tian et al., 2014). The antibodies used in this study were anti-FSCN1 (ab126772, Abcam Epitomics, Cambridge, UK) at 1/100, Alexa Fluo-488 conjugated anti-rabbit IgG (Invitrogen, dilution 1:500). Images were acquired using an LSM 710 confocal microscopy system and ZEN 2010 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

### **Fluorescent gelatine degradation assay**

Poly-D-lysine-coated coverslips were washed with PBS and fixed with 0.5% glutaraldehyde for 15 min. Then, the coverslips were inverted on a 30 $\mu$ l drop of gelatin conjugated with FITC (fluorescein, G13187 Invitrogen, Thermofisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and incubated for 15 min. After washing with PBS, the residual reactive groups were quenched with 5 mg/ml sodium borohydride for 3 min and washed with PBS. Cells were plated in 24-well plates containing a coverslip coated with fluorescent gelatin matrix and incubated at 37°C. After 10h, cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 1% BSA with 10% normal goat serum, 0.3mM glycine and 0.1% TBS-Tween. Then, cells were labeled for filamentous actin with Alexa Fluor 555 phalloidin (8953S, Cell Signaling technology, Danvers, Massachusetts, USA) and Hoescht (H33258, Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA). Confocal images were acquired using the Olympus FV500 confocal laser scanning microscope and FluoView software (Olympus). Sites of degraded matrix were visible as dark areas (spots) in the bright green fluorescent gelatin matrix.

### **Migration and invasion assays**

Cell migration assays and cell invasion assays in matrigel were performed using Transwell Boyden chamber of 8 $\mu$ m pore size (Corning, NY, USA). The 24-wells upper chambers were seeded with 500 000 cells labeled with 2  $\mu$ g/ml DilC12(3) fluorescent dye (BD Biosciences), per well, in triplicate, in serum free medium. The bottom chamber was supplemented with cell culture media with 10% FBS. After 24h, the migrated or invaded cells were fixed with 4% paraformaldehyde and counted in 5 independent fields using an Axio Scan.Z1 slide scanner and ZEN (Blue edition) 2012 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). We performed a second assay using a FluoroBlok 8-mm pores 24-well insert system (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) and 24-well BioCoat Tumor or Invasion System (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. After 24 h of incubation, cells were labeled with 10 mg/ml



DilC12(3) fluorescent dye (BD Biosciences), and the migrated or invaded cells were measured using a FLUOstar OPTIMA lecturer (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Representative pictures were captured.

### **Statistical analysis and Image treatment**

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.

All image treatments were carried out using Image J.

## **RESULTS:**

### **1-FSCN1 expression in PCa cells is suppressed by androgens**

Using an AR-independent cell line, PC3c derived from PC3 cell line, we previously identified a series of genes potentially involved in cell migration and invasion properties (Tian et al., 2014). Among these genes, we showed that *FSCN1* was highly expressed in PC3c clones, our cellular model which stably expressed ERG-T1E4 fusion (Fig.1a). Moreover, the silencing of *FSCN1* diminished the migration properties of the PC3c-T1E4 cells *in vitro* (Fig. S1). We then explored the *FSCN1* expression in various PCa cell lines (Fig. 1c). Interestingly, except in PC3c cell line, *FSCN1* turned out to be highly expressed in the cell lines that have lost AR signaling (Fig. 1c) such as PC3, PC3-M-luc and DU145, but not in any of the androgeno-dependent cell lines such as LNCaP, MDA-PCa-2b and VCaP, suggesting that AR could play a role in *FSCN1* expression. In order to confirm the androgen inhibition of *FSCN1* expression, we performed quantitative RT-PCR and Western blot analyzes of VCaP cells treated with either 100nM of DHT alone or with the added antagonist Bicalutamide (BIC), for 0, 2 and 16h (Fig. 1d). We used *PSA* (Prostate Specific Antigen), known to be an AR target gene, as a positive control and successfully showed that DHT treatment, which is known to activate AR, is associated with a decrease of *FSCN1* expression at both mRNA and protein levels. This inhibition was partially recovered by a BIC treatment. Moreover, the transient overexpression of AR in PC3c-T1E4 cells decreased *FSCN1* transcriptional expression and, to a lesser extent, FSCN1 protein after 48h post-transfection (Fig. 1b). These data showed that androgen inhibits *FSCN1* expression through the AR signaling.

### **2-FSCN1 is upregulated in NEPC**

To gain insights into the potential role of *FSCN1* in PCa, we first examined *FSCN1* expression in a series of human primary prostatic cancer (n=52) and compared with normal prostate tissues (n=20). No significant difference was observed between these two groups of samples (Fig. 2a). Then we further investigated the *FSCN1* expression in normal, primary and metastatic PCa cohort using published datasets (Fig. 2b). *FSCN1* expression appeared to be unrelated to primary PCa and whether *FSCN1* could be associated with metastatic PCa remains unclear. Therefore, we analyzed *FSCN1* expression in published transcriptomic datasets from four independent PCa cohorts (Abida et al., 2019; Grasso et al., 2012; Kumar et al., 2016; Beltran et al., 2016). As shown in Fig. 2b, compared with normal or primary PCa samples, *FSCN1* expression levels were significantly higher in the metastatic PCa. This suggests its potential role in metastasis. Using a cBioportal analysis (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013) of 13 PCa publicly available dataset (5987 samples/5742 patients) (Abida et al., 2017; Ren et al., 2018; Armenia et al., 2018; Hieronymus et al., 2014; Taylor et al., 2010; Fraser et al., 2017; Barbieri et al., 2012; Baca et al., 2013; Abida et al., 2019; Grasso et al., 2012; Kumar et al., 2016; Beltran et al., 2016; TCGA Pan Cancer Atlas), where four datasets involved metastatic CRPC (Abida et al., 2019; Grasso et al., 2012, Kumar et al., 2016; Beltran et al., 2016), we also observed that *FSCN1* was mainly expressed in metastatic CRPC cohorts and particularly highly expressed in the only neuroendocrine tumor cohort (Beltran et al., 2016). As shown in Fig. 2c, the presence of *FSCN1* genomic alteration (i.e. mutation, amplification, deep deletions) is superior in neuroendocrine dataset versus other “non neuroendocrine” datasets of primary adenocarcinoma, most castrate-sensitive metastatic PCa (21% versus 0.5%), or CRPC (21% versus 6%). Furthermore, when we focused on the Beltran dataset (114 samples/81 patients) (Beltran et al., 2016), we observed that, in this advanced PCa dataset composed of CRPC samples (n=70) and strict NEPC samples (N= 44) (Fig. 2d), *FSCN1* expression was mainly detected in strict NEPC samples compared with CRPC samples. In accordance with our *in vitro* study where we observed that AR-negative cell lines express *FSCN1* and the analysis of the PCa datasets, we hypothesized that *FSCN1* could be expressed in NEPC. Therefore, we performed IHC on NEPC samples that expressed NE (neuroendocrine) markers such as Chromogranin-A (CgA) and Synaptophysin (SYP). Using primary prostate tumor samples, *FSCN1* was only detectable in blood vessel (Fig. 3a), result that we confirmed using two different antibodies. By contrast, we detected *FSCN1* protein in four distinct NEPC samples (Fig.3 b). These results showed that *FSCN1* is downregulated in poorly differentiated PCa and upregulated in NEPC.

### **3-Androgen deprivation triggers *FSCN1* expression in androgen sensitive cells**

Lineage plasticity in PCa has been linked to neuroendocrine differentiation involving transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. These mechanisms have been studied by androgen deprivation cell models (Yuan et al., 2006). To further demonstrate that *FSCN1* is associated to NEPC phenotype, we took advantage of a cell model consisting in androgen depleted culture of LNCaP and VCaP cell lines (Yuan et al., 2006). Using a phenol-red free medium and a charcoal stripped serum to remove androgens, we mimic androgen deprivation in culture. Compared with unstripped serum conditions, as a control (LNCaP), cells cultured during 14 to 21 days in androgen deprivation conditions (LNCaP-NE) expressed NEPC markers, such as ChromograninA (CgA) and Neural-specific enolase (NSE), and showed a strong decrease of PSA (Fig. 4a). Concomitantly, cells gradually developed elongated cytoplasmic protrusions, neurite-like structures, consistent to previous reports (Fig. 4b) (Yuan et al., 2006). These androgen deprivation conditions promotes neuroendocrine-like transdifferentiation of LNCaP and VCaP (Fig. 4a, c). Measured at 14 days of androgen deprivation culture, LNCaP-NE and VCaP-NE show a remarkable increase of *FSCN1* expression at both transcript and protein levels (Fig. 4d, e). These results support a plausible role of *FSCN1* in neuroendocrine differentiation.

To further study the *FSCN1* role in migration and invasion cell properties, we first used Boyden chamber assays in both standard or androgen deprivation culture conditions. We observed an increase of LNCaP-NE migratory properties compared with LNCaP cultured in standard conditions (Fig. 5a). This effect cannot be due to an increase of proliferation since LNCaP-NE proliferation decreases in androgen deprivation culture conditions (not shown), consistent with previous reports (Yuan et al., 2006). Conversely, *FSCN1* silencing using a specific si-RNA (si-FSCN1), led to a significant decrease of cell migration (Fig. 5a, b). These results have been confirmed using quantitative Fluoroblok assays (not shown). Secondly, using Boyden chamber Matrigel invasion assays, we observed a strong increase of LNCaP-NE invasion properties compared to control LNCaP cells (Fig. 5c). Once again, silencing of *FSCN1* expression using an efficient si-FSCN1 led to a decrease of invasion capacity of LNCaP-NE cells (Fig. 5c, d). Therefore, these results confirm a *FSCN1* role in migration and invasion of prostate neuroendocrine cells.

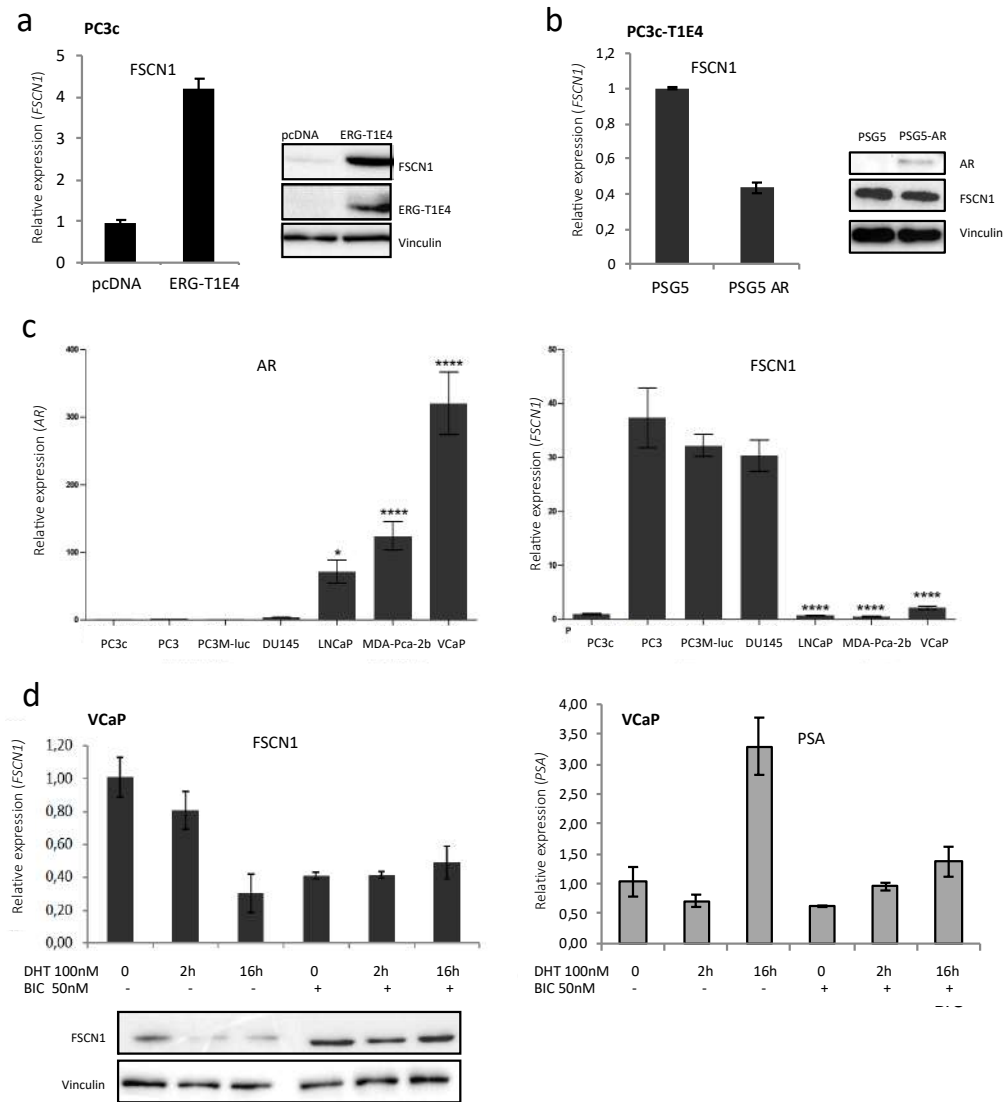
Finally, since *FSCN1* protein has been described as an important protein for invadopodia formation, which are crucial for tumor cell invasion in cancer progression, we evaluated the ability of LNCaP cells to form invadopodia under androgen deprivation cultures (Fig. S3a) (Murphy & Courtneidge, 2011 ; Machesky & Li, 2010). Cells were seeded on fluorescent

gelatin matrix for 6 to 10 hours. After cell fixation, matrix degradation was identified by appearance of dark areas where black holes correspond to invadopodia formation (Fig. S3). At the same time, F-actin and nucleus labeling, using Phalloïdin and Hoescht respectively, allowed to observe LNCaP-NE invadopodia formation in androgen deprivation culture condition. This remains to be quantified in comparison with the less invasive LNCaP cells in standard culture condition. In addition, *FSCN1* silencing assays are in progress to evaluate the *FSCN1* effect in LNCaP-NE cells.

#### **4-AR binds directly to the *FSCN1* regulatory sequence**

We next examined how the *FSCN1* gene expression is downregulated by an AR-mediated mechanism in PCa cells. We hypothesized that AR could transcriptionally repress *FSCN1* in VCaP cells by directly binding to ARE (Androgen Response Element) on the *FSCN1* gene (Fig. 4a). Since AR has been described both as a transcriptional activator as well as a repressor (Gristina et al., 2017), we look for the putative AREs in the *FSCN1* regulatory regions. We used available transcription factor prediction software (JASPAR) (Fig. 4a) and analyzed Chromatin Immunoprecipitation-Sequencing publicly datasets (ChIP-seq) for AR binding in androgen-stimulated VCaP and LNCaP cells (Fig.4b). We identified an androgen response element (ARE), located 6500bp upstream of the *FSCN1* transcriptional start site (Fig. 4ab). *KLK3* gene, known to be regulated by AR through its direct and specific DNA-binding, was used as a control of the analysis.

To test whether AR directly bound to the identified ARE of *FSCN1* regulatory gene, we performed ChIP-qPCR assays with DHT-stimulated VCaP cells for 2 and 16 h. Using five amplification fragments (Fig. 4a) covering the AR-predicted region, we showed an enrichment for AR binding at three fragments corresponding to three potential AREs (Fig. 4c). Promoter of *KLK3* was used as positive control. These data are consistent with a mechanism whereby AR could act as a direct transcriptional repressor of *FSCN1* expression, potentially associated to co-repressors, and androgen deprivation therapies (ADT) reduce *FSCN1* transcriptional repression resulting in its upregulation (Fig. 6d).



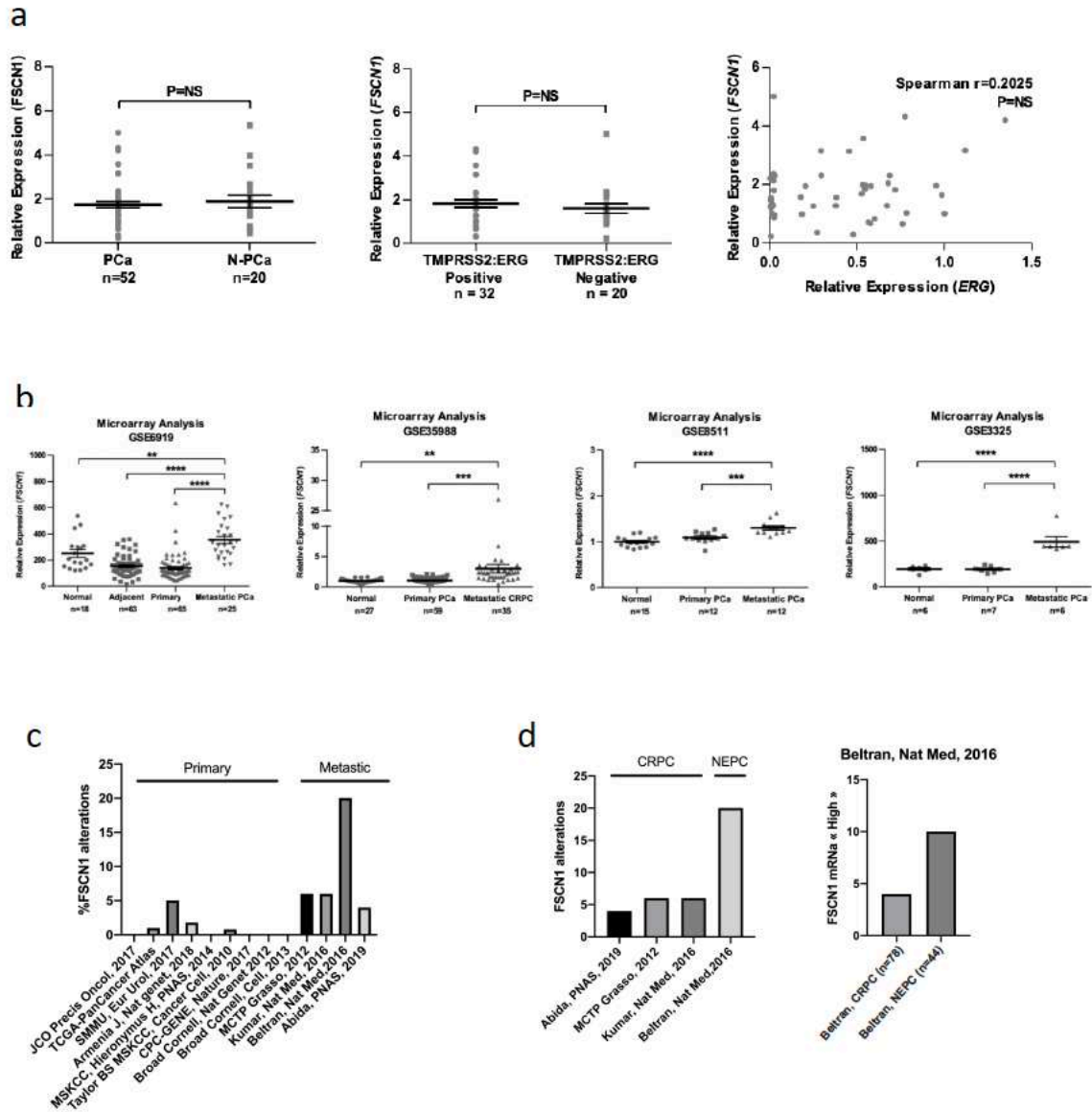
**Fig. 1. FSCN1 gene is down-regulated by the androgen receptor in VCaP cells.**

**a** RT-PCR showing *FSCN1* upregulation following stably ERG-T1E4 overexpression in PCaC compared with PC3c-pcDNA control cells. Data are normalized to *FSCN1* level in the control. The mean  $\pm$  SE of duplicate experiments completed in triplicate. Western blot validating expression of ERG-T1E4 and *FSCN1* in PC3c-T1E4 and control cells. Vinculin was used as loading control.

**b** RT-PCR showing *FSCN1* downregulation following AR overexpression using PC3c-T1E4 cells transfected with PSG5-AR or PSG5 vector control. Western blot validation of AR and *FSCN1* expression after 48h post-transfection in PCaC-T1E4 cells. Vinculin was used as loading control.

**c** RT-PCR evaluating expression levels of *FSCN1* (right panel) from multiple cell lines (PC3c- pcDNA, PC3, PC3M-Luc, DU145, LNCaP, MDA-Pca-2b, VCaP) where *AR* expression (left panel) was measured in parallel. \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison test. Data are normalized to *FSCN1* and *AR* level respectively in the PC3c cells.

**d** RT-PCR showing *FSCN1* expression in VCaP cells according to AR activation or repression respectively in the presence of DHT 100nM administered during 0, 2h and 16h and the presence or the absence of bicalutamide (BIC) 50 $\mu$ M. *PSA* expression (right panel) was a positive control of AR activation or repression in the same experiment. Western blot validating expression of *FSCN1* in VCaP cells. Vinculin was used as loading control.



**Fig. 2 Expression of *FSCN1* in human normal and cancerous prostate.**

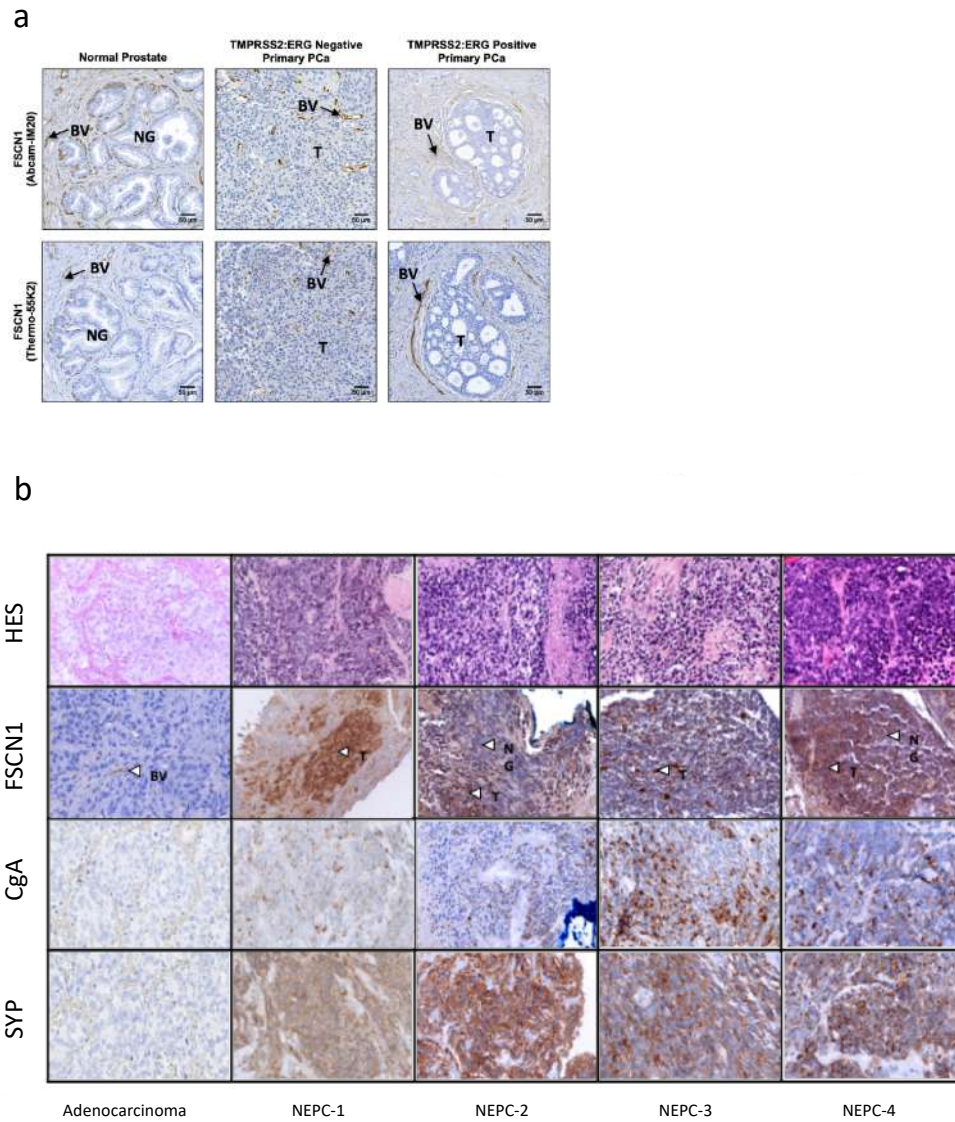
**a** Gene expression of *FSCN1* in prostate cancer tissue samples (PCa, n=52) and in normal prostatic samples adjacent to tumor (N-PCa, n=20) (left panel), in TMPRSS2:ERG positive (n=32) and -negative (n=20) prostate cancer samples (right panel) was evaluated using RT-qPCR in triplicate. Two independent experiments were performed. NS: no significance determined by two-tailed Mann-Whitney test. Scatter plot showing relative *FSCN1* mRNA expression and its corresponding ERG mRNA expression in primary PCa samples (n=52). Spearman  $r=0.2025$ , P=NS, two-tailed non parametric Spearman correlation test with  $\alpha=0.05$ .

**b** Comparison of *FSCN1* expression profile in normal prostate (Normal or Adjacent), primary prostate cancer (Primary PCa) and in metastatic prostate cancer (Metastatic PCa or CRPC) using the data set from GSE6919, GSE35988, GSE8511, GSE3325. \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ , one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test.

**c** *FSCN1* alterations in primary and metastatic prostate cancer samples from cBioPortal available datasets.

**d** *FSCN1* alterations in CRPC and NEPC samples from cBioPortal available datasets (left panel).

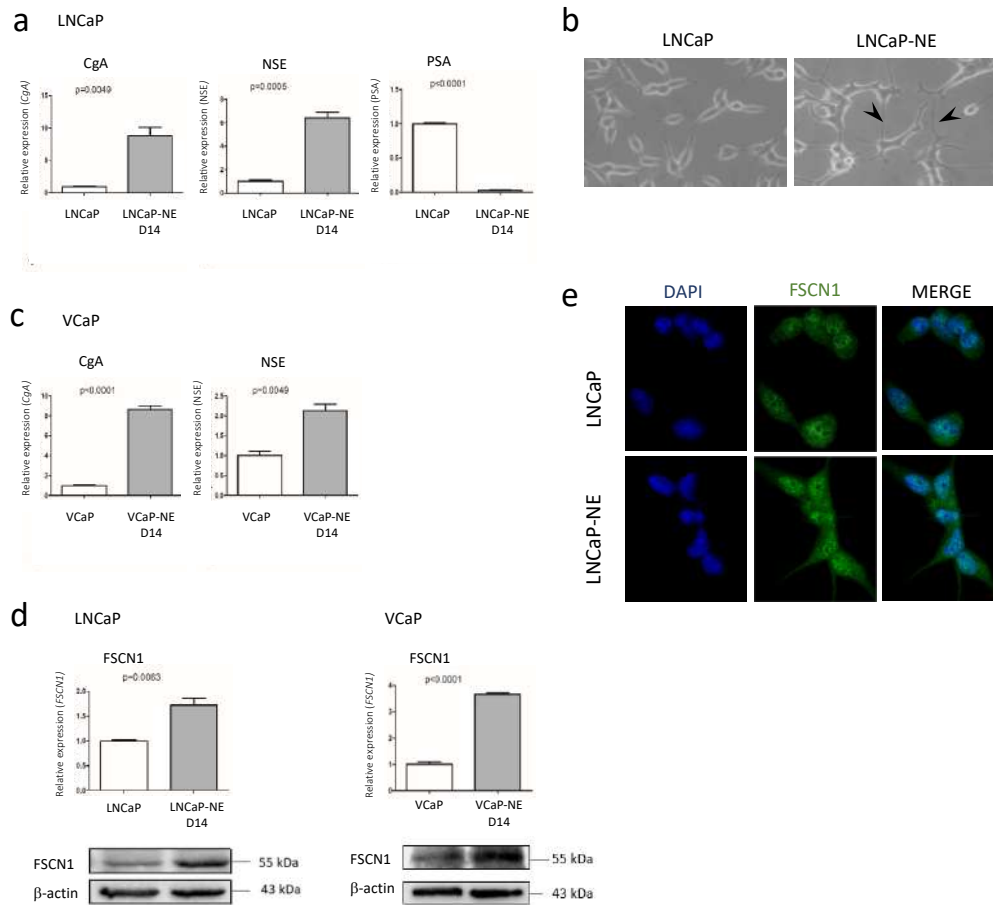
**e** *FSCN1* transcriptional expression profile in CRPC and strict NEPC samples from Beltran cohort (Beltran et al., 2016).



**Fig. 3 FSCN1 is highly expressed in human NEPC.**

**a** IHC staining was performed on normal prostate and primary PCa, TMPRSS2:ERG positive or negative, using two distinct antibodies against FSCN1 (Abcam-IM20 and Thermo-55K1). BV: blood vessels, NG: Normal glands, T: Tumor. Scale bar = 50µm.

**b** Representative images of FSCN1, CgA and SYP in Adenocarcinoma and NEPC tumors.



**Fig. 4 Androgen deprivation induces neuroendocrine-like phenotype and triggers FSCN1 expression**

**a** LNCaP cells are cultured 14 days with charcoal-depleted medium to induce neuroendocrine-like phenotype (LNCaP-NE). RT-PCR showing expression of neuroendocrine markers chromogranin (CgA) and neural-specific enolase (NSE). PSA expression is a control of androgen activity. Error bars indicate n=3, mean +/- s.e.m.

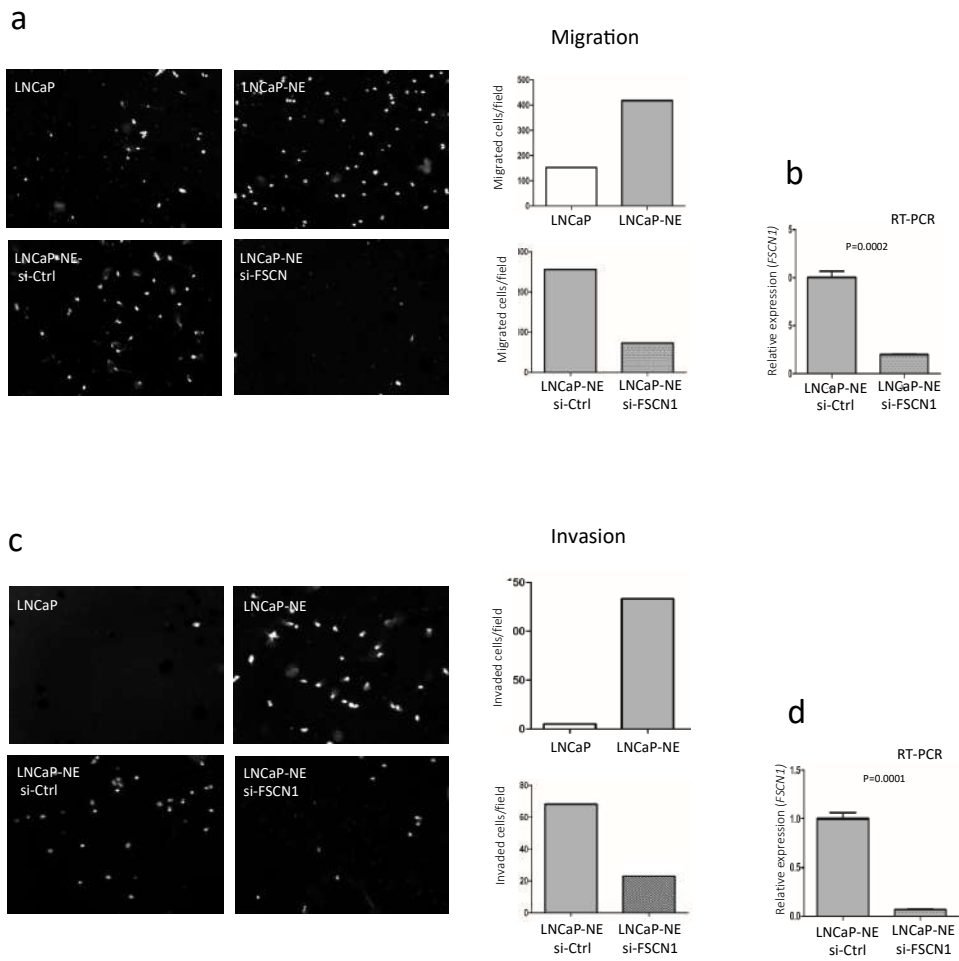
**b** Representative phase contrast microscopic images for LNCaP cells morphology cultured 14 days with normal medium (LNCaP) or cultured with charcoal-depleted medium (LNCaP-NE). Arrow heads indicate neurite-like cell structures.

**c** VCaP cells are cultured 14 days with charcoal-depleted medium to induce neuroendocrine-like phenotype (VCaP-NE). RT-PCR showing expression of neuroendocrine markers chromogranin (CgA) and neural-specific enolase (NSE). Error bars indicate n=3, mean +/- s.e.m.

**d** RT-PCR evaluating expression levels of *FSCN1* in LNCaP-NE (left panel) and in VCaP-NE (right panel), respectively p=0.0063 and p=0.0001, one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison test. Western blot validation of *FSCN1* expression cells. B-actin was used as loading control.

**e** Representative images of Immunofluorescent analysis of *FSCN1* expression in LNCaP and LNCaP-NE cells.



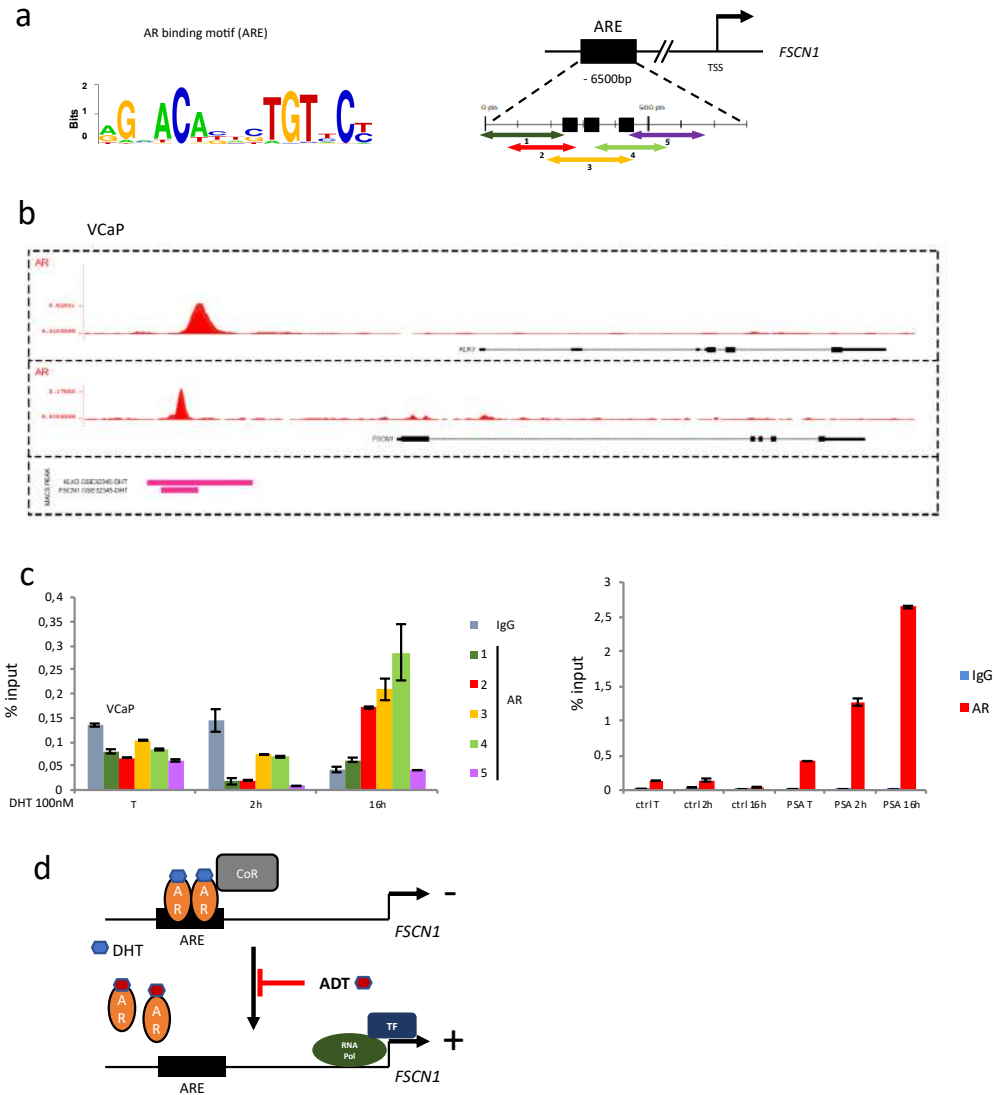


**Fig. 5 FSCN1 contributes to neuroendocrine-like LNCaP migration and invasion**

**a** Representative fields of view from migration assays.

**b, d** LNCaP-NE were treated with pooled control (Ctrl) or FSCN1-specific siRNA, and *FSCN1* gene expression was analyzed by RT-qPCR. The expression level in cells treated with control siRNA was normalized to 1.

**c** Representative fields of view from invasion assays.



**Fig. 6 AR protein binds to cis-elements of *FSCN1* gene.**

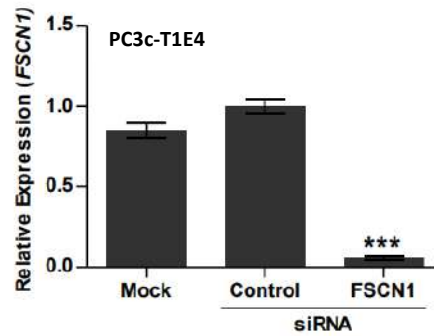
**a** Schema showing AR binding motif obtained from JASPAR database. Genomic location for the potential ARE (black boxes) on the *FSCN1* gene regulation domains (TSS : transcription start site) and location of the qPCR amplified fragments overlapping potential AREs of the peak.

**b** Genome browser representation of AR binding events in comparison with chromatin accessibility on cis-element of *FSCN1* gene. ChIP-seq profiles indicating AR enrichment on *FSCN1* and *KLK3* gene loci in DHT stimulated VCaP cells (GSE32345). Bottom panel indicates the peaks for AR-binding on the regulation region of *FSCN1* and *KLK3*.

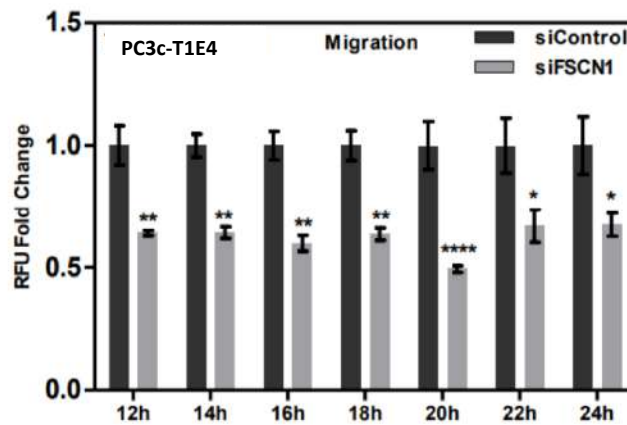
**c** ChIP-qPCR assay confirmation of AR binding on the *FSCN1* regulatory region in DHT stimulated VCaP cells using either anti-AR or anti-IgG antibodies. *KLK3* promoter was used as a positive control for the DHT-stimulation experiment, irrelevant region (Ctrl) was used as a negative control. Experiments were performed with n=3 biologically independent samples, data represents mean +/- SEM.

**d** Schema illustrating AR signaling mediated regulation of *FSCN1* gene transcription in prostate cancer. AR : Androgen receptor, DHT : Di-Hydroxy Testosterone, CoR : corepressor, ADT : Androgen deprivation therapy/AR antagonists, RNA Pol : RNA-Polymerase, TF : transcription factors.

a



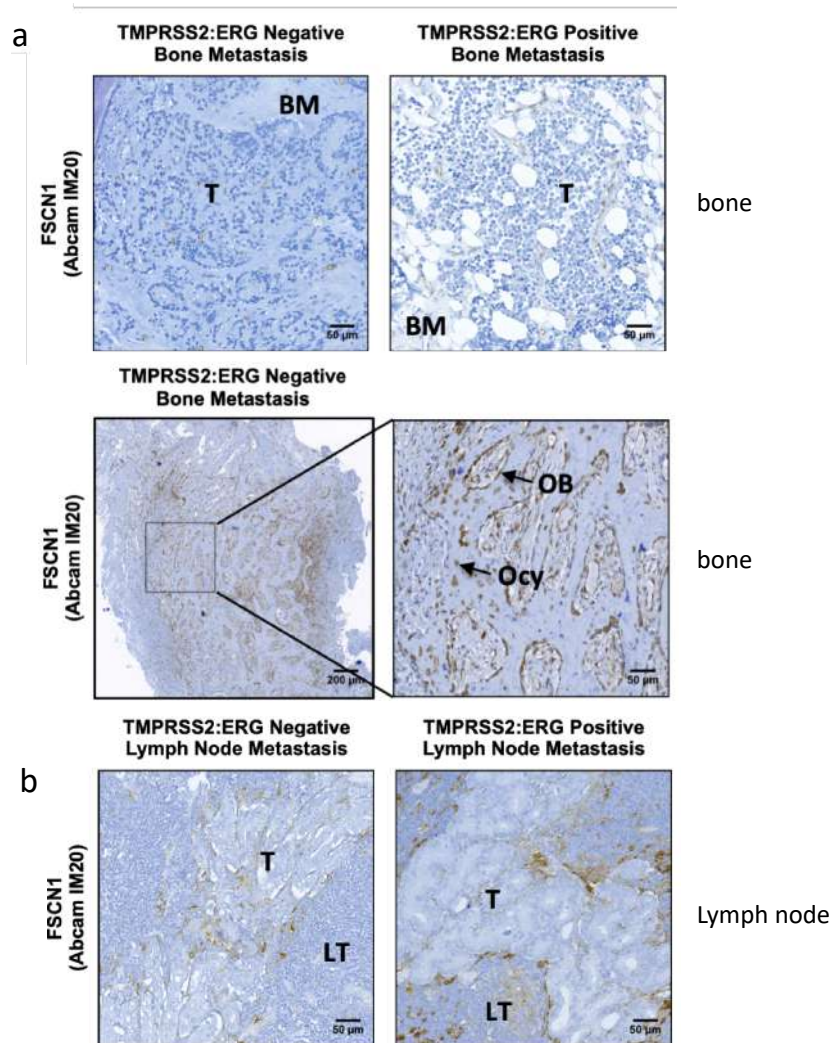
b



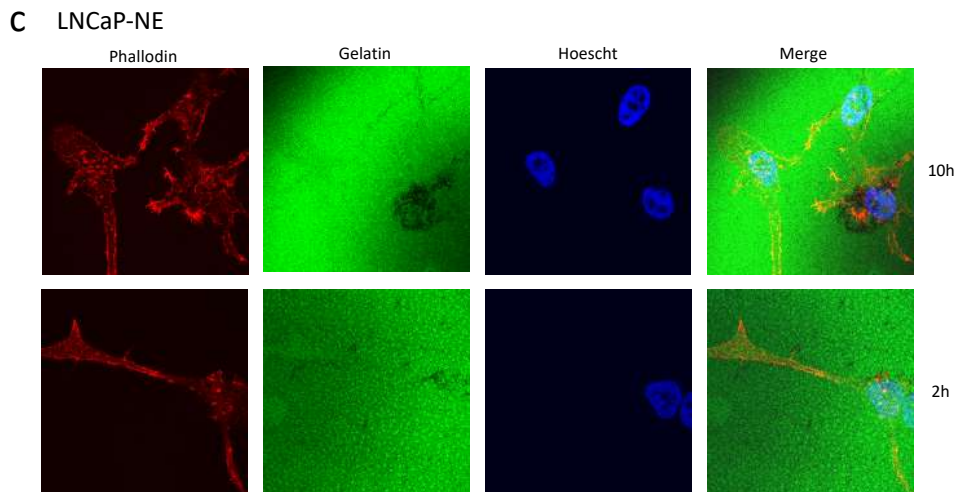
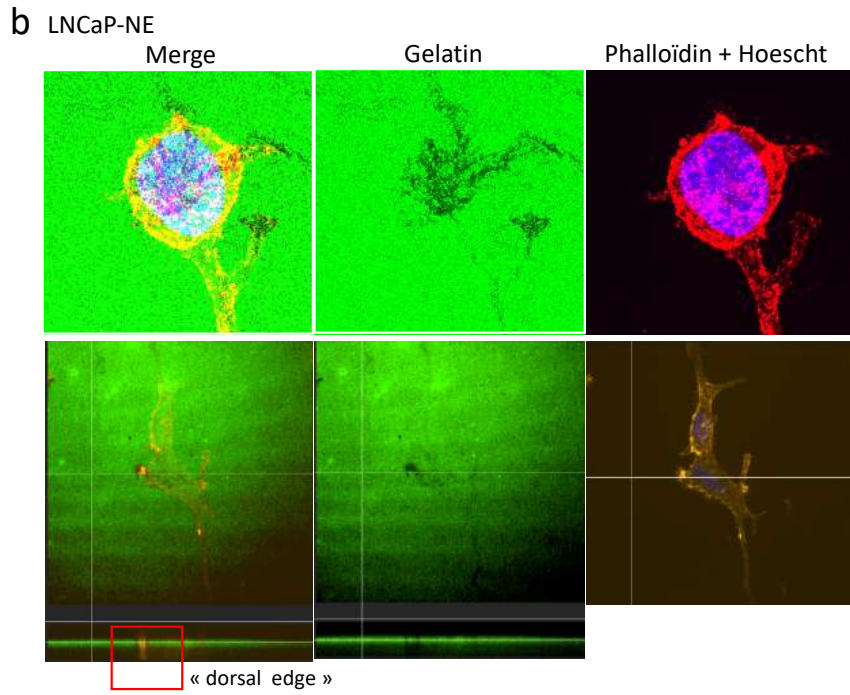
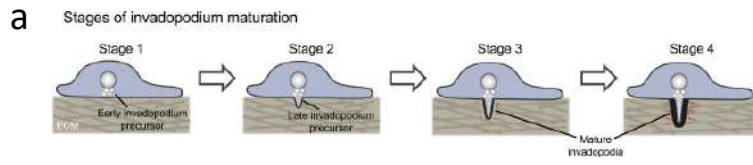
**Fig S1 FSCN1 contributes to PC3c-T1E4 migration properties**

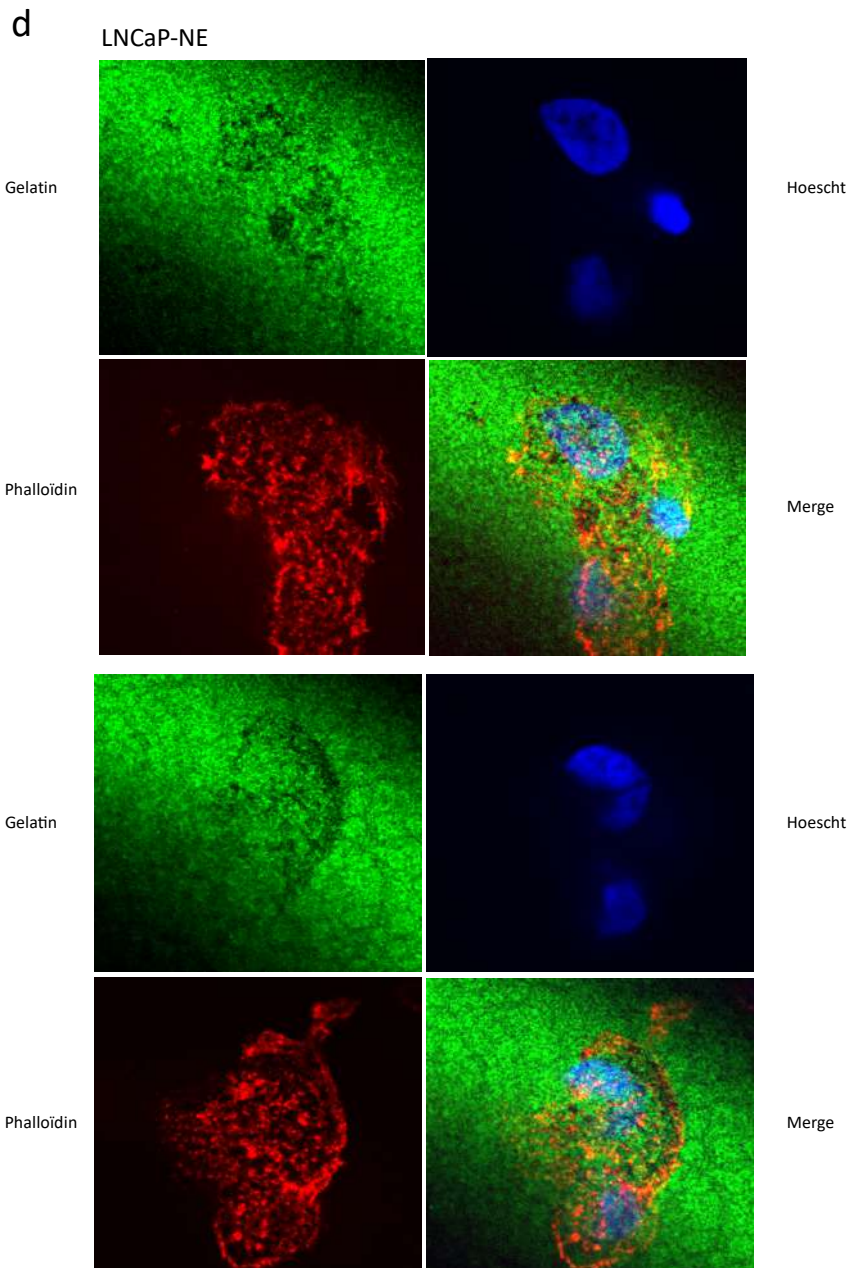
**a** RT-PCR showing FSCN1 gene expression in PC3c-T1E4 cells treated with control and FSCN1 siRNA or untreated mock. The expression level in cells treated with control siRNA was normalized to 1.

**b** Cell migration assays were performed using the FluoroBlok 8-mm pore 24-well insert system (BD Biosciences) in triplicate. PC3c-T1E4 cells were treated with control or FSCN1 siRNA for 48 h, then migration was analyzed by measuring fluorescence 12h to 24h later. Results are presented as relative fluorescence unit (RFU) fold change compared with cells treated with control siRNA. \*\*\*P<0.001, One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison test.



**Fig S2 FSCN1 expression in metastasis is restricted to blood vessels, osteoblasts and osteocytes**  
 Representative images of FSCN1 IHC staining in bone (a) and lymph node (b) metastasis, TMPRSS2:ERG positive or negative, using FSCN1 antibodies (Abcam-IM20). BV: blood vessels, BM: bone matrix, OB: osteoblast, Ocy: osteocyte, LT: lymphatic tissue, T : Tumor. Scale bar = 50mm.





**Fig S3 LNCaP-NE are able to form invadopodia and degrade fluorescent matrix**

**a** Schema of invadopodia formation from Beaty and Condeelis, Eur J Cell Biol, 2014.

**b, c** Representative images of LNCaP-NE cells seeded on fluorescein-conjugate gelatin (Invitrogen G13187) for 10 hours. After fixation, F-actin filaments were labeled with Alexa Fluor® 555 Phalloidin (red) (Cell Signaling 8953S), nucleus were labelled by Hoescht. Active invadopodia were identified thanks to degradation area (dark holes in the matrix) in fluorescent-gelatin. Dorsal-edge view demonstrates invadopodia (red box) inserted into the underlying gelatin (green). Dorsal-edge view shows protrusive invadopodia and areas of gelatin degradation underneath the coverslip as regions of red present in the green matrix

**d** Representative enlarged images of LNCaP-NE cells seeded on fluorescein-conjugate gelatin (Invitrogen G13187) for 10 hours.

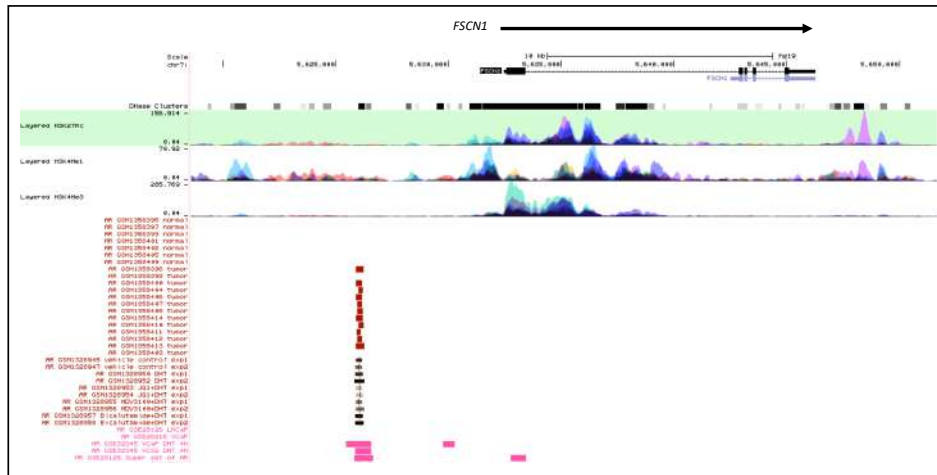
Quantitative PCR Primers		
Gene Name		Sequence (5'-3')
Chromogranin (CgA)	Forward	GCGGTGGAAGAGCCATCAT
	Reverse	TCTGTGGCTTCACCACTTTTCTC
Enolase Neuro Spécifique (NSE)	Forward	AGTTGCCCTGCCTTAC
	Reverse	GAGACAAACAGCGTTACTTAG
FSCN1	Forward	AAAAGTGTGCCTCCGTACC
	Reverse	CCCATTCTTCTGGAGGTCA
GAPDH	Forward	AAGGTCGGAGTCAACGGAATT
	Reverse	CTCCTGGAAGATGGTGATGG
L32	Forward	CAAGGAGCTGGAAGTGCTGC
	Reverse	CAGCTCTTCCACGATGGCT
PSA	Forward	AGTGCGAGAAGCATTCCAAC
	Reverse	CCAGCAAGATCACGCTTTTGTT

Sup. Table 1 Primers used in quantitative RT-PCR.

Chromatin-Immunoprecipitation-Quantitative PCR (ChIP-qPCR) Primers		
Gene name		Séquence (5'-3')
AR-1	Forward	GGTGGAGGTCGTAGCATTGT
	Reverse	AGTAGAGACGGGGTTTTGCC
AR-2	Forward	ATCGGTCAGAACAGTGCTCG
	Reverse	TGGATTCAAGCATGCACCA
AR-3	Forward	GGCAAAACCCGTCTCTACT
	Reverse	CAGCAAGGTGAATTGGAGCAC
AR-4	Forward	CAAGATTGTACCACCGCCCC
	Reverse	CTCCTCCCTGAACCACTCT
AR-5	Forward	ACGTCACTATGAGCCACCAC
	Reverse	ATCCTGCTTTCACTGAGGGC
PSA	Forward	TGGGACAACCTTGCAAACCTG
	Reverse	CCAGAGTAGGTCTGTTTTCAA
Ctrl	Forward	CCTGGAGGGCTTGAGAT
	Reverse	ATCCTACGGCTGGCTGTGA

Sup. Table 2 Primers used for ChIP-qPCR.





**Fig. S4 Analysis of ChIP-seq datasets for the binding of AR to the *FSCN1* locus in VCaP cells using UCSC Genome Browser.** The AR-binding site peaks are highlighted in red, grey or pink for AR-ChIP derived from normal and tumor tissues, or untreated, DHT-treated, or antagonist-treated VCaP cells as indicated. The upper lines corresponding to H3K27Ac, H3K4Me1, and H3K4Me3 marks, as well as of DNase-1 hypersensitivity peak clusters, are from the human ENCODE project. Tracks are shown for H3K27Ac and H3K4Me1 marks (often found near regulatory elements), H3K4Me3 marks (often found near promoters), DNase-1 hypersensitivity peak clusters correspond to protein binding on DNA.



### III. TROISIEME PARTIE : CARACTERISATION DE NRP1 ET FSCN1 DANS LES MICROVESICULES EXTRACELLULAIRES

#### A. Avant-propos :

Nous nous sommes posé la question de la détection des protéines NRP1 et FSCN1 dans des microvésicules extracellulaires (exosomes) de manière à identifier plus précocement des tumeurs devenant résistantes à la castration, et à utiliser ces deux protéines comme marqueurs de suivi des patients au cours de traitement par hormonothérapie.

Il est également décrit depuis plusieurs années le rôle capital des exosomes, vésicule extracellulaire de 30 à 100nm de diamètre, contenant des acides nucléiques, des protéines et des lipides, dans la communication entre les cellules cancéreuses et le micro-environnement tumoral (Shephard et al., 2017). Les exosomes apparaissent ainsi comme étant des acteurs majeurs dans la progression du cancer et potentiellement dosables dans les biopsies liquides.

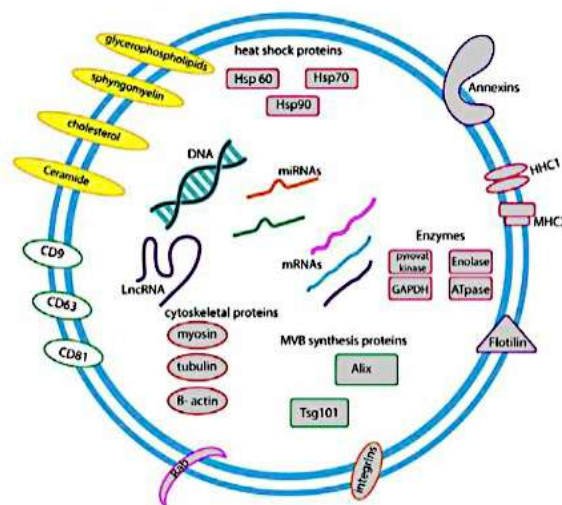


Figure 1 : Schéma d'un exosome, vésicule extracellulaire de 30 à 100nm de diamètre, contenant des acides nucléiques, des protéines et des lipides (d'après Salehi & Sharifi, 2018).

#### B. Caractérisation des exosomes :

La première étape cruciale a été de purifier les exosomes issus d'un modèle cellulaire PC3-M-Luc exprimant ou non la fusion T1E4 (respectivement Ex T1E4 et Ex Plpcx, issus des

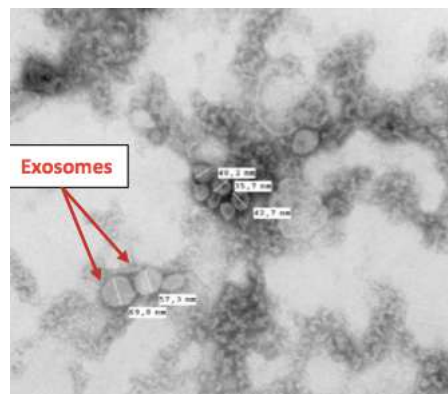
cellules Cell T1E4 et Cell Plpcx) suivant le protocole de centrifugations successives élaboré par l'équipe, adapté du protocole de Théry et al. (Théry et al., 2006).

Le modèle PC3-M-Luc est un modèle de cancer de la prostate métastatique. Cette lignée cellulaire a été transfectée de manière stable avec la luciférase, ce qui permet de surveiller la survenue des lésions et la réponse par l'imagerie de bioluminescence. Les cellules PC3-M-Luc et PC3c sont dérivées des cellules PC3 mais seules les PC3-M-Luc sont capables d'induire des lésions dans l'os après injection intracardiaque, ce qui évoque des différences entre les deux lignées.

Nous avons caractérisé ces exosomes sur le plan morphologique et en utilisant les marqueurs protéiques exosomaux.

### 1. Caractérisation morphologique

L'équipe avait déjà mis en place un protocole de purification d'exosomes validé par la caractérisation en microscopie électronique (TEM) de suspensions d'exosomes obtenues lors de précédentes purifications. La microscopie électronique permet de visualiser des vésicules rondes ou légèrement ovales de taille entre 30 et 100nm de diamètre (Figure 2).



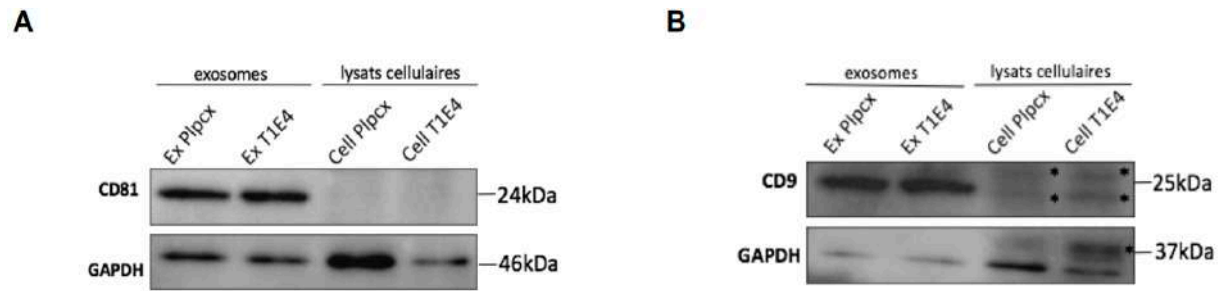
### **Figure 2 : Caractérisation des exosomes en TEM.**

Analyse morphologique en TEM détectant des vésicules rondes ou légèrement ovales entre 30 et 100nm de diamètre correspondant aux exosomes. Ces suspensions d'exosomes ou celles obtenues ensuite avec le même protocole ont été utilisées pour la suite du projet.

### 2. Détection des marqueurs protéiques

Comme cela est montré dans la Figure 3, les exosomes issus de cellules PC3-M-Luc exprimant ou non la fusion T1E4 ont été caractérisés en détectant les marqueurs protéiques CD9 (Figure 3A) et CD81 (Figure 3B) en Western Blot. Ces marqueurs sont spécifiques des exosomes et absents des extraits cellulaires, comme décrit dans la littérature (Colombo et al.,

2014). La protéine GAPDH, utilisée comme contrôle d'équicharge, est retrouvée dans les exosomes.



**Figure 3 : Caractérisation des marqueurs des exosomes purifiés en Western Blot.**

3A. Détection protéique de CD81 par Western-Blot. CD81 n'est retrouvée que dans les exosomes. 3B. Détection protéique de CD9 par Western-Blot. CD9 n'est retrouvée que dans les exosomes. La détection de la protéine GAPDH est utilisé comme contrôle d'équicharge. \* signal aspécifique.

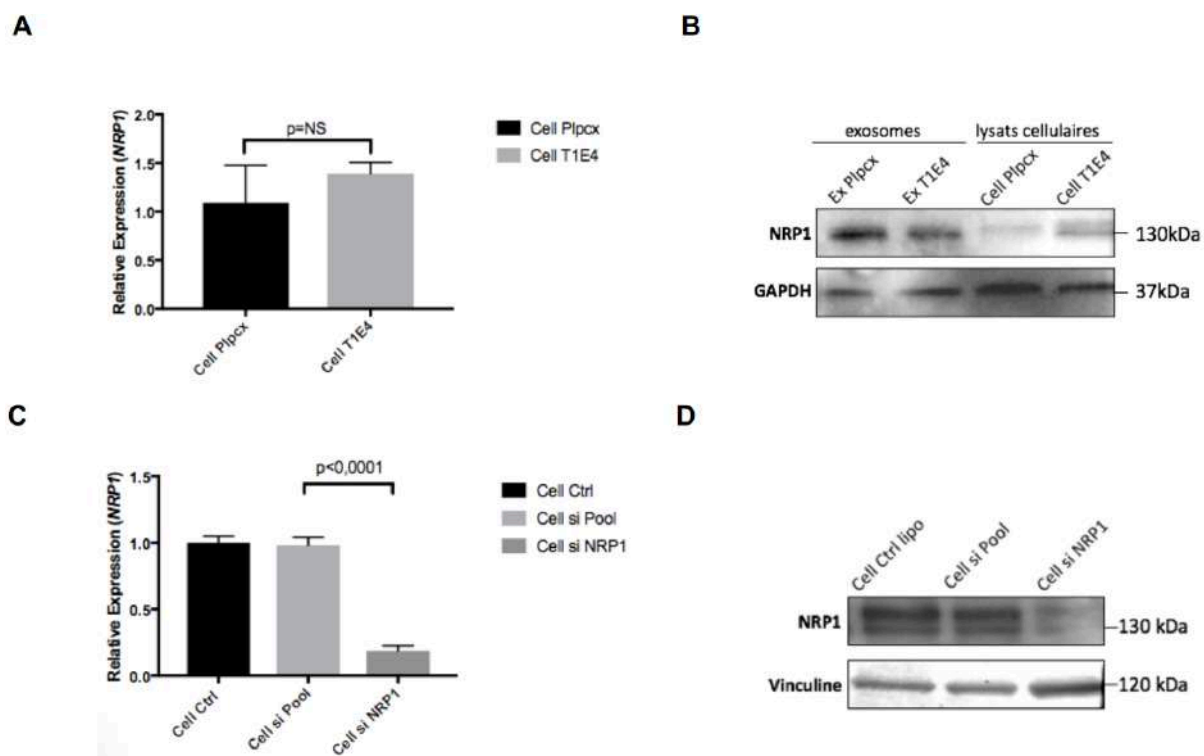
Ces résultats confirment que les vésicules obtenues grâce au protocole de centrifugations successives sont des exosomes, puisque leur morphologie, leur taille et l'expression des marqueurs protéiques correspond aux critères publiés.

### C. Étude de NRP1

Tout d'abord, nous avons détecté l'expression de l'ARN de NRP1 par RT-qPCR à partir des ARN totaux des cellules (Figure 4A). Puis nous avons réalisé un Western-Blot à partir des extraits protéiques exosomaux et cellulaires afin de rechercher son expression. Le contrôle d'équicharge est assuré par la protéine GAPDH (Figure 4B). Ces résultats montrent la présence de NRP1 à 130kDa dans les exosomes issus de cellules exprimant ou non la fusion T1E4 et, sous forme de doublet, dans les extraits cellulaires exprimant ou non la fusion. L'aspect de doublet de NRP1 est décrit par le fournisseur de l'anticorps anti-NRP1 (Abcam 81321) et retrouvé dans la littérature (Vivekanandhan et al., 2017).

Par la suite, afin de vérifier que la bande retrouvée à 130kDa correspond bien à NRP1, nous avons réalisé un siNRP1 dans les cellules exprimant la fusion T1E4. L'efficacité d'extinction de l'expression de NRP1, mesurée par RT-qPCR, est de 80% (Figure 4C). En Western Blot, le siNRP1 diminue l'intensité de la bande de 130kDa sous forme de doublet par rapport à celle détectée dans les extraits cellulaires contrôle qui ont juste reçu de la lipofectamine (Cell Ctrl lipo) et aux extraits cellulaires ayant reçu le siPool (Figure 4D).

Ces résultats montrent que la bande détectée par l'Ac anti-NRP1 à 130kDa dans les extraits cellulaires correspond à NRP1. Par ailleurs, la protéine NRP1 est détectée dans les exosomes.



#### Figure 4 : Détection de NRP1.

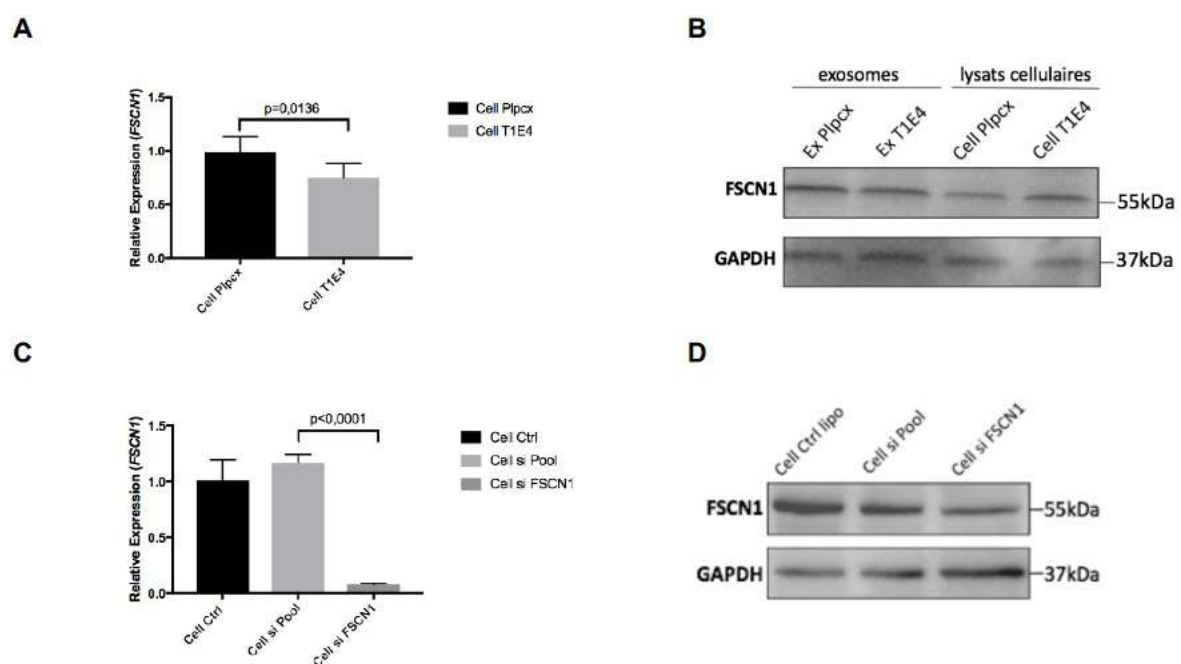
4A. Expression ARN de NRP1 dans les cellules PC3-M-Luc contrôle et les cellules exprimant la fusion T1E4 ( $p=NS$ , two-tailed unpaired t test). 4B. Détection protéique de NRP1 par Western-Blot dans les exosomes et dans les extraits cellulaires à l'aide de l'anticorps anti-NRP1. La protéine NRP1 est détectée dans les extraits protéiques cellulaires et dans les exosomes. Le contrôle d'équicharge est assuré par la protéine GAPDH. 4C Expression ARN de NRP1 dans les cellules PC3-M-Luc-T1E4 ayant reçu la lipofectamine (Cell Ctrl), les cellules ayant reçu le si Pool (Cell si Pool) et les cellules ayant reçu le si NRP1 (si NRP1) ( $p<0,0001$ , two-tailed unpaired t test). 4D. Détection protéique de NRP1 par Western-Blot dans les extraits cellulaires. Le contrôle d'équicharge est assuré par la détection de la protéine Vinculine.

**NRP1 est détecté dans les exosomes, ceci est en faveur d'un lien potentiel dans le phénomène métastatique même si le rôle précis de NRP1 avec ses ligands reste à établir.**

#### D. Étude de FSCN1

Tout d'abord, nous avons détecté l'expression de l'ARN de FSCN1 par RT-qPCR à partir des ARN totaux des cellules (Figure 5A). Puis nous avons réalisé un Western-Blot à partir des extraits protéiques exosomaux et cellulaires afin de rechercher son expression. Le contrôle d'équicharge est assuré par la détection de la protéine GAPDH (Figure 5B). Ces résultats montrent la présence de FSCN1 à 55kDa, dans les exosomes issus de cellules exprimant ou non la fusion T1E4 et dans les extraits cellulaires.

Par la suite, afin de vérifier que la bande retrouvée à 55kDa correspond bien à la FSCN1, nous avons utilisé un siFSCN1 dans les cellules exprimant la fusion T1E4 pour inhiber son expression. L'efficacité d'extinction de l'expression de FSCN1 mesurée par RT-qPCR est 95% (Figure 5C). En Western Blot, le siFSCN1 diminue l'intensité de la bande correspondant à 55kDa par rapport à celle détectée dans les extraits cellulaires contrôle qui ont reçu uniquement l'agent transfectant (Cell Ctrl lipo) et aux extraits cellulaires ayant reçu le si contrôle appelé siPool (Cell siPool), correspondant à un mélange de si aspécifiques (Figure 5D). Ces résultats montrent que la bande détectée par l'Ac anti-FSCN1 à 55kDa dans les extraits cellulaires correspond à la FSCN1. La protéine FSCN1 est détectée dans les exosomes.



### Figure 5 : Détection de FSCN1.

5A. Expression ARN de FSCN1 dans les cellules PC3-M-Luc contrôle et les cellules exprimant la fusion T1E4 ( $p=0,0136$ , two-tailed unpaired t test). 5B. Détection protéique de FSCN1 par Western-Blot dans les exosomes et dans les extraits cellulaires à l'aide de l'anticorps anti-FSCN1. La protéine FSCN1 est détectée dans les extraits protéiques cellulaires et dans les exosomes. Le contrôle d'équicharge est assuré par la protéine GAPDH. 5C Expression ARN de FSCN1 dans les cellules PC3-M-Luc-T1E4 ayant reçu la lipofectamine (Cell Ctrl), les cellules ayant reçu le si Pool (Cell si Pool) et les cellules ayant reçu le si FSCN1 (si FSCN1) ( $p<0,0001$ , two-tailed unpaired test). 5D Détection protéique de FSCN1 par Western-Blot dans les extraits cellulaires. Le contrôle d'équicharge est assuré par la détection de la protéine GAPDH.

**FSCN1 est détecté dans les exosomes, ceci est en faveur d'un lien potentiel dans le phénomène métastatique même si le rôle précis de FSCN1 reste à établir.**





## **DISCUSSION, PERSPECTIVES, CONCLUSION GENERALE**



# I. DISCUSSION

## A. Avant-propos

La suppression androgénique, est le premier traitement des formes métastatiques de cancer de la prostate et est dorénavant prescrit en forme continue tout au long de la vie des patients concernés. En cas de suppression androgénique voire d'utilisation d'hormonothérapies ciblant AR telles que enzalutamide, plusieurs mécanismes de résistance entrent en jeu, parmi lesquels une transformation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques avec perte d'activité de AR (Rickman et al., 2017). Les cancers de la prostate neuroendocrines possèdent des caractéristiques cliniques qui leur sont propres telles que des métastases viscérales ou ostéolytiques et sont plus agressifs (Conteduca et al., 2019).

Plusieurs acteurs moléculaires ont déjà été décrit comme impliqués dans la transdifférenciation des cellules tumorales en cellules neuroendocrine tels que *EZH2*, *REST*, *AURKA*, *MYCN*, *SPINK1*, *SPOP* (Puca et al., 2019). La fusion *TMPRSS2:ERG*, dont le rôle est étudié dans les travaux antérieurs de l'équipe, est conservée durant l'évolution des cancers de la prostate (Taris et al., 2014). Néanmoins, son rôle précis dans l'évolution métastatique et son impact pronostic demeurent aujourd'hui encore controversés (Gasi Tandefelt et al., 2014).

## B. Identification et rôle de *Neuropiline 1*, appartenant au guidage axonal, dans l'évolution des cancers de la prostate

Les résultats précédents de l'équipe révèlent que la présence de la fusion *TMPRSS2:ERG*, peut être capable de déréguler des gènes du guidage axonal tels que *PLXNA2* dans un modèle cellulaire hormono-indépendant (PC3c) (Tian et al., 2014). Après analyse bio-informatique et confrontation à la littérature, *NRPI*, gène dont le produit est partenaire du récepteur *PLXNA2* semblait pertinent à étudier comme potentiel gène cible de *ERG*. Cependant nos résultats révèlent également une réexpression de *NRPI* lors de la suppression androgénique, comme démontré par Tse et al. (Tse et al., 2017). Par ailleurs nos résultats n'ont pas montré de réelle implication de la fusion *TMPRSS2:ERG* dans la régulation de *NRPI*. Le gène *NRPI* fait aussi partie des gènes pouvant participer à la résistance à la castration et à la transdifférenciation neuroendocrine des cancers de la prostate, d'autant plus qu'on détecte son expression mARN dans des échantillons de NEPC à partir de données publiées, et aussi dans les cancers métastatiques résistants à la castration et neuroendocrines, comme le montrent nos résultats.

La voie du guidage axonal, à laquelle appartient NRP1, est l'une des voies les plus enrichies dans le milieu osseux, notamment dans le cas des cellules cancéreuses ostéolytiques, pouvant être caractéristiques des formes neuroendocrines plus agressives (Hensel et al., 2018). Nous savons aujourd'hui que les fibres nerveuses autonomes du microenvironnement de la tumeur prostatique régulent l'initiation et la diffusion du cancer, mais nous ignorons les mécanismes impliqués (Magnon et al., 2013; Mauffrey et al., 2019). Dans une étude récente française, les progéniteurs neuronaux du système nerveux central qui expriment la doublecortine (DCX+) s'infiltrèrent dans les tumeurs prostatiques et les métastases, dans lesquelles ils favorisent un phénomène de neurogenèse (Mauffrey et al., 2019). On suspecte donc une implication de gènes de guidage axonal dans le cancer de la prostate à l'instar de la cancérogenèse d'autres tumeurs innervées telles que le cancer de l'estomac, du côlon et du pancréas (Xu et al., 2017). Une des hypothèses devant être approfondie est donc l'implication de NRP1, et de ses ligands tels que SEMA3A ou VEGFA dans le phénomène métastatique des cancers. D'autres acteurs du guidage axonal comme la Plexine B1 (PLXNB1) et la Sémaphorine 3C (SEMA3C) ont été décrits dans la cancérogenèse prostatique. Ainsi, la signalisation du PLXNB1 favorise la translocation de AR dans le noyau (Williamson, et al., 2016). La SEMA3C, sécrétée dans le microenvironnement tumoral et ligand de PLXNB1, est une cible transcriptionnelle directe de AR, de manière GATA2- dépendante (Tam et al., 2017). SEMA3C est aussi décrite pour favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse et les phénotypes de type souche dans les cellules prostatiques (Tam et al., 2017). SEMA3C active également de multiples récepteurs tyrosine kinase, dont l'EGFR, ErbB2, MET, de manière indépendante du ligand apparenté, via PLXNB1 et NRP1 (Peacock et al., 2018). SEMA3C a aussi été identifiée comme ayant un rôle majeur dans le développement d'autres cancers tels que le neuroblastome. Lorsque le gène *SEMA3C* est réprimé, cela renforce la migration des cellules de neuroblastomes, à travers les territoires sympathico-adrénergiques comme cela a été démontré à partir d'un modèle de xenogreffe aviaire. Par ailleurs, il a été montré que des cellules de neuroblastomes métastatiques migrent préférentiellement de deux manières (i) via l'aorte embryonnaire et (ii) via les nerfs périphériques. Le mécanisme est dépendant de l'axe NRP1, NRP2 et PLXNA4 pour la régulation de la cohésion de ces cellules de neuroblastome (Delloye-Bourgeois et al., 2017). Ces deux scénarios ne sont toutefois pas mutuellement exclusifs. Ils ont des points communs majeurs qui résident dans l'extrême multipotence de ces lignées embryonnaires et dans les mécanismes migratoires adaptatifs que les cellules de neuroblastome adoptent au cours de leur histoire de développement (Delloye-Bourgeois & Castellani, 2019).

L'intérêt de nos travaux sur NRP1 dans le cancer de la prostate renforce la nécessité d'étude des gènes de guidage axonal dans la cancérogenèse prostatique et particulièrement pour le ciblage thérapeutique des neuropilines. En effet, ces dernières constituent des cibles thérapeutiques potentielles lors du phénomène de résistance à la castration et de transdifférenciation neuroendocrine, comme déjà décrit à partir de modèles murins (W.-Q. Liu et al., 2018).

Les neuropilines sont des protéines transmembranaires impliquées dans un grand nombre de processus physiopathologiques autres que les cancers ou le guidage axonal. On distingue un rôle majeur des neuropilines dans l'angiogenèse, le développement cardiovasculaire ou encore l'immunité (Chuckran et al., 2020).

Concernant l'immunité, le récepteur NRP1 agit comme immunorégulateur et suscite actuellement un regain d'intérêt car il permet de renforcer la présence de cellules Treg intratumorales en cas d'inflammation dans le microenvironnement tumoral. Dans des modèles de murins, la perte de NRP1 dans les cellules Treg rétablit l'immunité antitumorale. L'enrichissement en NRP1 dans les cellules Treg est observé chez les patients tant au niveau intratumoral qu'au niveau des métastases, notamment ganglionnaires (Chaudhary et al., 2014). Ainsi, le ciblage de NRP1 peut compromettre la capacité des cellules Treg intratumorales à pénétrer la tumeur, ce qui permet d'améliorer les réponses aux immunothérapies. En outre, on a récemment constaté que NRP1 modulait les réponses des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques aux tumeurs. Les données émergentes suggèrent que NRP1 diminue la redynamisation des cellules T CD8<sup>+</sup> en réponse aux inhibiteurs de checkpoint. Ces mécanismes de régulation nouveaux et distincts représentent une perspective thérapeutique intéressante dans les cancers (Chuckran et al., 2020).

Plus récemment, et de manière surprenante, les Neuropilines ont aussi été impliquées comme ayant un rôle majeur dans l'infectabilité au SARS-Cov 2 dans deux publications de Daly et al. (Daly et al., 2020) et Cantuti-Castelvetri et al. (Cantuti-Castelvetri et al., 2020) dans le numéro d'octobre 2020 de Science. Précisément, le SARS-CoV-2 est connu pour utiliser la protéine virale Spike (S), qui est clivée par la protéase furine de l'hôte en deux polypeptides associés, S1 et S2, pour la fixation et l'entrée dans la cellule hôte. Daly et al. a démontré que l'extrémité C-terminale de la protéine S1, appelée CendR, se lie aux récepteurs transmembranaires de NRP1 et que le blocage de cette interaction réduit l'entrée du SARS-CoV-2 et l'infectabilité *in vitro*. En parallèle, Cantuti-Castelvetri et al. ont démontré que le NRP1 potentialise de manière significative l'infectabilité au SARS-CoV-2 et que des anticorps monoclonaux bloquant le domaine b1b2 extracellulaire du NRP1 connu pour se lier aux

peptides CendR pourraient être efficaces. La disponibilité de médicaments ciblant le NRP1, et particulièrement le domaine b1b2, déjà développés par l'industrie pharmaceutique dans les cancers comme le vesencumab (Weekes et al., 2014), et pouvant être utiles dans la pandémie, est un exemple prometteur de la nécessité d'une recherche académique intégrée (ANNEXE 2).

### C. Rôle de *Fascin-1*, impliqué dans l'invasion tumorale via la formation des invadopodes

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression 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 allant du cancer de la prostate localisé au cancer évolué, résistant à la castration puis neuroendocrine. Ensuite, nous avons caractérisé le gène *FSCN1*, réprimé par AR par fixation directe sur le gène.

Dans la littérature, une unique étude avait jusqu'alors mis en évidence la présence franche de la FSCN1 au sein des cellules tumorales prostatiques résistantes à la castration (Darnel et al., 2009). A l'inverse, l'étude de Ozdemir et celle de Tian et ses collègues ont retrouvé la présence de la FSCN1, non pas dans les cellules tumorales, mais au niveau du stroma, et ce, indépendamment de la présence de la fusion (Özdemir et al., 2014; Tian et al., 2014). Ces éléments ainsi que nos résultats laissent à penser qu'il existe une régulation du gène de la *FSCN1* non pas directement par la fusion *TMPRSS2:ERG*, mais probablement de manière plus complexe et qui pourrait également faire intervenir AR.

FSCN1 contribuerait donc à l'agressivité des CaP-NE et des CRPC l'exprimant. Pour aller plus loin, FSCN1 pourrait être une potentielle cible thérapeutique. Son inhibition permettrait de diminuer la migration des cellules cancéreuses et donc l'amélioration du pronostic des patients porteurs d'un CaP-NE.

L'utilisation des hormonothérapies de nouvelle génération, inhibiteurs de la fonction des récepteurs aux androgènes, tels que l'Abiraterone et l'Enzalutamide, y compris chez certains patients naïfs de castration avec haut volume tumoral, a augmenté l'incidence d'une des formes agressives de CRPC, au phénotype neuroendocrine. Leur diagnostic est morphologique et associé à la détection de marqueurs neuroendocrines, tels que la CgA et la Syn, à l'absence ou l'inactivité de AR et à la forte baisse du PSA.

Au cours des 5 dernières années, des techniques de séquençage haut-débit, ainsi que l'utilisation des modèles de lignées PDX (Patient-Derived Xenografts) de cancer de la prostate associés à des modèles animaux, ont permis d'identifier d'une part des « drivers » de

l'émergence NEPC, comme les facteurs ONECUT2, SRRM4, REST, BRN2 et FOXA1/2, et d'autre part des médiateurs, comme AURKA, PEG10, MEAF6, cycline D1 et plus récemment SPINK1 (Guo et al., 2009; Tiwari et al., 2020). Cependant les biomarqueurs pronostiques et prédictifs sont encore trop peu nombreux.

Les outils de suivi de la maladie pour prévoir cette évolution vers l'hormono-résistance et les métastases sont encore rares. Notre projet global propose une démarche originale qui est d'identifier des gènes réprimés par AR et dont la ré-expression devrait témoigner de la phase d'adaptation à l'hormonothérapie et de l'évolution vers un phénotype neuroendocrine caractérisé par son agressivité. Ils sont encore peu connus. En effet, il existe de nombreuses études qui identifient les gènes activés par AR mais encore peu identifient ceux qui sont réprimés par AR.

La FSCN1, régulée négativement par AR et donc diminuée lorsque AR est actif, pourrait constituer un biomarqueur de la résistance à la castration. Il n'apparaît éthiquement pas raisonnable de réaliser des biopsies tumorales régulières afin de suivre l'évolution de la maladie ou de prédire la survenue de la résistance. Toutefois, des études préliminaires, réalisées dans notre équipe, ont montré que la FSCN1 était détectée dans les exosomes tumoraux, vésicules de 30 à 100nm produites par les cellules, ce qui pourrait permettre d'envisager un suivi par prélèvement sanguin.

Des études ont montré que l'inhibition de l'expression de FSCN1 diminuait la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Fuse et al., 2011). Fuse et ses collègues ont montré que la restauration d'un microARN, le miR-145, habituellement régulé négativement dans de nombreux carcinomes dont le cancer de la prostate, et connu pour réguler la *FSCN1*, permettait la diminution de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaire. D'autres auteurs ont montré les mêmes effets anti-invasifs en utilisant un si-RNA dirigé contre la FSCN1 dans le cancer de la prostate (Darnel et al., 2009). De la même façon, dans le cancer de l'ovaire, la présence de la FSCN1 au niveau stromal est associée à des stades plus avancés et à une survie plus faible dans les cancers épithéliaux non séreux et que l'inhibition de la FSCN1 par un si-RNA ou un antagoniste permettait de diminuer la migration des cellules tumorales ovariennes (McGuire et al., 2019). L'utilisation de si-RNA dirigé contre la FSCN1, ou d'un inhibiteur spécifique, permet de diminuer les propriétés migratoires des cellules cancéreuses, suggérant que la FSCN1 pourrait être une potentielle cible thérapeutique.

## II. PERSPECTIVES

Les biopsies liquides donnent l'opportunité de détecter, analyser, monitorer les cancers à travers les fluides, et la plupart du temps le sang ou les urines (Alix-Panabières & Pantel, 2016). Plusieurs éléments peuvent être détectés dans les biopsies liquides comme les cellules tumorales circulantes, l'ADN tumoral circulant, ou encore les vésicules extracellulaires (EVs) comprenant les exosomes appelés « small EVs ». En plus de représenter une procédure peu ou pas invasive, contrairement aux biopsies tissulaires classiques, elle devrait permettre de mieux appréhender l'hétérogénéité intratumorale et de mesurer en temps réel l'évolution du cancer. Les récentes avancées technologiques et moléculaires, largement facilitées par l'utilisation de la microfluidique, ont permis des progrès importants dans la purification et l'analyse des composants biologiques de la biopsie liquide. En particulier, les développements de la PCR numérique et les diverses optimisations des technologies de séquençage de nouvelle génération sont au cœur des nombreuses validations de l'ADN tumoral circulant, en tant que biomarqueur performant du cancer (Poulet et al., 2019).

Concernant le cancer de la prostate, l'intérêt des biopsies liquides avait été soulevé dès 2014, à travers la caractérisation d'ARV7 comme variant d'épissage de AR corrélé à l'évolution tumorale et à la résistance aux thérapies Enzalutamide et Abiratérone ou même aux taxanes dans des cellules tumorales circulantes (Antonarakis et al., 2014; Tagawa et al., 2019). Cependant, à l'heure actuelle ce dosage n'est pas réalisé en pratique courante du fait de leur rareté et d'une hétérogénéité de détection. De plus, l'ADN tumoral circulant reste caractérisable dans une minorité de cancers de la prostate (Bettegowda et al., 2014).

Pour que la biopsie liquide soit totalement adoptée dans la pratique clinique, il faudra poursuivre les efforts récents de normalisation des procédures, tant sur le plan pré-analytique que sur le plan analytique notamment dans le cancer de la prostate (Poulet et al., 2019). L'intérêt du dosage des exosomes et microvésicules est en ce sens une piste d'avenir intéressante à évaluer en pratique clinique car stables dans les biofluides et relarguées par les cellules cancéreuses en cours de dissémination plutôt que le fruit de la destruction cellulaire comme c'est le cas de l'ADN tumoral circulant (Yu et al., 2021). Ils peuvent être isolés dès les stades précoces de la maladie comme cela a été montré dans le cancer de la prostate.

Ainsi, le test ExoDx™ Prostate (IntelliScore), premier test diagnostique du cancer de la prostate basé sur l'ARN exosomal a déjà permis d'identifier plus de 50 000 patients atteints de cancers de la prostate versus des processus non cancéreux inflammatoires, et ce test est



maintenant inclus dans les directives du NCCN pour la détection précoce du cancer de la prostate. Ce test en particulier utilise une signature de 3 transcrits ARN (ERG, PSA et SPDEF) pour évaluer le risque de cancer (Yu et al., 2021).

Nous avons caractérisé deux protéines, NRP1 et FSCN1, détectables et dosables dans les exosomes. On pourrait dès lors imaginer via des tests exosomaux établir une signature transcriptomique de la résistance à la castration et de la différenciation neuroendocrine et réaliser des essais cliniques pour guider la prise en charge des patients.

### III. CONCLUSION GENERALE

Nous avons identifié deux nouveaux gènes *NRPI* et *FSCNI* réprimés par le récepteur aux androgènes, et se réexprimant lorsque celui-ci est inhibé en cas de suppression androgénique ou de thérapies hormonales le ciblant directement. Ces deux gènes sont associés au phénotype neuroendocrine, survenant lors de l'évolution des cancers de la prostate et pourraient être impliqués dans la transdifférenciation des cellules cancéreuses prostatiques en cellules neuroendocrines, même si les mécanismes moléculaires précis ne sont pas encore connus. Les produits de ces deux gènes pourraient à l'avenir faire l'objet de cibles thérapeutiques ou alors d'une signature transcriptomique identifiant précocement la résistance à la castration et l'échappement aux thérapies anticancéreuses en cours. Ils pourraient, grâce aux biopsies liquides et à la meilleure caractérisation de microvésicules extracellulaires, être utiles dans le suivi de la maladie en cours de traitement, et aussi de guider les stratégies thérapeutiques dans le cadre d'essais cliniques.

## **ANNEXES**



# Annexe 1 : Article original concernant les bilans d'évaluations dans le cancer de la prostate, paru dans Bulletin du Cancer en 2017.

Original article

Bull Cancer 2017; 104: 552-558  
en ligne sur / on line on  
www.em-consulit.com/fr/vol/bulcan  
www.sciencedirect.com



## First-line management of metastatic castrate-resistant prostate cancer patients: Audit of real-life practices<sup>☆</sup>

Anthony Turpin<sup>1,2</sup>, David Pasquier<sup>3</sup>, Christophe Massard<sup>4</sup>, Jean-François Berdah<sup>5</sup>, Stéphane Culine<sup>6</sup>, Nicolas Penel<sup>7,8</sup>

Received 17 August 2016  
Accepted 5 February 2017  
Available online: 5 April 2017

1. CHRU de Lille, medical oncology department, rue Michel-Polonovski, 59037 Lille cedex, France
2. Institut de biologie de Lille, CNRS-UMR8161, 1, rue du Professeur-Calmette, 59021 Lille cedex, France
3. Centre Oscar-Lambret, department of radiotherapy, 3, rue F.-Combemale, 59020 Lille, France
4. Gustave-Roussy hospital, department of therapeutic innovation and early trials, 114, rue Edouard-Vaillant, 94800 Villejuif, France
5. Clinique Sainte-Marguerite, medical oncology department, oncovar, avenue Alexis-Godillot, 83400 Hyères, France
6. AP-HP, Saint-Louis hospital, medical oncology, 75010 Paris, France
7. Centre Oscar-Lambret, medical oncology department, 3, rue F.-Combemale, 59020 Lille, France
8. SIRIC ONCOLille Consortium, Clinical Research and Methodology Platform, 59000 Lille, France

### Correspondence:

Anthony Turpin, CHRU de Lille, medical oncology department, rue Michel Polonovski, 59037 Lille cedex, France.  
anthony.turpin@chru-lille.fr

### Keywords

Abiraterone  
Castrate-resistant prostate cancer  
First-line therapy  
Docetaxel  
Enzalutamide

### Summary

**Background** > No reliable guidelines are available for choosing the best option between docetaxel and new hormonal therapies (NHTs) (i.e., abiraterone and enzalutamide) in first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) patients. We performed an audit of real-life practices.

**Methods** > We built an online questionnaire and distributed it with the help of French oncology networks. This questionnaire was sent to 481 physicians who treat patients with mCRPC. All of the answers were declarative, individual, and anonymized. A descriptive analysis was done. A univariate logistic regression analysis was performed for the criteria of choice between docetaxel and NHTs.

**Results** > From March to July 2015, 109/481 physicians (22.6%) completed the questionnaire. The selection criteria for initially choosing docetaxel were as follows: presence of visceral metastases (79.8%), heavy tumor burden (68.8%), aggressive tumor disease (66.1%), and short-term efficacy of castration (66.1%). The selection criteria for initially choosing NHTs were as follows: long-term efficacy of castration (66.1%), higher age (67.9%), low tumor grade (56.9%), and absence of

<sup>☆</sup> This study was presented as a poster at the 2016 ASCO-GU meeting in San Francisco, CA, USA.

symptoms (54.1%). With docetaxel, the first tumor assessment was typically performed after three (1–6) cycles, including prostate-specific antigen (PSA) testing (96.3%), a thoraco-abdominopelvic CT scan (68.8%), and bone scintigraphy (59.6%). With NHTs, tumor assessment was mainly performed after 3 months of treatment (1–6) and included PSA testing, a thoraco-abdominopelvic CT, and bone scintigraphy in 90.8%, 61.5%, and 63.3% of cases, respectively.

**Conclusions** > This is the first study assessing real-life practices among physicians who treat patients with mCRPC. These practices were found to be homogeneous.

**Mots clés**  
Abiratérone  
Cancer de la prostate  
résistant à la castration  
Première ligne  
Docétaxel  
Enzalutamide

## ■ Résumé

### État des lieux de la prise en charge des patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration en première ligne par les oncologues français

**Introduction** > Le choix de la meilleure stratégie thérapeutique en première ligne chez les patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration (CPRC) reste controversé. Nous avons réalisé une enquête de pratique parmi les onco-urologues français.

**Méthodes** > Un questionnaire en ligne a été diffusé via les réseaux régionaux de cancérologie et le GETUG. Toutes les réponses étaient déclaratives, individuelles et anonymisées. Une étude descriptive a été réalisée ainsi qu'une analyse univariée en régression logistique pour les critères de choix entre docétaxel et hormonothérapie de nouvelle génération.

**Résultats** > De mars à juillet 2015, 109/481 (22,6 %) oncologues ont répondu au questionnaire. Les critères privilégiés pour le choix du docétaxel étaient : métastases viscérales (79,8 %), volume tumoral important (68,8 %), maladie tumorale « agressive » et courte durée d'efficacité de la castration (66,1 %). Concernant le choix d'une hormonothérapie de nouvelle génération (HNG) de type abiratérone ou enzalutamide, les critères étaient : longue durée d'efficacité de la castration (66,1 %), âge élevé (67,9 %), bas grade tumoral (56,9 %) et absence de symptômes (54,1 %). Sous docétaxel, le bilan d'évaluation avait lieu après 3 (1–6) cycles, comportant un dosage du PSA (96,3 %), un scanner thoraco-abdomino-pelvien (68,8 %) et une scintigraphie osseuse (59,6 %). Sous HNG, le bilan d'évaluation était effectué après 3 (1–6) mois et comportait les mêmes examens.

**Conclusion** > Le choix de la meilleure stratégie thérapeutique en première ligne chez les patients atteints de CPRC reste subjectif pour les onco-urologues français, même si les pratiques déclaratives semblent homogènes.

## Introduction

Docetaxel, an antimicrotubule chemotherapy agent, and new hormonal therapies (NHTs), such as abiraterone and enzalutamide, are approved options for the first-line management of metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC) patients. Thanks to TAX327 study [1], docetaxel plus prednisone was the first chemotherapy able to significantly improve overall survival (OS) rates (18.9 months vs. 16.5 months,  $P = 0.009$ ), and quality of life (22% vs. 13%,  $P = 0.009$ ) compared to mitoxantrone. Abiraterone is a selective inhibitor of androgen biosynthesis that potently and irreversibly blocks CYP17, which is a crucial enzyme in testosterone and estrogen synthesis, and has been another option in chemotherapy-naïve patients since the results of the COU-AA-302 study [2]. The median overall survival was significantly longer in the abiraterone acetate group than in the placebo group (34.7 months vs. 30.3 months,  $P = 0.0033$ ).

The last drug approved was enzalutamide (MDV3100), a targeted androgen-receptor inhibitor that competitively binds to the ligand-binding domain of the androgen receptor and inhibits androgen-receptor translocation to the cell nucleus, recruitment of androgen-receptor cofactors, and androgen-receptor binding to DNA, according to the PREVAIL trial results [3]. The study showed a benefit of the active treatment in comparison to placebo with a 29% reduction in the risk of death ( $P < 0.001$ ) and an 81% reduction in radiographic progression ( $P < 0.001$ ). Moreover, compared to a placebo, enzalutamide significantly improved patient outcomes in all domains of health-related quality of life [4]. Other first-line therapies, including sipuleucel T and alpha-emitter Radium 223, have been approved in the United States [5] but are not currently available in France.

Today, there is no real consensus regarding the first-line treatment of mCRPC [6,7]. As a consequence, the decision-making

process is very challenging. The aim of our study was to describe (i) the criteria for choosing docetaxel rather than NHTs as the first-line treatment of mCRPC and (ii) the follow-up modalities in this clinical setting. We conducted a declarative study using an online questionnaire.

## Material and methods

### Data collection

We built a questionnaire with 22 closed questions using online software. We distributed the questionnaire via web links, anonymized the answers, and analyzed the results.

With the help of French regional oncology networks and the "Groupe d'étude des tumeurs urogénitales" (GETUG), the questionnaire was sent to 481 medical oncologists, radiation oncologists, and urologists who treat mCRPC patients.

The system allowed only one IP address response, ensuring that each physician responder could answer only once.

The questions related to the description of real-life practices of physicians (e.g., place, specialty, and number of new mCRPC patients per year), criteria for choosing docetaxel rather than NHTs, criteria for introducing NHTs rather than docetaxel, and criteria for assessing response to treatment. The response to treatment was described in terms of the duration of the treatment with NHTs or the number of cycles with docetaxel and complementary imaging modalities, including the type and moment of realization with bone scintigraphy and/or a thoraco-abdominal CT and/or a choline-PET scan and/or PSA testing.

### Data analysis

The descriptive analysis was based on percentages and their 95% confidence intervals in cases of categorical variables and on median and extreme values in cases of continuous variables.

The factors associated with docetaxel were identified using a univariate logistic analysis. A multivariate analysis was not feasible.

## Results

### Description of the population of responders

Between March and July 2015, 109/481 physicians responded (22.6%). Among them, there were 52 (47.7%) medical oncologists, 32 (29.4%) radiation oncologists, 23 urologists (21.1%), and 2 (1.8%) other specialty physicians.

The responders were from all the French regions. The majority of them were from Hauts de France (20.4%), Paris-Île-de-France (18.5%), and Bretagne (10.2%).

The physicians treated a median of 50 (3–500) new prostate cancer patients each year. Among these patients, a median of 20 (0–150) was castration resistant.

### First-line docetaxel

In cases of visceral metastases, 79.8% of the physicians favored docetaxel (table 1, figures 1, 2A, and 3). Similarly, the majority of physicians (i.e., 68.8%, 67%, 66.1%, 66.1%, and 60.6% of respondents, respectively) favored the use of docetaxel for the presence of heavy tumor burden, a high Gleason grade, aggressive tumor disease, short-term efficacy of castration, and the presence of a neuroendocrine component.

In the univariate analysis, the criteria favoring docetaxel were as follows: young age ( $P < 0.0001$ ), a high Gleason grade ( $P < 0.0001$ ), the presence of a neuroendocrine component ( $P < 0.0001$ ), short-term efficacy of castration ( $P < 0.0001$ ), bone pain ( $P < 0.0001$ ), symptoms other than bone pain ( $P < 0.0001$ ), tumor aggressiveness ( $P < 0.0001$ ) with heavy tumor burden ( $P < 0.0001$ ), a presence of visceral metastases

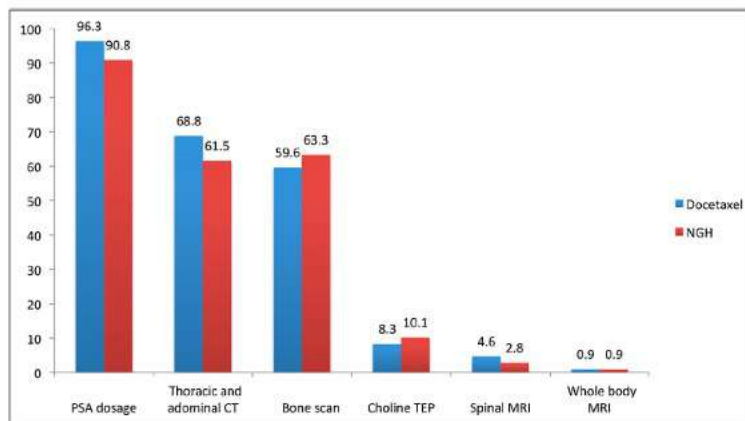


FIGURE 1  
Modalities of assessment under first-line therapy in mCRPC patients

TABLE I  
Factors associated with docetaxel choice (calculation of the odds ratio with 95% confidence interval and Chi-squared tests)

Factor	Favor CT (n = 109)	Favor HT (n = 109)	OR	95% CI	P
Young age	69 (63.3%)	6 (5.5%)	29.6	11.9-73.0	< 0.0001
Good PS	55 (50.5%)	39 (35.8%)	1.8	1.1-3.1	0.0286
High-grade tumor	73 (67%)	3 (2.8%)	71.6	21.2-241.4	< 0.0001
Neuroendocrine component	66 (60.6%)	3 (2.8%)	54.2	16.1-181.8	< 0.0001
High level of PSA	21 (19.3%)	13 (11.9%)	1.76	0.8-3.7	0.1354
Short-term efficacy of castration	72 (66.1%)	3 (2.8%)	68.7	20.4-231.4	< 0.0001
Bone pain	63 (57.8%)	16 (14.7%)	7.9	4.1-15.3	< 0.0001
Other symptoms	51 (56.8%)	7 (6.4%)	12.8	5.4-30.0	< 0.0001
Bone metastasis	20 (18.3%)	8 (7.3%)	2.8	1.2-6.8	0.0151
Heavy tumor burden	75 (68.8%)	5 (4.6%)	45.8	17.1-122.8	< 0.0001
"Aggressive tumor"	72 (66.1%)	5 (4.6%)	40.5	15.2-107.9	< 0.0001
Visceral met.	87 (79.8%)	5 (4.6%)	82.2	29.9-226.3	< 0.0001
Hypercalcemia	27 (24.8%)	3 (2.8%)	11.6	3.4-39.7	< 0.0001
Anemia	12 (11%)	5 (4.6%)	2.5	0.8-7.5	0.0770
Elevated LDH	15 (13.8%)	1 (0.9%)	17.2	2.2-133.0	< 0.0001
Elevated phosphatase alkaline	6 (5.5%)	1 (0.9%)	6.3	0.7-53.2	0.0547
Patient choice	9 (8.3%)	27 (24.8%)	9.7	1.2-78.1	0.0096

( $P < 0.0001$ ), hypercalcemia ( $P < 0.0001$ ), and elevated LDH ( $P < 0.0001$ ) (table I).

With docetaxel treatment, the first tumor assessment was typically performed after three cycles (1-6), corresponding to 2.75 months (1.75-3.75 months) of treatment.

This assessment included PSA testing, a thoraco-abdominopelvic CT, and bone scintigraphy in 96.3%, 68.8%, and 59.6% of cases, respectively (figure 1). Further investigations, such as choline-TEP and spinal or whole body MRI, were used in 8.3%, 4.6%, and 0.9% of cases, respectively.

The physicians measured the PSA level every cycle in 42.5% of the cases and every three cycles in 39.6% of the cases (figure 2A).

The number of planned cycles was three cycles for 2.9% of the respondents, six cycles for 61% of the respondents, and nine cycles for 32.4% of the respondents and until tumor progression for 8.6% of the respondents.

The physicians' responses indicated that the criteria for identifying tumor progression were an occurrence or worsening of symptoms (e.g., bone pain and reduced performance status) in 84.1%, PSA level increase in 77.6%, radiological signs of progression in 75.7%, and isotopic signs of progression in 70.1% (figure 3).

### New hormonal therapy as first-line therapy

In cases of older age, 67.9% of the participating physicians favored NHTs; in the cases of long-term efficacy of castration, low tumor grade, and absence of symptoms, 6.1%, 56.9%, and 54.1% of the physicians favored NHTs, respectively (table I, figures 1, 2B, and 3).

With NHTs, tumor reassessment was typically performed after 3 months of treatment (1-12) and included PSA testing, a thoraco-abdominopelvic CT, and bone scintigraphy in 90.8%, 61.5%, and 63.3% of the cases, respectively (figure 1). Other studies, such as choline-TEP and bone and whole body MRI, were less frequently used in 10.1%, 2.8%, and 1.0% of the cases, respectively.

The physicians measured the PSA levels every 3 months in 49.5% of cases and monthly in 29.0% (figure 2B).

In clinical practice, the criteria for identifying tumor progression were occurrence or worsening of clinical symptoms (e.g., bone pain and reduced performance status) in 85.3%, documented progression with scintigraphy in 77.1%, documented radiological progression in 71.6%, and increased PSA levels in 65.1% (figure 3). The interval between tumor assessment in the patients treated with docetaxel or NHTs was every 3 months on average; there



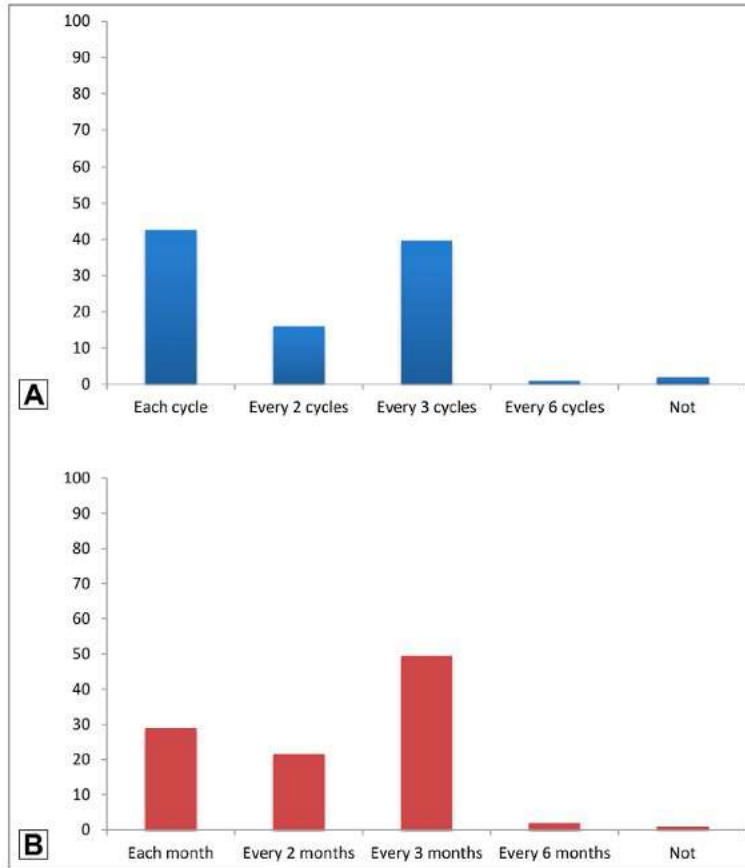


FIGURE 2  
Moment of PSA testing  
A. Under docetaxel. B. Under new hormonal therapies

was no significant difference between the two treatments ( $P = 0.014$ ).

### Discussion

To our knowledge, this is the first audit of real-life practices of experienced clinicians who treat men with mCRPC in France. Our results are consistent with existing expert consensus results regarding the two major areas of controversy concerning the treatment choice, the sequencing, and the monitoring of mCRPC patients [8].

#### Criteria of choice for the first-line therapy

The decision-making process was based on highly subjective criteria (i.e., "young age," "good performance status" and

"aggressiveness of disease"), as well as more apparently objective factors in our survey (table 1).

The St. Gallen panel did not recommend (49%), or only in a minority of selected patients (42%), docetaxel as a first-line therapy for otherwise healthy asymptomatic or minimally symptomatic men with mCRPC. The EAU guidelines favored on the other hand prescription of docetaxel for men with symptomatic disease and/or visceral metastase [9]. The definition of aggressive disease is subjective in accordance with the St. Gallen definition of high-burden disease, including the characterization of high tumor burden, rapid progression, alteration of performance status, and symptoms of discomfort (i.e., bone pain).

The objective factors influencing the decision-making process included the presence of visceral metastases, initial elevated

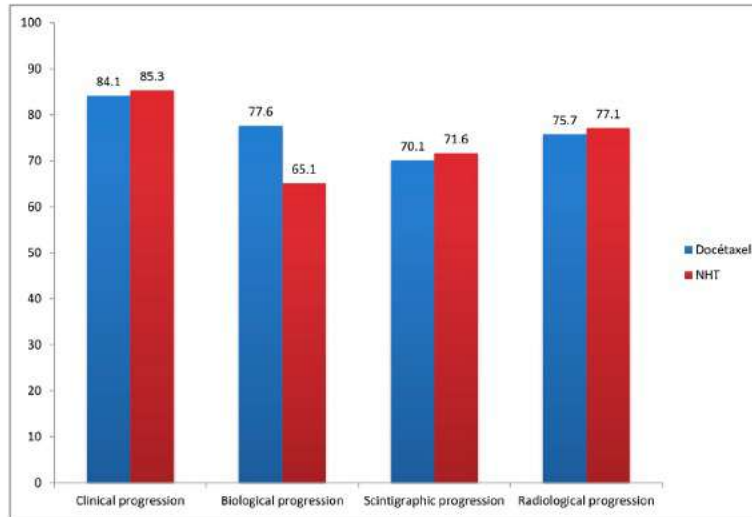


FIGURE 3  
Criteria to define tumor progression in clinical practice

tumor grade [10], the presence of a neuroendocrine component, or other poor prognostic factors described in the literature [11], including anemia [12,13], elevated alkaline phosphatase [14,15], and PSA-doubling time (PSA-DT) [14]. In the cases of measurable criteria (i.e., age, neuroendocrine component, Gleason grade, and biological variables such as PSA-DT), thresholds must be defined in the literature to help the physicians. The time of prior response to castration is also a deciding factor for clinicians. The response duration to prior hormone therapy can be estimated by the time to PSA nadir and the absolute time to castration resistance [16]. A retrospective analysis in 173 patients with mCRPC showed that the previous duration of the response to ADT is a predictor of sensitivity to next-generation androgen-receptor axis-targeted drugs [17].

Six factors, including LDH > upper limit of normal (ULN), a performance status of 2, the presence of liver metastases, albumin ≤ 4 g/dL, alkaline phosphatase > ULN, and the time from the start of initial androgen-deprivation therapy to the start of treatment ≤ 36 months, were identified to take part in a survival model, which might help physicians choose the optimal strategy, even if each factor's value in guiding treatment decisions is not well established [18].

**Modalities of assessment**

The more appropriate type of exams, the role of PSA level monitoring, and the time of assessment in patients treated with NHTs or docetaxel remain unclear. According to the St. Gallen panel's recommendation, there was a clear consensus

that imaging should be performed on men with mCRPC before starting a new line of treatment and that a CT scan of the chest thorax and abdomen-pelvis (91% of the panel) and bone scintigraphy (83% of the panel) were the best pre-therapeutic assessments [8]. Furthermore, the St. Gallen panel noted that physicians should be careful in interpreting PSA values during treatment, suggesting that treatment should not be stopped for PSA progression alone. There was a consensus (82% of the St. Gallen panel) that at least two of the three criteria (i.e., PSA progression, radiographic progression, and clinical deterioration) should be fulfilled before discontinuing treatment [8].

**Limitations**

Our declarative study presents some limitations and might not represent real practices over the long-term. The sample represent about 22% of the target population, this represents an obvious selection bias. The questionnaire is exhaustive with 22 close-questions and we have deliberately chosen to treat the most interesting points in relation to our main study objectives. We did not provide a definition for each of the factors because there was no clear definition of the subjective factors in the literature. The majority of the physicians were from three regions with a high medical density, which could be representative of the clinical practices across the entire country. The comparison of the survey results between the physicians' practices and specialties could be interesting in future studies. Prior treatment with docetaxel for metastatic castration-sensitive prostate cancer was not included as a variable influencing

treatment selection. This would appear to be a very important factor for many physicians when deciding what therapy to administer for mCRPC; however, at the moment of the survey, docetaxel was not authorized in castration-naïve patients in France.

### Conclusions

Criteria of choice for the first-line therapy and modalities of assessment appear fortunately homogeneous for French physicians but large phase III trials assessing the impact of one strategy (docetaxel first) over another (NHTs) are lacking and are urgently needed. The guidelines for the first-line management of mCRPC and especially for the assessment of the tumor response need to be developed. The prognostic model

tratification or the next-generation sequencing could assist clinical practice decisions for follow-up and monitoring and may help in clinical trial designs.

**Acknowledgments:** all the physicians who spent time to answer the questionnaire.

Dr. Eric Bauvin, Cancer Network of Midi-Pyrénées/Association des Coordinateurs de réseaux de Cancérologie (ACORESCA), Toulouse, France.  
Mrs. Laetitia Lemoine, Cancer Network of Nord-Pas de Calais (Onconord).  
Mrs Amina Bendjennat, Groupe d'Étude des Tumeurs Urogénitales (GETUG).

**Funding:** this research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

**Disclosure of interest:** the authors declare that they have no competing interest.

### Supplementary data

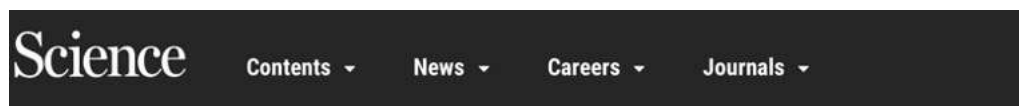
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version of *Bulletin du cancer*, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.02.002>.

### References

- [1] Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1502-12.
- [2] Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PF, et al. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2015;16:152-60.
- [3] Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med* 2014;371:424-33.
- [4] Loriot Y, Miller K, Sternberg CN, Fizazi K, De Bono JS, et al. Effect of enzalutamide on health-related quality of life, pain, and skeletal-related events in asymptomatic and minimally symptomatic, chemotherapy-naïve patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (PREVAII): results from a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:509-21.
- [5] NCCN guidelines Prostate Cancer, Version 1.2016.11/10/15<sup>o</sup> National Comprehensive Cancer Network, Inc 2015. All right reserved. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/prostate.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf).
- [6] Attard G, Parker C, Eeles RA, Schröder F, Tomlins SA, et al. Prostate cancer. *Lancet* 2016;387:70-82.
- [7] Lorente D, Mateo J, Perez-Lopez R, de Bono JS, Attard G. Sequencing of agents in castration-resistant prostate cancer. *Lancet Oncol* 2015;16:e279-92.
- [8] Gillessen S, Ormlin A, Attard G, de Bono JS, Efstathiou E, et al. Management of patients with advanced prostate cancer: recommendations of the St Gallen Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) 2015. *Ann Oncol* 2015;26:1589-604.
- [9] Comford P, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, De Santis M, Gross I, et al. EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. Part II: treatment of relapsing, metastatic, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2016.
- [10] Van Soest RJ, de Morière ES, Shen L, Tannock IF, Eisenberger MA, et al. Initial biopsy Gleason score as a predictive marker for survival benefit in patients with castration-resistant prostate cancer treated with docetaxel: data from the TAX327 study. *Eur Urol* 2014;66:330-6.
- [11] Maroto P, Solsona E, Gallardo E, Mellado B, Morote J, et al. Expert opinion on first-line therapy in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;100:127-36.
- [12] Halabi S, Small EJ, Kantoff PW, Kattan MW, Kaplan EB, et al. Prognostic model for predicting survival in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1232-7.
- [13] Armstrong AJ, Tannock IF, de Wit R, George DJ, Eisenberger M, et al. The development of risk groups in men with metastatic castration-resistant prostate cancer based on risk factors for PSA decline and survival. *Eur J Cancer* 2010;46:517-25.
- [14] Svatek R, Karakiewicz PI, Shulman M, Karam J, Perrotte P, et al. Pre-treatment nomogram for disease-specific survival of patients with chemotherapy-naïve androgen independent prostate cancer. *Eur Urol* 2006;49:666-74.
- [15] Kamiya N, Suzuki H, Yano M, Endo T, Takano M, et al. Implications of serum bone turnover markers in prostate cancer patients with bone metastasis. *Urology* 2010;75:1446-51.
- [16] Choueiri TK, Xie W, D'Amico AV, Ross RW, Hu JC, et al. Time to prostate-specific antigen nadir independently predicts overall survival in patients who have metastatic hormone-sensitive prostate cancer treated with androgen-deprivation therapy. *Cancer* 2009;115:981-7.
- [17] Loriot Y, Eymard J-C, Patrikidou A, Illeana E, Massard C, et al. Prior long response to androgen deprivation predicts response to next-generation androgen receptor axis targeted drugs in castration resistant prostate cancer. *Eur J Cancer* 2015;51:1946-52.
- [18] Chi KN, Kheoh T, Ryan CJ, Molina A, Bellmunt J, et al. A prognostic index model for predicting overall survival in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer treated with abiraterone acetate after docetaxel. *Ann Oncol* 2016;27:454-60.



## **Annexe 2 : eLetter dans le magazine Science intitulée : « Neuropilins, from cancer to COVID-19 »**



### **RE: Neuropilins, from cancer to COVID-19**

**Anthony Turpin**, MD, Oncologist,

University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020-U1277-CANTHER Unit, F-59000 Lille, France

Other Contributors:

Martine Duterque-Coquillaud, Researcher, PhD.,

University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020-U1277-CANTHER Unit, F-59000 Lille, France

(6 December 2020)

The results obtained by Cantuti-Castelvetri et al. and Daly et al. open up new perspectives in the fight of COVID-19. Indeed, both articles revealed that Neuropilin transmembrane receptors (NRPs) interact with the SARS-CoV-2 virus and potentiate its entry and infectivity. This matters because NRPs are already known in the oncology field, and these discoveries open avenues to promising repurposing therapies.

Both articles (1, 2) focus on the first step of SARS-CoV-2 infection involving the viral Spike (S) protein for host cell attachment and entry and which is cleaved by the host protease furin into two associated polypeptides: S1 and S2. Daly et al. showed that the C-terminus of the S1 protein named CendR binds to NRP, while Cantuti-Castelvetri et al. demonstrated that NRP1 significantly potentiates SARS-CoV-2 infectivity by using a SARS-CoV-2 mutant with an altered furin cleavage site or by blocking the extracellular b1b2-domain of NRP1 known to bind to CendR peptides. NRPs are transmembrane proteins involved in a number of physiological processes, but have also been associated with growth, invasiveness and poor prognosis in many cancers, and their high expression in tumors, blood vessels and immune cells makes them relevant oncology targets (3). This means that drugs already developed in the context of oncology could be considered as antiviral strategy as they may be able to block SARS-Cov-2 cell entry mechanism mediated by NRP1: for instance a humanized monoclonal antibody specific for extracellular domains b1 and b2 of NRP1 named vesencumab targets precisely the domains which interact with the SARS-CoV-2 and which potentiate virus cell entry and infectivity. The treatment was well tolerated in the dose-escalation trials with premedication including dexamethasone (4).

While this will hopefully deliver positive results in the fight against the pandemic, it also reminds us of the value of multidisciplinary and integrated research.

Acknowledgements: MDC and AT are very grateful to Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (COVID202001321).

#### REFERENCES

1. L. Cantuti-Castelvetri et al., Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*. 370, 856-860 (2020).
2. J. L. Daly et al., Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*. 370, 861-865 (2020).
3. A. Dumond, G. Pagès, Neuropilins, as Relevant Oncology Target: Their Role in the Tumoral Microenvironment. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 662 (2020)
4. C. D. Weekes et al., A phase I study of the human monoclonal anti-NRP1 antibody MNRP1685A in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 32, 653-660 (2014).



## **Annexe 3 : Revue de la littérature concernant la prise en charge des métastases osseuses et les nouveaux enjeux, publiée dans *Translational Oncology* en 2020, écrite pendant la thèse**

### **Bone Metastasis: Current State of Play**

**Anthony Turpin<sup>\*,†</sup>, Martine Duterque-Coquillaud<sup>\*</sup> and Marie-Hélène Vieillard<sup>‡,§</sup>**

<sup>\*</sup>University of Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 – Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59021 Lille, France; <sup>†</sup>Department of Medical Oncology, CHU Lille, 59037 Lille, France; <sup>‡</sup>Department of Rheumatology, CHU de Lille, 59037 Lille, France; <sup>§</sup>Department of supportive care, Centre Oscar Lambret, 59000 Lille, France

#### **Abstract**

Bone metastasis (BM) in cancer remains a critical issue because of its associated clinical and biological complications. Moreover, BM can alter the quality of life and survival rate of cancer patients. Growing evidence suggests that bones are a fertile ground for the development of metastasis through a “vicious circle” of bone resorption/formation and tumor growth. This review aims to outline the current major issues in the diagnosis and management of BM in the most common types of osteotropic cancers and describe the mechanisms and effects of BM. First, we discuss the incidence of BM through the following questions: Are we witnessing an increase in incidence, and are we now better equipped with modern imaging techniques? Is the advent of efficient bone resorption inhibitors affecting the bigger picture of BM management? Second, we discuss the potential effects of cancer progression and well-prescribed drugs, such as multitarget tyrosine kinase inhibitors, inhibitors of the mammalian target of rapamycin, and immune checkpoint inhibitors, on BM. Finally, we examine the duality of the effects of some therapies that may help in cancer treatment but may also contribute to further BM.

*Translational Oncology (2020) 13, 308–320*

#### **Introduction**

Bone metastasis (BM) can occur during the course of the disease in many solid tumors. BM typically occurs in breast, lung, prostate, thyroid, and renal carcinoma, and the bone is the third most prevalent site of metastasis after the liver and lung [1,2]. However, this category of “osteotropic” cancers is now largely out-of-date, and BM is commonly identified in many other solid tumors, such as melanoma, gastrointestinal tumors, and head and neck cancers [3]. The management of BM has also gained much interest among clinicians,

because BM has major functional effects and can affect the quality of life of patients. BM may cause complications such as pain, nerve root or spine cord compression, vertebral or peripheral fractures, hypercalcemia, and bone marrow infiltration that leads to cytopenia [2,4,5]. These events also affect patient survival rates [6].

Many focal treatments that use bone resorption inhibitors (BRIs) can prevent or reduce the occurrence of BM complications. The detection of BM has also improved with the advent of imaging techniques with increased sensitivity and specificity in detecting bone lesions [7].

The results of fundamental scientific studies have also led to major breakthroughs in understanding the mechanisms underlying BM development. Bone tissue provides a good environment for metastatic tumor cells and is rich in hematopoietic cells, bone cells, and growth factors and other molecules involved in bone-homing and the growth, dormancy, and resistance of tumor cells. This bone microenvironment is also an active and fertile ground for the development of BM [8].

Address all correspondence to: Martine Duterque-Coquillaud, PhD, University of Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 – Mechanisms of Tumorigenesis and Target Therapies, Lille 59021, France. E-mail: [martine.duterque@ibl.cnrs.fr](mailto:martine.duterque@ibl.cnrs.fr)  
Received 21 October 2019; Accepted 22 October 2019

© 2019 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Neoplasia Press, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).  
1936-5233/19  
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.10.012>

Systemic anticancer treatments such as chemotherapy, targeted therapy, and immune checkpoint therapy can increase the survival rate of patients. However, the mechanisms of action of these therapies also affect the bone microenvironment, and these effects may result in the development of a fertile ground for certain tumor cells, the proliferation of which can lead to BM development.

This review aims to outline the current state of knowledge on BM, particularly its epidemiology, diagnosis, treatment, and underlying molecular mechanisms.

### Epidemiology of Bone Metastasis

We examined the epidemiology of BM in the most common types of osteotropic cancers, such as prostate, breast, lung, and renal cell carcinoma, using the results of recent major phase III clinical trials and meta-analyses that have been published over the past 10 years (Table 1). Most of the phase III trials did not consider the BM incidence rate, but among those studies that did, we found an increase in the detection of BM during cancer progression.

#### Breast Cancer

A meta-analysis and review of literature was carried out by Body et al., in 2017 to estimate the proportion of breast cancer patients who later developed BM [9]. Their study collected data from >175,000 patients included in clinical trials. Based on the data, 12% of patients with stage I–III breast cancer who had undergone surgery developed BM. Their study also showed that the incidence of BM in patients who developed metastases during follow-up was 55%. This was lower than the rate reported in an autopsy series [10], in which 58% of patients with metastatic breast cancer from the outset had BM [10]. An even higher value of 73% was reported in a monocentric series of 264 patients after considering those treated across various treatment lines [11].

Recent chemotherapy trials, such as the CLEOPATRA trial [12] of first-line treatment and the EMILIA trial of second-line treatment, stratified patients according to the presence of visceral and nonvisceral disease (i.e., presence of BM) [13]. In the EMBRACE trial for eribulin as third-line treatment for metastatic breast cancer, 60% of patients had BM [14].

Recent trials of hormone therapy and anti-cyclin-dependent kinases—PALOMA-1, -2, and -3—stratified patients according to the presence of “bone-only disease,” and the incidence of BM was around 20% at baseline [15–17]. In the BOLERO-2 study, which aimed to evaluate the potential of using mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors in combination with exemestane in a subsequent line after unsuccessful first-line hormone therapy with aromatase inhibitors, the BM incidence rate at the start of the study was higher, at 76% [18]. In contrast, a recent trial of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in patients with BRCA mutations (the OlympiAD trial) showed a low incidence rate of exclusive BM after at least two lines of treatment, but the patients were “triple-negative” patients with high rates of visceral metastases [19].

#### Prostate Cancer

The BM incidence rate is particularly high in patients with metastatic prostate cancer. However, relevant data from all recent trials are not available.

The GETUG-AFU 15 trial found an 81% incidence rate of BM in patients with metastatic castration-naïve prostate cancer [20], whereas the STAMPEDE trial found a rate of 54% [21]; however, the

proportion of BM patients was not indicated in the CHARTED trial [22]. More recently, in a similar population, the phase III LATTITUDE trial on the efficacy of abiraterone in combination with first-line hormone therapy found BM in >97% of patients [23].

In patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC), the BM incidence rate is well described and appears to be an important focus in new-generation hormone therapy trials [24–28].

#### Lung Cancer

The BM incidence rate is also high in lung cancer (20–40%), with BM being increasingly detected owing to recent progress in imaging technology [29]. BM is diagnosed early in 80% of cases but can also occur at a later stage during follow-up [29].

In non–small-cell lung cancer (NSCLC), adenocarcinoma is the histological type most commonly associated with the onset of BM [30]. However, most first-line clinical trials have not documented the BM incidence rate. These trials include those testing epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors such as gefitinib [31,32], anaplastic lymphoma kinase inhibitors such as crizotinib [33] or alectinib [34], and—more recently—third-generation EGFR inhibitors such as osimertinib [35]. In contrast, the incidence rate of brain metastasis was more commonly documented in such trials. Only the EURTAC trial, a randomized phase III study comparing erlotinib with standard platinum-based chemotherapy as the first-line treatment in EGFR-mutant NSCLC, reported that 33% of patients had BM at baseline [36]. Trials testing EGFR inhibitors in advanced NSCLC also did not specify BM incidence rates, nor did trials testing crizotinib in advanced lung cancers [37] or maintenance chemotherapy trials such as the AVAPERL trial for bevacizumab [38] or the PARAMOUNT trial for pemetrexed [39].

Regarding immune checkpoint inhibitors, the following four recently published randomized phase III trials also did not document BM incidence rates: CheckMate 017 [40], CheckMate 057 [41], KEYNOTE-010 [42], and OAK [43].

Small-cell lung cancer is also associated with BM incidence, although data are limited. In one study, the diagnostic rate of BM was 26.7% in a retrospective cohort of 363 patients in Greece [44].

#### Renal Cell Carcinoma

The bone is the most common metastatic site in renal cell carcinoma [45]. Recent trials have found an increase in the diagnostic rate of BM between the first and third lines of treatment in renal cell carcinoma. The value started at 17.4% in patients with BM at baseline [46], increasing to 22.4% in the second line of treatment in the METEOR trial [47], and reached 38.5% in the third line of treatment in a trial comparing dovitinib with sorafenib in patients pretreated with targeted sunitinib antiangiogenic therapy [48].

### Improvement in the Detection and Management of BM

Although it appears that clinical trials to date indicate that BM incidence increases during cancer progression, this may in part be due to the increased sensitivity of imaging techniques in detecting bone lesions. This increased sensitivity along with the increased use of BRIs and a more systematic search for the clinical consequences of BM has made it possible to refine clinical procedures for improving patient treatment.



**Table 1.** Updated Data of BM Rates from Clinical Trials and Meta-analysis on Most Common Osteotropic Cancers.

Primary Site	Patients and Trial Characteristics	Line of Treatment	BM Rate	Bone Events (SRE, SSE)	Study Ref
BREAST	Randomized phase 2 study. Comparing palbociclib + letrozole vs letrozole alone. N = 167 patients, postmenopausal women with advanced estrogen receptor-positive and HER2-negative breast cancer who had not received any systemic treatment for their advanced disease.	Line 1	20% palbociclib + letrozole vs. 15% letrozole (bone only)	NS	PALOMA-1 Hiro, 2015 [15]
	Randomized phase 3 study. Comparing palbociclib + letrozole or placebo + letrozole. N = 666 patients, postmenopausal women with ER-positive, HER2-negative breast cancer, who had not had prior treatment for advanced disease.	Line 1	23.2% palbociclib-letrozole vs. 21.6% letrozole (bone only)	NS	PALOMA-2 Hiro, 2016 [16]
	Randomized phase 3 study. Comparing pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel with placebo, trastuzumab, and docetaxel. N = 808 patients, metastatic breast cancer who had not received previous chemotherapy or anti-HER2 therapy for their metastatic disease to receive the pertuzumab combination or the placebo combination.	Line 1	12% "nonvisceral"	NS	CLEOPATRA Swain, 2015 [17]
	Randomized phase 3 study. Comparing fulvestrant plus palbociclib to fulvestrant plus placebo. N = 523 patients, women aged 18 years or older with hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that had progressed on previous endocrine therapy.	L2	22% fulvestrant + palbociclib vs. 21% fulvestrant + placebo (bone only)	NS	PALOMA-3 Giovannini, 2016 [17]
	Randomized phase 3 study. Comparing everolimus and exemestane versus exemestane and placebo. N = 724 patients, with hormone-receptor-positive advanced breast cancer who had recurrence or progression while receiving previous therapy with a nonsteroidal aromatase inhibitor in the adjuvant setting or to treat advanced disease (or both).	L2	76%	NS	BOHERC-2 Basile, 2012 [18]
	Randomized phase 3 study. Comparing either trastuzumab, emtansine or capecitabine and lapatinib. N = 893 patients, women aged 18 years or older with HER2-positive, locally advanced or metastatic breast cancer previously treated with trastuzumab and a taxane.	>L2	3.2% "nonvisceral"	NS	EMILIA Deras V, 2017 [19]
	Randomized phase 3 trial. Comparing abiraterone to standard therapy with single-agent chemotherapy of the physician's choice (capecitabine, eribulin, or vinorelbine). N = 202 patients, with a germline BRCA mutation and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2)-negative metastatic breast cancer who had received no more than two previous chemotherapy regimens for metastatic disease.	>L2	7.8% abiraterone vs. 6.2% placebo (bone only)	NS	OLYMPIAD Robson, 2017 [19]
	Randomized phase 3 study. Comparing eribulin mesylate to Toremisen physician choice. N = 702 patients, women with locally recurrent or metastatic breast cancer who had received between two and five previous chemotherapy regimens (two or more for advanced disease), including an antibody and a taxane, unless contraindicated.	>L2	60%	NS	EMBRACE Costa, 2011 [14]
	Randomized phase 3 study. Comparing androgen deprivation therapy (ADT) plus docetaxel to ADT alone. N = 192 patients.	Castration-naïve	81%	NS	GETUG 15 Goss, 2013 [20]
	Randomized phase 3 study. Comparing standard of care only (SOC-only control), standard of care plus abiraterone acid (SOC + ZA), standard of care plus docetaxel (SOC + Doc), or standard of care with both abiraterone acid and docetaxel (SOC + ZA + Doc). N = 292 patients. It recruits men with high-risk, locally advanced, metastatic, or recurrent prostate cancer who are starting first-line long-term hormone therapy.	Castration-naïve	54%	NS	STAMPEDE James MD, 2016 [21]
Randomized phase 3 study. Comparing ADT plus docetaxel to ADT alone. N = 790 patients.	Castration-naïve	NS	NS	CHAARTED Sweeney, 2015 [22]	
Randomized phase 3 study. Comparing ADT plus abiraterone acetate plus prednisone (abiraterone group) to ADT plus dual placebo (the placebo group). N = 1199 patients.	Castration-naïve	97% abiraterone group vs. 98% placebo group	15% bone pain and 2% spinal cord compression	LATITUDE Hosari, 2017 [23]	
Randomized phase 3 trial.	Castration-resistant	NS	NS	COU-AA-302	

**TABLE 3**  
(continued)

Primary Site	Patients and Trial Characteristics	Line of Treatment	BM Rate	Bone Events (SRE, SSE)	Study Ref	
PROSTATE	Comparing abiraterone acetate plus prednisone (abiraterone group) to placebo plus prednisone (placebo group). N = 1088 asymptomatic or mildly symptomatic patients with chemotherapy-naïve prostate cancer.	Castration-resistant	88.7% arm C20 vs. 88.9 arm C25	NS	HYPSAN Outard, 2017 [25]	
	Randomized phase 3 trial. Comparing cabazitaxel 20 mg/m <sup>2</sup> plus daily prednisone to 25 mg/m <sup>2</sup> plus daily prednisone. N = 1168 patients.	Castration-resistant	90% in both arms	29% (abiraterone) vs. 25% (placebo)	COU-AA-301 Hosari, Laner, 2012 [26]	
	Randomized phase 3 study. Comparing prednisone + abiraterone acetate to placebo. N = 1195 patients, with metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel.	Castration-resistant	9.2% included 38% of patients with >20 lesions	NS	AFFIRM Sier HI, NEJM, 2012 [27]	
	Randomized phase 3 study. Comparing oral enzalutamide to placebo. N = 1199 men with castration-resistant prostate cancer after docetaxel.	Castration-resistant	85.6% (87% enzalutamide vs. 80% cabazitaxel)	45%	TROPIC de Bonn, 2010 [28]	
	Randomized phase 3 study. Comparing enzalutamide to cabazitaxel 25 mg/m <sup>2</sup> . N = 755 patients, men with metastatic castration-resistant prostate cancer who had received previous hormone therapy, but whose disease had progressed during or after treatment with a docetaxel-containing regimen.	Castration-resistant	NSCLC Line 1	3.9%	NS	FURTAAC Roehl, 2012 [36]
	Randomized phase 2 study. Comparing oral eribulin 150 mg per day or 3-week cycles of standard intravenous chemotherapy of cisplatin plus docetaxel or gemtuzumab. Carboplatin with docetaxel with gemtuzumab was allowed in patients unable to have cisplatin.	NSCLC Line 1	NS	NS	North-East Japan Study Group Matsuno, 2010 [31,32]	
	N = 174 patients with NSCLC and EGFR mutations with no history of chemotherapy for metastatic disease.	Line 1	NS	NS	PROFILE1014 Solomon, 2014 [33]	
	Comparing gefitinib or carboplatin-paclitaxel. N = 230 patients with metastatic NSCLC and EGFR mutations who had not previously received chemotherapy to receive gefitinib or carboplatin-paclitaxel.	Line 1	NS	NS	J-ALEX Hida, 2017 [34]	
	Randomized phase 3 study. Comparing oral crizotinib to intravenous chemotherapy pemetrexed, plus either cisplatin, or carboplatin. N = 543 patients with advanced ALK-positive non-squamous NSCLC who had received no previous systemic treatment for advanced disease.	Line 1	NS	NS	FLAURA Soria, 2018 [35]	
	Randomized phase 3 study. Comparing maintenance pemetrexed plus best supportive care or with placebo plus BSC. N = 1022 patients with advanced non-squamous NSCLC with no previous systemic chemotherapy for lung cancer. 399 participated in the induction phase. Of these, 539 patients were randomly assigned.	>Line 1	NS	NS	NCT00952451 Shaw, 2013 [37]	
• CheckMate 017, Randomized phase 3 study. Comparing nivolumab to docetaxel. N = 272 patients, with stage IIIB or IV squamous-cell NSCLC who had disease recurrence after one prior platinum-containing regimen were eligible.	>Line 1	NS	NS	AVAPERL Beldi, 2013 [38]		
Comparing maintenance pemetrexed plus best supportive care or with placebo plus BSC. N = 1022 patients with advanced non-squamous NSCLC with no previous systemic chemotherapy for lung cancer. 399 participated in the induction phase. Of these, 539 patients were randomly assigned.	>Line 1	NS	NS	PARAMOUNT Pat-Aris, 2012 [39]		
• CheckMate 017, Randomized phase 3 study. Comparing nivolumab to docetaxel. N = 272 patients, with stage IIIB or IV squamous-cell NSCLC who had disease recurrence after one prior platinum-containing regimen were eligible.	>Line 1	NS	NS	CheckMate 017 Bishara, 2015 [40]		

(continued on next page)

**TABLE 1**  
(continued)

Primary Site	Patients and Trial Characteristics	Line of Treatment	BM Rate	Bone Event (SRE, SSE)	Study Ref
	<ul style="list-style-type: none"> <li>CheckMate 057: Randomized phase 3 study. Patients with NSCLC that had progressed during or after platinum-based doublet chemotherapy to receive nivolumab or docetaxel.</li> <li>Of 582 randomized patients, 287 were treated with nivolumab and 268 were treated with docetaxel.</li> <li>KEYNOTE-010: Randomized phase 2/3 study. Patients with previously treated NSCLC with PD-L1 expression on at least 1% of tumor cells were randomly assigned (1:1:1) to receive pembrolizumab 2 mg/kg, pembrolizumab 10 mg/kg, or docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> every 3 weeks.</li> <li>N = 1034 patients: 345 allocated to pembrolizumab 2 mg/kg, 346 allocated to pembrolizumab 10 mg/kg, and 343 allocated to docetaxel we enrolled.</li> <li>OAK: Randomized phase 3 study. N = 1225 patients recruited who had squamous or nonsquamous NSCLC, who had received one to two previous cytotoxic chemotherapy regimens (one or more platinum-based combination therapies) for stage IIB or IV NSCLC. 425 patients were randomly assigned to receive avelumab, and 425 patients were assigned to receive docetaxel.</li> </ul>				CheckMate 057 Borghesi, 2015 [41]  KEYNOTE-010 Herbst, 2016 [42]  OAK Rimney, 2017 [43]
<b>KIDNEY</b>	Randomized phase 3 study. Comparing the efficacy and safety of pazopanib and sunitinib as first-line therapy. N = 1110 patients with clear-cell, metastatic renal cell carcinoma, in a 1:1 ratio, to receive a continuous dose of pazopanib (557 patients) or sunitinib (553 patients). Double-blind cross-over study evaluated patient preference for pazopanib or sunitinib and the influence of health-related quality of life (HRQL) and safety factors on their stated preference. N = 169 patients with metastatic RCC were randomly assigned to pazopanib then sunitinib or the reverse sequence.	Line 1	20% pazopanib vs. 15% sunitinib	NS	COMPARZ Mozzer, 2013 [40]
	Randomized phase 3 study. Comparing axitinib with sorafenib as second-line therapy in patients with metastatic renal cell cancer. N = 723 patients, with clear-cell carcinoma who progressed despite first-line therapy containing sunitinib, bevacizumab plus interferon- $\alpha$ , temsirolimus, or cytokines.	Line 2	18%	NS	AXIS Rini, 2011 [50]
	Randomized phase 3 study. Comparing nivolumab with everolimus in patients with RCC who had received previous treatment. N = 821 patients with advanced clear-cell renal cell carcinoma for which they had received previous treatment with one or two regimens of antiangiogenic therapy.	Line 2	18%	NS	Nivolumab vs. Everolimus Mozzer, 2015 [31]
	Randomized phase 3 study. Comparing the efficacy and safety of cabozantinib versus the mTOR inhibitor everolimus. N = 658 patients with advanced renal cell carcinoma who progressed after previous VEGFR tyrosine-kinase inhibitor treatment.	Line 3	23% Cabozantinib vs. 20% everolimus	NS	METEOR TK Choueiri, 2016 [47]
	Randomized phase 3 study. Comparing dovitinib with sorafenib as a third-line targeted therapy in metastatic RCC. N = 570 patients with clear-cell metastatic RCC who received one prior VEGF-targeted therapy and one prior mTOR inhibitor.	Line 3	35% dovitinib vs 42% sorafenib	NS	GOLD RCC Mozzer, 2014 [48]

BM, bone metastasis; EGFR, epidermal growth factor receptor; mTOR, mammalian target of rapamycin; NS, not specified; NSCLC, non-small-cell lung cancer; RCC, renal cell carcinoma; SRE, skeletal-related event; SSE, symptomatic skeletal event; VEGF, vascular endothelial growth factor.

### Awareness of the Clinical Consequences of BM

Skeletal-related events (SREs) include the occurrence of pain, need for radiotherapy, hypercalcemia, pathological fracture, and spinal cord or nerve root compression [2]. In clinical studies, SREs are relevant methodological criteria for assessing the effects of BRIs. Meanwhile, symptomatic skeletal events (SSEs) include a symptomatic fracture, need for surgery or bone radiotherapy for symptoms, and symptomatic spinal compression [52]. SSEs require careful detection because when they present as clinical consequences of BM, they can mask the diagnosis of asymptomatic vertebral fractures that can lead to musculoskeletal disorders and increase the risk of new fractures and falls. SSEs and SREs are common in BM during cancer progression and can impair the patients' quality of life [2,4,5]. The major complications of BM typically occur early during cancer progression—every 3–6 months on average if the bone disease is not treated with BRIs [2]. These complications cluster around periods of tumor progression, becoming more frequent as the disease progresses and treatment options decrease. More than 80% of BM are located in the axial skeleton; the vertebrae, ribs, and hips are therefore the sites most frequently affected during SREs [4]. The percentage of patients who experience SREs varies depending on the cancer type. In a previous breast cancer series, SREs were present in 68% of patients in general [53], 49% of patients with metastatic prostate cancer [54], and 48% of patients with lung cancer [55]. The median number of SREs per patient per year was reported to be 3.7 for breast cancer [53], 1.47 for metastatic prostate cancer [54], and 2.71 for lung cancer and other solid tumors [55].

Regarding the most recent data for prostate cancer, in the COU-AA-301 trial, approximately 90% of patients in each arm had BM at baseline and showed similar pain scores [26]. In new-generation hormone therapy trials of abiraterone, the incidence of SREs was 29% in patients receiving the drug, higher than the incidence of 33% observed in the placebo group, and the time to onset of SREs was significantly longer among those receiving the drug (median, 25.0 vs. 20.3 months;  $p = 0.0001$ ) [28]. In chemotherapy trials such as the TROPIC trial, which evaluated the effects of cabazitaxel after previous treatment with docetaxel, the BM incidence rate was 83.6% and the SRE rate was 45% [28].

For breast cancer, recent trials have not evaluated the occurrence of SREs. Bone pain was observed in < 10% of cases, as a side effect of treatment, and was not considered as SREs or SSEs.

In a study on small-cell lung cancer, the prognosis of patients with an early onset of BM was worse than that of those with a late onset ( $p = 0.015$ ). However, the SRE rate was similar in both groups: 20.8% in those with an early onset and 20.6% in those with a late onset [44]. In a meta-analysis, the median survival time of patients with BM and subsequent SREs was 7 months [56].

### Evolution of Imaging Techniques

The rate of BM detection has improved considerably due to the improvement in imaging techniques. Bone tissue is not included in the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, as bone evaluation is difficult because of the varying forms that bone metastatic disease can take. Each imaging technique has its own proposed criteria for evaluating BM; bone condensation of lytic lesions in computed tomography (CT), fat colonization of bone lesions in magnetic resonance imaging (MRI), and decreased standardized uptake values in metabolic imaging can all be considered good markers of changes

in bone. However, the type of BM can differ for the same type of cancer. In breast cancer, for example, BM can be lytic or mixed. In addition, while BM may appear to be heterogeneous at baseline, each lesion can progress differently during treatment. There are also no guidelines and consensual criteria for the morphological evaluation of BM burden, neither at diagnosis nor at evaluation during treatment. Currently, there is no single reliable imaging technique that can detect and evaluate all types of BM in all types of cancer [57].

In prostate cancer, choline positron emission tomography (choline-PET), MRI, and prostate-specific membrane antigen–based positron emission tomography (PSMA-PET) allow better detection of all metastases, especially BM [7,58]. In a meta-analysis on advanced prostate cancer, Shen et al. showed that MRI (97%) was superior to choline-PET (91%) and bone scan (79%) in terms of sensitivity of detection. MRI showed a specificity of detection of 95%; choline-PET, 99%; and bone scan, 82% [59]. With other cancers, irrespective of whether they were osteotropic, the use of combined imaging techniques led to the same results [59]. In another study of 123 patients who experienced a relapse in prostate cancer, PSMA-PET showed a higher detection rate than choline-PET/CT for bone lesions (98% vs. 64%), although ultimately there were mismatches for both [60]. Nevertheless, the evaluation of bone tumor response in imaging remains a topic of discussion in prostate cancer, because no single imaging technique is consistently superior in detecting bone metastatic disease across all tumor types and clinical scenarios [61].

### Efficacy of Bone Resorption Inhibitors

BRIs have been used to limit the clinical consequences of BM and currently form part of the clinical routine [62]. Denosumab has been found to be noninferior to zoledronic acid (ZA) in delaying time to the first on-study SRE (hazard ratio [HR], 0.84; 95% confidence interval [CI], 0.71–0.98;  $p = 0.0007$ ) in patients with advanced cancer and BM (excluding breast and prostate cancer) or myeloma [63].

An ad hoc analysis of the outcomes of a previous study showed that denosumab significantly delayed the time to the first on-study SRE (HR, 0.81; 95% CI, 0.68–0.96) and the time to the first and subsequent SREs (rate ratio, 0.85; 95% CI, 0.72–1.00), compared with ZA, in a subgroup of 1597 patients with solid tumors (excluding those with multiple myelomas) [64].

For prostate cancer, in a trial by Fizazi et al., denosumab showed an 18% better median time to onset of the first bone event than did ZA, suggesting its use for solid tumors [65]. Denosumab also reduced the risk of complications of either SREs or SSEs in mCRPC [66].

For breast cancer, denosumab was superior to ZA in delaying the time to the first on-study SRE (HR, 0.82; 95% CI, 0.71–0.95;  $p = 0.01$ ) and the time to the first and subsequent on-study SREs (rate ratio, 0.77; 95% CI, 0.66–0.89;  $p = 0.001$ ) [67].

The use of BRIs in current anticancer treatments has been shown to cause bone remodeling and may also affect survival [68]. In an exploratory analysis of Henry et al.'s trial, denosumab was found to be associated with better overall survival in metastatic lung cancer than was ZA [69].

### Occurrence of Bone Metastasis during Cancer Follow-Up

In US registries (Oncology Services Comprehensive Electronic Records; 569,000 patients, 52 cancer centers), the cumulative incidence of BM, including that for all solid tumors and stages, was

2.9% at 30 days, 4.8% at 1 year, 5.6% at 2 years, 6.9% at 5 years, and 8.4% at 10 years. The incidence varied significantly by tumor type, with the highest incidence of BM in prostate cancer (18–29%), followed by lung (10.4–12.9%), kidney (5.8–9.9%), and breast cancer (3.4–8.1%) [70]. A review by Hernandez et al. summarizes the BM incidence rates during cancer progression [70].

A previous study revealed that in breast cancer with a longer follow-up, the proportion of patients developing BM increased over time due to the natural course of the disease and prolonged survival [71]. As mentioned above, Body et al. confirmed that among patients who developed metastatic disease during follow-up, 55% had BM [9]. The exclusive bone diseases in breast cancer were predominantly of the luminal A phenotypes, with strong hormone receptor over-expression, luminal B/HER2-, and luminal B/HER2+ features. The difference in terms of exclusive bone disease was significant in triple-negative and exclusive HER2+ breast cancer [71]. Significant differences in exclusive bone disease according to age at diagnosis (between <65 years and >65 years, in favor of older subjects) and initial lymph node status were also found. A retrospective study by Gerratana et al. supports the hypothesis that in addition to holding a potential organotropism, the immunophenotype (luminal A, B, HER2+ or triple negative) is the main driver of outcome [72].

Another explanation for the increase in BM incidence during follow-up could be that the bone itself contributes to metastatic phenomena through bone homing or, on the contrary, the bone itself could be involved in mechanisms of resistance to cancer therapies.

### Appearance of Further Bone Metastasis

#### *Interactions between the Bone Microenvironment and Primary Tumor*

The hypothesis of a bone-induced “vicious circle” has been used to describe how tumor cells interact with the bone microenvironment to cause destruction of the bone, which in itself creates a fertile ground for tumor growth [61].

Tumor cells destroy the virtuous cycle of bone remodeling by stimulating osteoclast differentiation and activity through secretion of interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ), monocyte colony-stimulating factor (M-CSF), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Thus, the destruction of the bone matrix allows the release of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , insulin-like growth factor, fibroblast growth factor, bone metalloproteinases, and platelet-derived growth factor (PDGF), which are pro-tumor growth factors. Bone metastatic cells also influence osteoblast activity by stimulating the production of the parathormone-related protein, IL-1, IL-6, prostaglandin E<sub>2</sub>, TNF $\alpha$ , endothelin-1, bone metalloproteinase, and various growth factors. In turn, osteoblasts secrete factors that stimulate osteoclastogenesis, including the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), M-CSF, and IL-6 [73]. The overexpression of RANKL then results in the increased formation, activation, and survival of osteoclasts, thereby improving bone resorption [74].

Eventually, newly formed mineralized bone matrix and osteoblasts become entrapped and differentiated into osteocytes, the most abundant cells of bone tissue. Osteocytes modulate bone turnover by regulating osteoblasts and their functions through the secretion of RANKL, sclerostin, and Dickkopf-related protein 1 [61].

Another major player in this vicious circle is the MET receptor. One of the first studies on BM in prostate cancer that investigated the role of

MET and its main ligand, the hepatocyte growth factor (HGF), was the Knudsen study, which showed a significant increase in MET expression in BM and an inverse correlation between MET and androgen receptor expression. The authors of the study analyzed 90 prostatectomy specimens and found that MET was expressed in half of the primary cancers and in all metastases [75]. Another study by Grano et al. described the expression and roles of HGF/MET binding in osteoblasts and osteoclasts. The activation of MET increased the intracellular calcium levels and promoted Src phosphorylation in osteoclasts, whereas the activation of MET induced cell cycle progression in osteoblasts. This finding suggests that the HGF ligand is a coupling factor for osteoblasts and osteoclasts [76].

Finally, tumor-derived exosomes were recently shown to prepare a favorable microenvironment at future metastasis sites and to mediate nonrandom patterns of metastasis [77].

#### *Role of Anticancer Therapies*

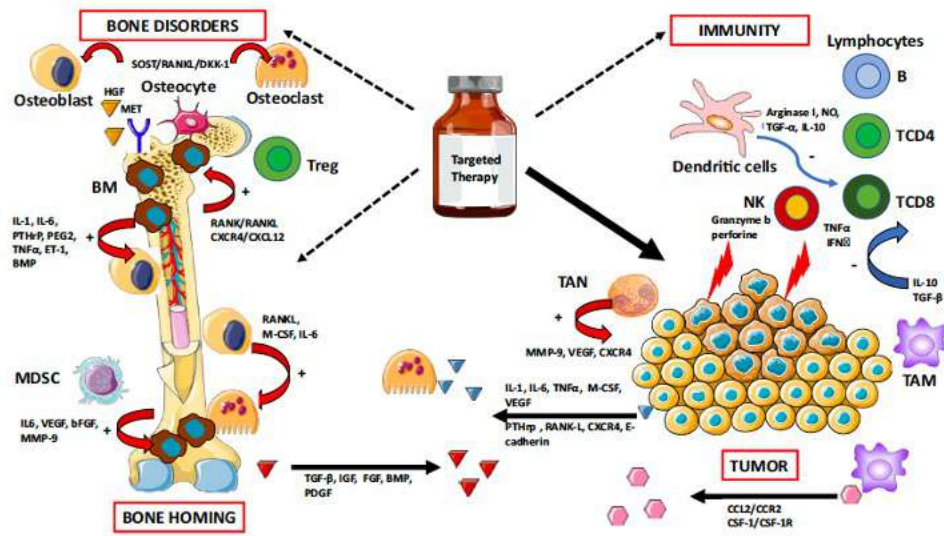
Conventional cytotoxic chemotherapy has a limited effect on bone tissue, while targeted therapies could have a direct effect on bone remodeling [63]. This raises the question of a possible bone-induced resistance against targeted therapies or, in contrast, further BM induced by targeted therapies via the reinduction of the “vicious cycle” (Figure 1).

*Multitarget Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs).* TKIs prescribed in melanoma (vemurafenib and dabrafenib) and NSCLC (erlotinib and crizotinib) cause the production of a complex “secretome” that activates multiple pathways in cancerous cells sensitive to the drugs used [78].

These TKIs also have proven antitumor efficacy in BM. In a retrospective series of NSCLC, treatment with EGFR-TKIs was an independent contributor to the occurrence of SRE throughout the course of the disease. There were fewer SREs in patients receiving EGFR-TKIs such as erlotinib or gefitinib than in patients treated with conventional chemotherapy without bisphosphonates [79].

Multitarget TKIs seem to have significant effects on bone remodeling, and the effects could differ depending on the molecules and doses used [80]. The most equivocal clinical manifestations of this bone remodeling are the osteosclerotic changes found on CT scans that show renewed ossification [81]. In patients with BM who were benefiting from gefitinib, the elevation of bone alkaline phosphatase levels or levels of bone resorption markers such as C-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP) and the phosphatase alkaline/ICTP ratio demonstrates the bone resorption inhibition and antitumor effects of gefitinib [82].

For cabozantinib, a TKI that acts against VEGFR2, AXL, and MET, the serum total alkaline phosphatase and ICTP levels were reduced by  $\geq 50\%$  in 57% of evaluable patients [83]. Cabozantinib was also tested in mCRPC patients in a phase III trial (COMET-1) [84]. Despite a negative outcome for overall survival, a better response was noted on bone scans in the cabozantinib arm (42% vs. 3% with prednisone); levels of bone biomarkers such as bone-specific alkaline phosphatase, N-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen, and C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen decreased, suggesting an active effect on BM [87]. One of the most important targets of cabozantinib is the MET receptor. Through MET/HGF binding, CD14+ monocytes differentiate into mature osteoclasts. In addition, the activation of MET can be triggered by osteoblasts and lead to the migration of tumor cells from the blood to the bone [85].



**Figure 1.** Targeted therapies and their potential effects on bone remodeling and suggested contribution to bone carcinogenesis and resistance to treatment. Targeted therapies have improved the outcomes of patients with osteotropic cancers, but the reactivation of different pathways can induce bone disorders and contribute to resistance to treatment. This remodeling of the tumor, bone microenvironment, and immunity may participate in clonal selection of metastases, both in the bone—by reactivating a “vicious circle” promoting bone homing—and in other organs. bFGF: basic fibroblast growth factor, BMP: bone marrow protein, DKK-1: Dickkopf-related protein 1, ET-1: endothelin-1, HGF: hepatocyte growth factor, IGF: insulin growth factor, IL: interleukin, IFN $\gamma$ : interferon-gamma, M-CSF: monocyte-colony stimulating factor, MDSC: myeloid-derived suppressor cells, MMP-9: matrix metalloproteinase 9, NO: nitric oxide, NK: natural killer cell, PEG2: prostaglandin E $_2$ , PDGF: platelet-derived growth factor, PTHrP: parathormone-related protein, RANK: receptor activator of nuclear factor kappa-B, RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, SOST: sclerostin, TAM: tumor-associated macrophages, TAN: tumor-associated neutrophils, TGF: transforming growth factor, TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor-alpha, Treg: regulatory T cells, VEGF: vascular endothelial growth factor. Arrows in red (+): activation process. Arrows in blue (-): inhibition process.

Collectively, the inhibition of c-MET and VEGFR2 in osteoblasts reduces the expression of RANKL and M-CSF and is associated with decreased tumor-induced osteolysis [86], suggesting that MET and VEGFR2 may be promising therapeutic targets in BM. In prostate cancer, the inhibition of VEGFR2 and MET in endothelial cells and their direct effects on osteoblasts are responsible for cabozantinib-induced tumor inhibition [87].

Some TKIs also exhibit dual effects on the bone. Imatinib, a multitarget TKI against C-KIT and PDGFR, among others, can inhibit the proliferation of osteoblasts but also activate them through the inhibition of PDGFR $\beta$  [88]. One of the options going forward could be a drug dosage based on Gobin et al.'s work on osteosarcoma cells, which showed that low doses of imatinib mesylate increase in vitro mineralization, in contrast to high doses, which decrease mineralization [89] (Figure 1).

**mTOR Inhibitors.** Deregulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway is involved in both physiological and carcinological osteoclastogenesis. mTOR is an antiapoptotic target acting downstream of M-CSF, RANKL, and TNF $\alpha$ , which are essential for the differentiation, survival, and activity of osteoclasts [90] (Figure 1).

The inhibition of the mTOR pathway leads to increased osteoprotegerin expression and apoptosis of osteoclasts, which could also induce osteoblastogenesis. In an in vitro study of murine and human breast cancer lines, everolimus showed an osteoprotective effect [91]. Among clinical trials on breast cancer, the BOLERO-2

trial evaluated everolimus in combination with exemestane after failure of a first-line hormone therapy with aromatase inhibitors. After 18 months, the incidence of bone progression, including the appearance of a new BM or progression of preexisting BM, had reduced. Survival without bone progression was also significantly higher in the subset of patients with baseline BM in the combined exemestane-everolimus arm. Interestingly, bone remodeling was inhibited at 6 and 12 weeks in patients treated with everolimus and exemestane, independent of the presence of BM and bisphosphonate use at baseline [18]. All these data indicate the osteoprotective effect of everolimus.

**Immune Checkpoint Inhibitors (ICI).** An interplay exists between bone tissue and the immune system. In particular, immune cells within the bone marrow are found near osteoclasts and osteoblasts [92]. Osteoimmune regulation, therefore, could be a determinant of metastatic growth in the bone microenvironment.

The numerous niches in the bone microenvironment, with high levels of immune cells, may have an effect on the progression of primary tumors to BM [93,94]. Natural killer cells kill tumor cells by apoptosis, mediated by granzyme B and perforin. Cytotoxic T-CD8+ cells release TNF $\alpha$  and interferon (IFN)- $\gamma$  to eliminate cancerous cells [95,96].

Deregulation of IFN type I is an essential mediator of bone tumor progression. In fact, the loss of IFN type I signaling in metastatic lesions results in a decrease in the regulation of immune cell

activation, with inhibition of innate immune priming of cytotoxic cells, and an increase in angiogenesis and bone degradation, leading to ineffective bone homing of circulating immune cells (immune exclusion), all of which facilitate metastatic progression [97].

Regulatory T cells promote bone cancerization via CXCR4/CXCL12 signaling [98] or the RANK/RANKL axis [99,100]. Tumor-associated macrophages promote the tropism of tumor cells to bone through CCL2/CCR2 or CSF-1/CSF-1R signaling [101]. At the same time, these macrophages secrete high levels of IL-10 and TGF- $\beta$  to reduce the activation of CD4+ and CD8+ T cells [102].

TGF- $\beta$  increases osteolytic and osteoblastic activity, which destabilizes bone remodeling while simultaneously stimulating the growth of tumor cells. This, in turn, promotes immunosuppression, which is enhanced by the direct immune modulation of TGF- $\beta$  in plastic populations, such as neutrophils. Therapeutic blockade of TGF- $\beta$  has been effective in reducing bone tumor burden by promoting antitumor immune activity and inhibiting bone destruction [97].

Dendritic cells suppress the cytotoxic capacity of CD8+ T cells by producing arginase I, nitric oxide, TGF- $\alpha$ , and IL-10, which inhibit the immune response and thus promote tumor progression [103].

Myeloid-derived suppressor cells release chemokines such as IL-6, VEGF, basic fibroblast growth factor, and matrix metalloproteinase 9 and promote BM progression [92]. Tumor-associated neutrophils can also release CXCR4, VEGF, and matrix metalloproteinase 9 for this purpose [104]. Tumor cells also release other factors such as RANKL, E-cadherin, CXCR4, and parathormone-related protein, which promote bone homing and the occurrence of osteolytic bone lesions [92] (Figure 1).

**Bone Resorption Inhibitors.** Modification of the microenvironmental secretome by the combined effects of multitarget TKIs and BRIs can affect the bone, and this needs to be better evaluated in clinical trials. The association between immune checkpoints and denosumab seems to have been the most studied topic recently, because RANKL is not only involved in osteoclastogenesis but also has immunological effects [105].

The results of two retrospective observational studies in patients with melanoma and lung cancer with BM, treated with anti-PD1 or anti-CTLA, showed better survival and a better response rate in favor of the association of ICI and BRI, without an increase in toxicities [106,107]. Nevertheless, some interactions between BRIs and targeted antiangiogenic therapies create a breeding ground for complications, such as osteonecrosis of the jaw, which can affect prognosis [108].

### Conclusions and Perspectives

BM is now being considered more seriously in clinical practice because of the improvement in imaging techniques and availability of efficient BRIs and other anticancer treatments. Moreover, targeted antitumor therapies provide a better survival rate for patients but may also induce further BM during the follow-up period. In fact, while combating disease progression, these targeted therapies might activate specific pathways that can lead to an imbalance in the bone microenvironment and cause metastasis to spread further. Altogether, these concerns illustrate that the bone has a major role in carcinogenesis because it is involved in both pro- and antitumor metastatic processes and resistance to treatment. Consequently, several axes of exploration need to be developed further:

- First, the evaluation of bone tumor burden needs to be standardized through the elaboration of bone imaging criteria associated with clinical and biological markers. This will allow effective determination of metastatic bone disease burden at diagnosis and better evaluation of the response of BM to treatment.
- Second, the effects of targeted therapies on the bone need to be assessed during clinical trials to determine what can be expected in terms of BM progression and SREs.
- Third, the optimal use of BRIs (such as time to initiation, pattern of administration, and time to discontinuation) must be determined in the context of the global strategy of bone disease treatment, including bone focal treatment and systemic treatment.
- Finally, knowledge to better understand the effects of targeted therapies on the bone microenvironment and the factors involved in both pro- and antitumor metastatic processes and resistance to treatment must be refined.

### Author Contributions

Martine Duterque-Coquillaud and Marie-Hélène Vieillard conceived the idea for the review. Anthony Turpin and Marie-Hélène Vieillard searched the literature. Anthony Turpin and Martine Duterque-Coquillaud wrote the manuscript. Anthony Turpin generated the figure. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Conflicts of Interest Statement

The authors declare no competing interests.

### Acknowledgments

We apologize to authors whose publications could not be included in this review due to limited space. We would like to thank Editage ([www.editage.com](http://www.editage.com)) and Séverine Marchant (Centre Oscar Lambret) for English language editing.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jtranon.2019.10.012>.

### References

- [1] Roodman GD (2004). Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 350, 1655–1664. <https://doi.org/10.1056/NEJMr030831>.
- [2] Coleman RE (2006). Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 12, 6243s–6249s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0931>.
- [3] Fornetti J, Welm AL and Stewart SA (2018). Understanding the Bone in Cancer Metastasis. *J Bone Miner Res* 33, 2099–2113. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3618>.
- [4] Selvaggi G and Scagliorri GV (2005). Management of bone metastases in cancer: a review. *Crit Rev Oncol Hematol* 56, 365–378. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2005.03.011>.
- [5] Coleman RE (2004). Bisphosphonates: clinical experience. *Oncologist* 9 (Suppl 4), 14–27. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-90004-14>.
- [6] McDougall JA, Bansal A, Goulart BHL, McCune JS, Karnopp A, Fedorenko C, Greenlee S, Valderrama A, Sullivan SD and Ramsey SD (2016). The Clinical and Economic Impacts of Skeletal-Related Events Among Medicare Enrollees With Prostate Cancer Metastatic to Bone. *Oncologist* 21, 320–326. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0327>.

- [7] Lecouvet FE, Oprea-Lager DE, Liu Y, Ost P, Bidaut L, Collette L, Deroose CM, Goffin K, Herrmann K and Hoekstra OS, et al (2018). Use of modern imaging methods to facilitate trials of metastasis-directed therapy for oligometastatic disease in prostate cancer: a consensus recommendation from the EORTC Imaging Group. *Lancet Oncol* 19, e534–e545. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30571-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30571-0).
- [8] Massagué J and Obenauf AC (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 529, 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>.
- [9] Body J-J, Quinn G, Talbot S, Booth E, Demonty G, Taylor A and Amelio J (2017). Systematic review and meta-analysis on the proportion of patients with breast cancer who develop bone metastases. *Crit Rev Oncol/Hematol* 115, 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.04.008>.
- [10] Coleman RE and Rubens RD (1987). The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* 55, 61–66.
- [11] Kuchuk I, Hutton B, Moretto P, Ng T, Addison CL and Clemons M (2013). Incidence, consequences and treatment of bone metastases in breast cancer patients—Experience from a single cancer centre. *J Bone Oncol* 2, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2013.09.001>.
- [12] Swain SM, Baselga J, Kim S-B, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero J-M, Schneeweiss A and Heeson S, et al (2015). Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 372, 724–734. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1413513>.
- [13] Díaras V, Miles D, Verma S, Pegram M, Welslau M, Baselga J, Krop IE, Blackwell K, Hoersch S and Xu J, et al (2017). Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18, 732–742. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30312-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30312-1).
- [14] Cortes J, O'Shaughnessy J, Loesch D, Blum JL, Vahdat LT, Petrakova K, Choller P, Manikas A, Díaras V and Delozier T, et al (2011). Twelve EMBRACE (Eisai Metastatic Breast Cancer Study Assessing Physician's Choice Versus E7389) investigators, Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *Lancet* 377, 914–923. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60070-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60070-6).
- [15] Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, Ertl J, Patel R, Pinter T and Schmidt M, et al (2015). The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 16, 25–35. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71159-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71159-3).
- [16] Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im S-A, Gelmon K, Harbeck N, Lipatov ON, Walsh JM and Moulder S, et al (2016). Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New Engl J Med* 375, 1925–1936. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607303>.
- [17] Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im S-A, Masuda N, Collocci M, DeMichele A, Loi S and Verma S, et al (2016). Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 17, 425–439. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00613-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00613-0).
- [18] Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI and Lebrun F, et al (2012). Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 366, 520–529. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109653>.
- [19] Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N and Armstrong A, et al (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* 377, 523–533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>.
- [20] Gravis G, Fizazi K, Joly F, Oudard S, Pnoui F, Esterni B, Latorzeff I, Delva R, Kizkowski I and Laguerre B, et al (2013). Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14, 149–158. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70560-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70560-0).
- [21] James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, Ritchie AWS, Parker CC, Russell JM and Attard G, et al (2016). STAMPEDE investigators, Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet* 387, 1163–1177. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01037-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01037-5).
- [22] Sweeney CJ, Chen Y-H, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, Wong Y-N, Hahn N, Kohli M and Cooney MM, et al (2015). Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 373, 737–746. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503747>.
- [23] Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, Özgünoğlu M, Ye D, Feyerabend S and Protheroe A, et al (2017). LATITUDE Investigators, Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 377, 352–360. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704174>.
- [24] Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PFA, Sternberg CN, Miller K, Logothetis CJ, Shore ND and Small EJ, et al (2015). COU-AA-302 Investigators, Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 16, 152–160. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71205-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71205-7).
- [25] Oudard S, Fizazi K, Sengeløv L, Daugaard G, Saad F, Hansen S, Hjalml-Eriksson M, Jassem J, Thiery-Vuillemin A and Caffo O, et al (2017). Cabazitaxel Versus Docetaxel As First-Line Therapy for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial—FIRSTANA. *J Clin Oncol* 35, 3189–3197. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.72.1068>.
- [26] Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, Staffurth JN, North S, Vogelzang NJ and Saad F, et al (2012). COU-AA-301 Investigators, Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 13, 983–992. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70379-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70379-0).
- [27] Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin M-E, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN and Shore ND, et al (2012). AFFIRM Investigators, Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* 367, 1187–1197. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1207506>.
- [28] de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels J-P, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ and Shen L, et al (2010). TROPIC Investigators, Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 376, 1147–1154. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61389-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61389-X).
- [29] Kuchuk M, Addison CL, Clemons M, Kuchuk I and Wheatley-Price P (2013). Incidence and consequences of bone metastases in lung cancer patients. *J Bone Oncol* 2, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2012.12.004>.
- [30] Wang H, Zhang Y, Zhu H and Yu J (2017). Risk factors for bone metastasis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Future Oncol* 13, 695–704. <https://doi.org/10.2217/fo-2016-0237>.
- [31] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H and Kinoshita I, et al (2010). North-East Japan Study Group, Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 362, 2380–2388. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909530>.
- [32] Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B and Ichinose Y, et al (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361, 947–957. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>.
- [33] Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J and Usari T, et al (2014). PROFILE 1014 Investigators, First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 371, 2167–2177. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408440>.
- [34] Hida T, Nohiham H, Kondo M, Kim YH, Azuma K, Seto T, Takiguchi Y, Nishio M, Yoshioka H and Imamura F, et al (2017). Alecrinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* 390, 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30565-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30565-2).

- [35] Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, Dechaphunkul A, Imamura F, Nogami N and Kurata T, et al (2018). FLAURA Investigators, Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 378, 113–125. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713137>.
- [36] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C and Sanchez JM, et al (2012). Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie and Associazione Italiana Oncologia Toracica. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13, 239–246. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70393-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70393-X).
- [37] Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, De Pas T, Besse B, Solomon BJ and Blackhall F, et al (2013). Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 368, 2385–2394. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214886>.
- [38] Barlesi F, Scherpercl A, Rittmeyer A, Pazzola A, Ferrer Tur N, Kim J-H, Ahn M-J, Aerts JGJV, Gorbunova V and Vikström A, et al (2013). Randomized phase III trial of maintenance bevacizumab with or without pemetrexed after first-line induction with bevacizumab, cisplatin, and pemetrexed in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAPERL (MO22089). *J Clin Oncol* 31, 3004–3011. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.3749>.
- [39] Paz-Ares L, de Marinis F, Dediu M, Thomas M, Pujol J-L, Bidoli P, Molinier O, Sahoo TP, Laack E and Reck M, et al (2012). Maintenance therapy with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (PARAMOUNT): a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 13, 247–255. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70063-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70063-3).
- [40] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinó L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE and Holgado E, et al (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373, 123–135. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504627>.
- [41] Borghaei H, Paz-Ares L, Hom I, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E and Holgado E, et al (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373, 1627–1639. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507643>.
- [42] Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han J-Y, Molina J, Kim J-H, Arvis CD and Ahn M-J, et al (2016). Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 387, 1540–1550. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01281-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01281-7).
- [43] Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawl J, Gadgeel SM, Hida T, Kowalski DM and Dols MC, et al (2017). OAK Study Group. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 389, 255–265. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32517-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32517-X).
- [44] Charpidou A, Tsagouli S, Gkiozos I, Grapsa D, Moutsos M, Kiagia M and Syrigos K (2016). Bone metastases in patients with small cell lung carcinoma: rate of development, early versus late onset, modality of treatment, and their impact on survival. A single-institution retrospective cohort study. *Clin Exp Metastasis* 33, 453–460. <https://doi.org/10.1007/s10585-016-9789-7>.
- [45] Bianchi M, Sun M, Jekres C, Shariat SF, Trinh Q-D, Briganti A, Tian Z, Schmitges J, Graefen M and Perrotte P, et al (2012). Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Ann Oncol* 23, 973–980. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr362>.
- [46] Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, Nathan P, Staehler M, de Souza P and Merchan JR, et al (2013). Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 369, 722–731. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1303989>.
- [47] Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini BI, Hammers HJ, Donskov F, Roth BJ and Peltola K, et al (2016). METEOR investigators, Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17, 917–927. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30107-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30107-3).
- [48] Motzer RJ, Porta C, Vogelzang NJ, Sternberg CN, Szczylik C, Zolnierak J, Kollmannsberger C, Rha SY, Bjarnason GA and Melichar B, et al (2014). Dovitinib versus sorafenib for third-line targeted treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15, 286–296. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70030-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70030-0).
- [49] Escudier B, Porta C, Bono P, Powles T, Eisen T, Sternberg CN, Gschwend JE, De Giorgi U, Parikh O and Hawkins R, et al (2014). Randomized, controlled, double-blind, cross-over trial assessing treatment preference for pazopanib versus sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: PISCES Study. *J Clin Oncol* 32, 1412–1418. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.8267>.
- [50] Rini BI, Escudier B, Tomczak P, Kaprin A, Szczylik C, Hutson TE, Michaelson MD, Gorbunova VA, Gore ME and Ruskov IG, et al (2011). Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet* 378, 1931–1939. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61613-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61613-9).
- [51] Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tsykodi SS, Sosman JA, Procopio G and Plimack ER, et al (2015). CheckMate 025 Investigators, Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 373, 1803–1813. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510665>.
- [52] Hussain A, Lee RJ, Graff JN and Halabi S (2019). The evolution and understanding of skeletal complication endpoints in clinical trials of tumors with metastasis to the bone. *Crit Rev Oncol Hematol* 139, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.04.020>.
- [53] Lipton A, Theriault RL, Hortobagyi GN, Simeone J, Knight RD, Mellars K, Reitsma DJ, Heffernan M and Seaman JJ (2000). Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases: long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer* 88, 1082–1090.
- [54] Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Verner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA and Zheng M (2004). Zoledronic Acid Prostate Cancer Study Group. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 96, 879–882.
- [55] Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian NS, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, Pawlicki M, De Souza P, Zheng M and Urbanowitz G, et al (2004). Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer* 100, 2613–2621. <https://doi.org/10.1002/cncr.20308>.
- [56] Yong M, Jensen AÖ, Jacobsen JB, Nørgaard M, Fryzek JP and Sørensen HT (2011). Survival in breast cancer patients with bone metastases and skeletal-related events: a population-based cohort study in Denmark (1999-2007). *Breast Cancer Res Treat* 129, 495–503. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1475-5>.
- [57] O'Sullivan GJ (2015). Imaging of bone metastasis: An update. *WJR* 7, 202. <https://doi.org/10.4329/wjr.v7.i8.202>.
- [58] D'Oronzo S, Coleman R, Brown J and Silvestris F (2019). Metastatic bone disease: Pathogenesis and therapeutic options: Up-date on bone metastasis management. *J Bone Oncol* 15. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2018.10.004>.
- [59] Shen G, Deng H, Hu S and Jia Z (2014). Comparison of choline-PET/CT, MRI, SPECT, and bone scintigraphy in the diagnosis of bone metastases in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Skeletal Radiol* 43, 1503–1513. <https://doi.org/10.1007/s00256-014-1903-9>.
- [60] Schwenck J, Rempff H, Reischl G, Kruck S, Stenzl A, Nikolou K, Pfannenberger C and la Fougère C (2017). Comparison of 68Ga-labelled PSMA-11 and 11C-choline in the detection of prostate cancer metastases by PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44, 92–101. <https://doi.org/10.1007/s00259-016-3490-6>.
- [61] Dewulf J, Vangestel C, Verhoeven Y, van Dam P, Elvas F, van den Wyngaert T and Clézardin P (2019). Bone metastases in the era of targeted treatments: insights from molecular biology. *QJ Nucl Med Mol Imaging* 63(2), 98–111. <https://doi.org/10.23736/S1824-4785.19.03203-5>.
- [62] Liede A, Wade S, Lethen J, Hernandez RK, Warner D, Abernethy AP and Findli A (2018). An Observational Study of Concomitant Use of Emerging



- Therapies and Denosumab or Zoledronic Acid in Prostate Cancer. *Clin Ther* 40, 536–549. <https://doi.org/10.1016/j.clinther.2017.12.015>, e3.
- [63] Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, Scagliotti GV, Sleeboom H, Spencer A and Vadhan-Raj S, et al (2011). Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 29, 1125–1132. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.3304>.
- [64] Henry D, Vadhan-Raj S, Hirsh V, von Moos R, Hungria V, Costa L, Woll PJ, Scagliotti G, Smith G and Feng A, et al (2014). Delaying skeletal-related events in a randomized phase 3 study of denosumab versus zoledronic acid in patients with advanced cancer: an analysis of data from patients with solid tumors. *Support Care Cancer* 22, 679–687. <https://doi.org/10.1007/s00520-013-2022-1>.
- [65] Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M and Wang H, et al (2011). Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *The Lancet* 377, 813–822. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62344-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62344-6).
- [66] Smith MR, Coleman RE, Klotz L, Pitman K, Milecki P, Ng S, Chi KN, Balakumaran A, Wei R and Wang H, et al (2015). Denosumab for the prevention of skeletal complications in metastatic castration-resistant prostate cancer: comparison of skeletal-related events and symptomatic skeletal events. *Ann Oncol* 26, 368–374. <https://doi.org/10.1093/annonc/ndu519>.
- [67] Stopeck AT, Lipton A, Body J-J, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, Lichinitser M, Fujiwara Y, Yardley DA and Viniegra M, et al (2010). Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol* 28, 5132–5139. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.7101>.
- [68] Coleman R, Gnant M, Morgan G and Clezardin P (2012). Effects of bone-targeted agents on cancer progression and mortality. *J Natl Cancer Inst* 104, 1059–1067. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs263>.
- [69] Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S, Henry DH, Woll PJ, Manegold C, Solal-Celigny P, Rodriguez G, Krzakowski M and Mehta ND, et al (2012). Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *J Thorac Oncol* 7, 1823–1829. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31826aec2b>.
- [70] Hernandez RK, Wade SW, Reich A, Pirolli M, Liedt A and Lyman GH (2018). Incidence of bone metastases in patients with solid tumors: analysis of oncology electronic medical records in the United States. *BMC Cancer* 18, 44. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3922-0>.
- [71] Diessner J, Wischniewsky M, Stüber T, Stein R, Krockenberger M, Häusler S, Janni W, Keienberg R, Blettner M and Schwenner L, et al (2016). Evaluation of clinical parameters influencing the development of bone metastasis in breast cancer. *BMC Cancer* 16. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2345-7>.
- [72] Gerrataña I, Fanotto V, Bonotto M, Bolzonello S, Minisini AM, Fasola G and Puglisi F (2015). Pattern of metastasis and outcome in patients with breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 32, 125–133. <https://doi.org/10.1007/s10585-015-9697-2>.
- [73] Maurizi A and Rucci N (2018). The Osteoclast in Bone Metastasis: Player and Target. *Cancers (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/cancers10070218>.
- [74] Chen S-C and Kuo P-L (2016). Bone Metastasis from Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 17, 987. <https://doi.org/10.3390/ijms17060987>.
- [75] Knudsen BS, Gmyrek GA, Inna J, Scherr DS, Vaughan ED, Nanus DM, Kattan MW, Gerald WL and Vande Woude GF (2002). High expression of the Met receptor in prostate cancer metastasis to bone. *Urology* 60, 1113–1117.
- [76] Grano M, Galimi F, Zamboni G, Colucci S, Cottone E, Zallone AZ and Comoglio PM (1996). Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93, 7644–7648.
- [77] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A and Ceder S, et al (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>.
- [78] Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, Vanharanta S, Shu W, Shi H, Kong X, Bosenberg MC, Wiesner T and Rosen N, et al (2015). Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 520, 368–372. <https://doi.org/10.1038/nature14336>.
- [79] Sun J-M, Ahn JS, Lee S, Kim JA, Lee J, Park YH, Park HC, Ahn M-J, Ahn YC and Park K (2011). Predictors of skeletal-related events in non-small cell lung cancer patients with bone metastases. *Lung Cancer* 71, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.04.003>.
- [80] Ségaliny AI, Tellez-Gabriel M, Heymann M-F and Heymann D (2015). Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *J Bone Oncol* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2015.01.001>.
- [81] Yamashita Y, Aoki T, Hanagiri T, Yoshii C, Mukae H, Uramoto H and Korogi Y (2012). Osteosclerotic lesions in patients treated with gefitinib for lung adenocarcinomas: a sign of favorable therapeutic response. *Skeletal Radiol* 41, 409–414. <https://doi.org/10.1007/s00256-011-1253-9>.
- [82] Okano Y and Nishio M (2008). [Efficacy of gefitinib in treatment of lung cancer patients with bone metastasis]. *Clin Calcium* 18, 527–533.
- [83] Smith DC, Smith MR, Sweeney C, Elfikly AA, Logothetis C, Corn PG, Vogelzang NJ, Small EJ, Harzstark AL and Gordon MS, et al (2013). Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial. *J Clin Oncol* 31, 412–419. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.0494>.
- [84] Smith M, De Bono J, Sternberg C, Le Moulec S, Oudard S, De Giorgi U, Krainer M, Bergman A, Hoelzer W and De Wit R, et al (2016). Phase III Study of Cabozantinib in Previously Treated Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: COMET-1. *J Clin Oncol* 34, 3005–3013. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.5597>.
- [85] Di Nunno V, Cimadamore A, Santoni M, Scarpelli M, Fiorentino M, Ciccarese C, Iacovelli R, Cheng L, Lopez-Beltran A and Massari F, et al (2018). Biological issues with cabozantinib in bone metastatic renal cell carcinoma and castration-resistant prostate cancer. *Future Oncol* 14, 2559–2564. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0158>.
- [86] Lee C, Whang YM, Campbell P, Mulcrone PL, Eleftheriou F, Cho SW and Park SI (2018). Dual targeting c-met and VEGFR2 in osteoblasts suppresses growth and osteolysis of prostate cancer bone metastasis. *Cancer Lett* 414, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.016>.
- [87] Varkaris A, Corn PG, Panik NU, Efsthathiou E, Song JH, Lee Y-C, Aparicio A, Hoang AG, Gaur S and Thorpe L, et al (2016). Integrating Murine and Clinical Trials with Cabozantinib to Understand Roles of MET and VEGFR2 as Targets for Growth Inhibition of Prostate Cancer. *Clin Can Res* 22, 107–121. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0235>.
- [88] Vandyke K, Fitter S, Dewar AL, Hughes TP and Zannettino ACW (2010). Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate. *Blood* 115, 766–774. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237404>.
- [89] Gobin B, Moriceau G, Ory B, Charrier C, Brion R, Blanchard F, Redini F and Heymann D (2014). Imatinib mesylate exerts anti-proliferative effects on osteosarcoma cells and inhibits the tumour growth in immunocompetent murine models. *PLoS ONE* 9:e90795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090795>.
- [90] Sousa S and Clézardin P (2018). Bone-Targeted Therapies in Cancer-Induced Bone Disease. *Calcified Tissue Int* 102, 227–250. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0353-5>.
- [91] Browne AJ, Kubasch ML, Göbel A, Hadji P, Chen D, Rauner M, Stölzel F, Hofbauer LC and Radermacher TD (2017). Concurrent antitumor and bone-protective effects of everolimus in osteotropic breast cancer. *Breast Cancer Res* 19, 92. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0885-7>.
- [92] Xiang L and Gilkes DM (2019). The Contribution of the Immune System in Bone Metastasis Pathogenesis. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20040999>.
- [93] Gilkes DM (2016). Implications of Hypoxia in Breast Cancer Metastasis to Bone. *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17101669>.
- [94] Futakuchi M, Fukamachi K and Suzui M (2016). Heterogeneity of tumor cells in the bone microenvironment: Mechanisms and therapeutic targets for bone metastasis of prostate or breast cancer. *Adv Drug Del Rev* 99, 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.017>.
- [95] Philippe C, Philippe B, Fouquieray B, Perez J, Lebret M and Baud I (1993). Protection from tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity by platelets. *Am J Pathol* 143, 1713–1723.
- [96] Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Jirousková M and Degen JL (2005). Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-

- mediated elimination of tumor cells. *Blood* 105, 178–185. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2272>.
- [97] Owen KL and Parker BS (2017). Beyond the vicious cycle: The role of innate osteoimmunity, automimicry and tumor-inherent changes in dictating bone metastasis. *Mol Immunol* 110, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.11.023>.
- [98] Zou L, Barnett B, Safah H, Larussa VF, Evdemon-Hogan M, Mottram P, Wei S, David O, Curiel TJ and Zou W (2004). Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res* 64, 8451–8455. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1987>.
- [99] Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM and Karin M (2011). Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 470, 548–553. <https://doi.org/10.1038/nature09707>.
- [100] Nakashima T (2014). [Bone metastasis and RANKL]. *Clin Calcium* 24, 1201–1208.
- [101] Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, Benz J, Wartha K, Runza V, Rey-Giraud F, Pradel LP, Feuerhake F and Klamann I, et al (2014). Targeting Tumor-Associated Macrophages with Anti-CSF-1R Antibody Reveals a Strategy for Cancer Therapy. *Cancer Cell* 25, 846–859. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.016>.
- [102] Biswas SK and Mantovani A (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11, 889–896. <https://doi.org/10.1038/ni.1937>.
- [103] Capietto A-H and Faccio R (2014). Immune regulation of bone metastasis. *Bonekey Rep* 3, 600. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2014.95>.
- [104] Schernberg A, Blanchard P, Chargari C and Deusch E (2017). Neutrophils, a candidate biomarker and target for radiation therapy? *Acta Oncol* 56, 1522–1530. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1348623>.
- [105] van Dam PA, Verhoeven Y, Trinh XB, Wouters A, Lardon F, Prenen H, Smits E, Baldewijns M and Lammens M (2019). RANK/RANKL signaling inhibition may improve the effectiveness of checkpoint blockade in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 133, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.10.011>.
- [106] Liede A, Hernandez RK, Wade SW, Bo R, Nussbaum NC, Ahern E, Dougall WC and Smyth MJ (2018). An observational study of concomitant immunotherapies and denosumab in patients with advanced melanoma or lung cancer. *Oncoimmunology* 7:e1480301. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1480301>.
- [107] Angela Y, Haferkamp S, Weishaupt C, Ugurel S, Becker JC, Oberndörfer F, Alar V, Satzger I and Gutzmer R (2019). Combination of denosumab and immune checkpoint inhibition: experience in 29 patients with metastatic melanoma and bone metastases. *Cancer Immunol Immunother* 68(7), 1187–1194. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02353-5>.
- [108] Smidt-Hansen T, Folkmar TB, Fode K, Agerbaek M and Donskov F (2013). Combination of zoledronic Acid and targeted therapy is active but may induce osteonecrosis of the jaw in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 71, 1532–1540. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.03.019>.

# Annexe 4 : Revue de la littérature concernant les principaux examens d'imagerie utiles dans le cancer de la prostate parue dans *Frontiers in Oncology*, en 2020, écrite pendant la thèse



## Imaging for Metastasis in Prostate Cancer: A Review of the Literature

Anthony Turpin<sup>1,2</sup>, Edwina Girard<sup>3</sup>, Cléo Baillet<sup>4</sup>, David Pasquier<sup>5,6</sup>, Jonathan Olivier<sup>7</sup>, Arnaud Villers<sup>7</sup>, Philippe Puech<sup>8</sup> and Nicolas Penel<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Oncology, CHU Lille, Lille, France, <sup>2</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 – UMR-S 1277 – Canther - Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France, <sup>3</sup> Medical Oncology Department, Centre Oscar Lambret, Lille, France, <sup>4</sup> Nuclear Medicine Department, CHU Lille, Lille, France, <sup>5</sup> Academic Department of Radiation Oncology, Centre Oscar Lambret, Lille, France, <sup>6</sup> CRISTAL UMR CNRS 9189, Lille University, Villeneuve-d'Ascq, France, <sup>7</sup> Department of Urology, CHU Lille, Lille, France, <sup>8</sup> Department of Radiology, CHU Lille, Lille, France

**Background:** Initial staging and assessment of treatment activity in metastatic prostate cancer (PCa) patients is controversial. Indications for the various available imaging modalities are not well-established due to rapid advancements in imaging and treatment.

**Methods:** We conducted a critical literature review of the main imaging abnormalities that suggest a diagnosis of metastasis in localized and locally advanced PCa or in cases of biological relapse. We also assessed the role of the various imaging modalities available in routine clinical practice for the detection of metastases and response to treatment in metastatic PCa patients.

**Results:** In published clinical trials, the most commonly used imaging modalities for the detection and evaluation of therapeutic response are bone scan, abdominopelvic computed tomography (CT), and pelvic and bone magnetic resonance imaging (MRI). For the detection and follow-up of metastases during treatment, modern imaging techniques i.e., choline-positron emission tomography (PET), fluciclovine-PET, or Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-PET provide better sensitivity and specificity. This is particularly the case of fluciclovine-PET and PSMA-PET in cases of biochemical recurrence with low values of prostate specific antigen.

**Conclusions:** In routine clinical practice, conventional imaging still have a role, and communication between imagers and clinicians should be encouraged. Present and future clinical trials should use modern imaging methods to clarify their usage.

**Keywords:** prostate cancer, choline-PET, fluciclovine-PET, PSMA-PET, bone scan, MRI, staging

### INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the first cancer in terms of incidence in men (1). Most PCa are curable but metastatic forms are associated with lower survival (2), hence the need for imaging to detect and to follow metastases evolution during treatment.

The use of various different imaging modalities is an important source of heterogeneity in the diagnosis and treatment of PCa patients. This variability is largely due to the rapid evolution of knowledge and the availability of new drugs and high-technology imaging techniques, such as prostatic magnetic resonance imaging (MRI) and the emergence of new radiotracers. This issue was highlighted in the latest international recommendations from the expert consensus panel of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (3, 4), which noted that an updated consensus is required due to the low level of

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Ronald M. Bukowski,  
Cleveland Clinic, United States

#### Reviewed by:

Ewa Czesława Izycka-Swieszewska,  
Medical University of Gdansk, Poland  
Pedro C. Barata,  
Tulane University, United States

#### \*Correspondence:

Nicolas Penel  
n-penel@o-lambret.fr

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Genitourinary Oncology,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

Received: 01 March 2019

Accepted: 13 January 2020

Published: 31 January 2020

#### Citation:

Turpin A, Girard E, Baillet C,  
Pasquier D, Olivier J, Villers A,  
Puech P and Penel N (2020) Imaging  
for Metastasis in Prostate Cancer: A  
Review of the Literature.  
Front. Oncol. 10:55.  
doi: 10.3389/fonc.2020.00055

evidence from clinical studies in radiology and nuclear medicine, which were mainly retrospective.

Recently, a multidisciplinary panel of international experts convened at the European Association of Nuclear Medicine (EANM) Focus 1 meeting produced a comprehensive series of statements on prostate cancer imaging and therapy with radiopharmaceuticals (5). Notably, bone scintigraphy and CT have never been recommended for the majority of patients by experts despite the fact that these methods are still largely included in most clinical guidelines. In another recent consensus statement, provided by the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) imaging group following a review of the role of modern imaging for optimal identification of oligometastatic disease (6), an imaging trial design was proposed.

In light of the latest consensus recommendations, we aimed to assess the rationale for the main imaging methods available in routine clinical practice for the diagnosis of metastatic PCa, including initial staging and therapeutic response, in order to enhance the clinical care of PCa patients.

## METHODS

### Study Design

This review of the literature, aimed at analyzing all studies that investigated the use of imaging as a basis for the staging of metastatic PCa or the assessment of patients treated for metastatic PCa.

### Literature Search

The studies were screened manually by two independent authors (AT and EG) on the basis of the study title and abstract. The relevant studies were abstracted according to the eligibility criteria. The data of interest were independently extracted from the selected studies by two authors (AT and EG). All the study details (year of publication, study primary author, and trial design) were extracted. Extracted data were double-checked by a third reviewer (NP). Discrepancies were resolved by discussion with all the authors.

The keywords “metastatic prostate cancer” were used in the systematic search conducted between October 1, 2018 and December 31, 2019, and associated with “first line” [183], “staging” [354], “MRI” [76], “PET” [184], “bone scan” [117], and “imaging” [568]. For the localized and locally advanced PCa sections, we also searched for “prostate cancer” and “seminal vesicles” and “MRI” [127]; “prostate cancer” and “seminal vesicles” and “PET” [17]; “prostate cancer” and “prostate bed” and “MRI” [33]; and “prostate cancer” and “prostate bed” and “PET” [66]. The methodological search was performed through the online database, MEDLINE. Additionally, the references in each eligible article were examined. Furthermore, relevant manuscripts were screened when a positive match was identified.

### Inclusion and Exclusion Criteria

Only original manuscripts and reviews published in indexed and peer-reviewed journals and written in English between August 1999 and December 2019 were considered. Cross-sectional studies, case reports, published abstracts, dissertation materials, and conference presentations were excluded. Of 1,725 potential

articles from the literature search, 105 were selected, including 16 literature reviews, 5 meta-analyses, 11 guidelines or position papers, and 73 original articles.

## RESULTS

From the current international guidelines, we searched the literature for the levels of evidence concerning the use of different imaging modalities in routine clinical practice.

### Search for Metastases in Localized and Locally Advanced Prostate Cancers

The search for metastases was performed based on the presence of clinical symptoms, from the diagnosis of localized PCa in asymptomatic patients, or in the follow-up of treated PCa. Lymph node (LN) or bone metastases are rarely detected in this context (7).

In patients followed-up for localized PCa, metastases should be sought according to the risk group defined by the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) or by the European Association of Urology (EAU) guidelines (6), to estimate the 5-year biological relapse risk. These guidelines are heterogeneous across the world. Hence, it is of interest to provide answers for routine clinical practice to the following question: How can metastases in LN, bone, or locoregional disease in seminal vesicles (SVs) be better diagnosed?

### Is There Disease in the LN (Table 1)?

Computed tomography (CT) scans are mainly performed to diagnose LN involvement. Nevertheless, there is difficulty with CT scan validation, either at initial diagnosis or for recurrence.

**TABLE 1** | Sensitivity and specificity of currently available functional and targeted imaging methods for LN staging of PCa.

Type of imaging	Reference and type	Number of patients	Se (%)	Sp (%)
CT-scan	Abuzalouf et al. (8) (Review)	<i>N</i> = 4,264	7	100
	Hövels et al. (9) (Meta-analysis)	18 studies, <i>N</i> = 1,024	42	82
Choline-PET/CT	Mapelli and Picchio (10) (Meta-analysis)	5 studies, <i>N</i> = 177	94–100	66–99.7
	PSMA-PET/CT	Maurer et al. (11) (Original article)	<i>N</i> = 130	65.9
MRI	Kim et al. (12) (Meta-analysis)	6 studies, <i>N</i> = 298	71	95
	Mapelli and Picchio (10) (Meta-analysis)	5 studies, <i>N</i> = 177	18.8–69.7	78.6–97.6
	Hövels et al. (9) (Meta-analysis)	10 studies, <i>N</i> = 628	39	82
MRI with magnetic nanoparticles	Harisinghani et al. (13) (Original article)	<i>N</i> = 33	90.5	97.8

Choline-PET/CT, choline positron emission tomography/computed tomography scan; CT-scan, computed tomography scan; PSMA-PET/CT, prostate-specific membrane antigen-positron emission tomography/computed tomography scan; MRI, magnetic resonance imaging; Se, sensitivity; Sp, specificity.

In a single >10-year-old review manuscript, the overall sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of LN metastases detection with CT were 16, 100, 85, and 100%, respectively (8). Among 25 studies, LN involvement, detected by CT, was documented to affect ~0 and 1.1% of patients with prostate specific antigen (PSA) <20 and ≥20 ng/mL, respectively. The CT detection rate was 0.7 and 19.6% in patients with localized and locally advanced diseases, respectively. Detection rates in patients with Gleason scores ≤7 and ≥8 were 1.2 and 12.5%, respectively (8).

Some encouraging results support the role of choline positron emission tomography (PET)/CT in LN staging for selected patients with high risk of LN invasion. Choline-PET/CT is considered a reliable tool for LN staging of PCa because it has good sensitivity (94–100%) and specificity (66.7–99.7%), although some studies reported a lower specificity than for MRI (78.6–97.6%), and no consensus exists regarding whether choline-PET/CT or MRI should be used for LN staging (10).

In a large-scale meta-analysis, the pooled sensitivity and specificity of conventional MRI for detecting pelvic LN metastases from PCa were ~39 and 82%, respectively (9). In preoperative patients, there was improved detection utilizing diffusion weighted imaging (DWI) when compared to conventional cross-sectional imaging techniques, with the detection of LN metastasis in 64–79% of cases (14). The current threshold for reporting involved nodes on multiparametric MRI are those measuring ≥8 mm on the short axis (15). However, metastatic LNs are not always enlarged, and standard pelvic MRI cannot detect micrometastases. Lymphotropic nanoparticles have demonstrated superior sensitivity than conventional MRI (90.5 vs. 35.4%) in the detection of LN metastases in PCa (13). Magnetic resonance lymphography utilizing ultra-small super paramagnetic iron oxide (USPIO) has shown high sensitivity and specificity in the detection of normal-sized LN containing metastatic disease. While USPIO is efficacious, it is not widely available (13, 16).

Fluorodeoxyglucose 18 (18FDG) PET has shown promise in clinical practice, with increased sensitivity in undifferentiated forms. A United States (US) registry study showed a change in therapeutic management for 32% of patients with systemic FDG-PET scans in the initial staging (17). In a small study, among patients with a high-grade PCa at biopsy, FDG-PET/CT could improve pre-treatment prognostic stratification by predicting primary PCa pathological grade and survival probability following radical prostatectomy (RP) (18).

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is overexpressed in PCa cells, allowing for detection using PET/CT imaging with gallium 68-labeled PSMA ligands (PSMA-PET/CT). This is a high-sensitive test for metastasis detection, but it is recent and still being evaluated. In a retrospective analysis of 130 consecutive patients with primary, intermediate-risk to high-risk PCa who underwent RP with template pelvic LN dissection, there was a sensitivity of 65.9% and specificity of 98.9% for LN staging with PSMA-PET/CT. The specificity of CT was significantly lower than the PSMA-PET (11). Recently, in a six-study meta-analysis, the overall sensitivity and specificity for PSMA-PET/CT was 71 and 95%, respectively (12). Hence, PSMA-PET is the most encouraging imaging modality for the detection of disease in LNs.

**TABLE 2 |** Sensitivity and specificity of currently available functional and targeted imaging methods for detection of SVI in PCa.

References	Type of imaging	Number of patients	Se (%)	Sp (%)
Grivas et al. (19)	MRI	527	75.9	94.7
Pinaquy et al. (20)	Choline-PET/CT	47	36	98
Fendler et al. (21)	PSMA-PET/CT	21	73	100

*Choline-PET/CT, choline positron emission tomography/computed tomography scan; PSMA-PET/CT, prostate-specific membrane antigen-positron emission tomography/computed tomography scan; MRI, magnetic resonance imaging.*

### Is There Disease in Seminal Vesicles (Table 2)?

The combination of a tumor at the prostate base extending beyond the capsule, and low signal intensity within SVs in a background of high signal fluid on T2-weighted images is highly predictive of SV invasion (SVI) using multiparametric MRI (22). There is good concordance between MRI and histopathology in surgical patients, but this requires that the radiology team be trained (22, 23). Indeed, in 79 Brazilian patients who underwent multiparametric MRI, only 5% had an SVI and 4% had LN invasion. With surgical specimens, SVI, with a sensitivity of only 19.4% and a specificity of 100%, was found in 26.6% of specimens (23).

In a more robust study, by rereading the clinico-radiological data of 527 patients who had a robot-assisted RP, and comparing the SVI imaging reports with histological analysis, 54 (10%) patients were identified as having SVI. Overall, the sensitivity, specificity, PPV, and NPV for SVI detection with MRI were 75.9, 94.7, 62, and 97%, respectively. Based on a sub-analysis, radiologists with greater expertise demonstrated improved accuracy, with a sensitivity, specificity, PPV, and NPV of 85.4, 95.6, 70.0, and 98.2%, respectively. In a multivariate analysis, MRI provided added diagnostic value to PSA, above that of the clinical/Partin-based SVI-prediction models alone (19).

Regarding the contribution of choline-PET/CT for tumor staging, MRI with DWI showed a better performance with improved specificity for sextants analysis (69 vs. 44%) and a better sensitivity to detect SVI (73 vs. 36%) in 47 patients who underwent choline-PET/CT and MRI followed by surgical treatment (20). In another study, PSMA-PET correctly detected SVI with 71% accuracy in a 21-patient study with biopsy-proven PCa (21). Therefore, SVI is best detected by T2-weighted (T2W) sequence MRI (24).

### Is There Disease in Bones (Table 3)?

Disease progression on whole body bone scintigraphy using 99mTc-labeled diphosphonate remains the main criterion recognized by the Food and Drug Administration (FDA) in the US for the evaluation of bone response. A 12-article meta-analysis of bone scan (BS) measured on a per-patient basis found a pooled sensitivity of 0.79 (95% CI: 0.73–0.83) and a pooled specificity for bone metastasis detection of 0.82 (95% CI: 0.78–0.85). On a per-lesion basis, the pooled sensitivity and specificity for BS were 0.59 (95% CI: 0.55–0.63) and 0.75 (95% CI: 0.71–0.79), respectively (25). However, sensitivity and specificity were improved when coupled with low-dose CT (26).

**TABLE 3 |** Sensitivity and specificity of currently available functional and targeted imaging methods for bone staging of PCa.

Type of imaging	Reference and type	Number of patients	Se (%)	Sp (%)
Bone scan	Shen et al. (25) (meta-analysis)	18 studies, N > 2,291	79	82
Choline-PET/CT			87	97
MRI			95	96
SPECT-CT	Behesti et al. (26) (Review)	Review	87–92	91
Bone CT	O'Sullivan et al. (27) (Review)	Review	56	74
NaF-PET/CT	Behesti et al. (28) (Review)	Review	100	100

Bone CT, bone computed tomography scan; Choline-PET/CT, choline positron emission tomography/computed tomography scan; CT-scan, computed tomography scan; MRI, magnetic resonance imaging; NaF-PET/CT, 18F-sodium fluoride positron emission tomography/computed tomography scan; PSMA-PET/CT, prostate-specific membrane antigen-positron emission tomography/computed; Se, sensitivity; Sp, specificity; SPECT-CT, single photon emission computed tomography.

The performance was also improved by using single-photon emission computed tomography (SPECT) with CT (SPECT-CT) (Figure 1). Thus, the sensitivity of 70% in BS increased to 87–92% with SPECT-CT (26). BS does not directly visualize the metastasis but rather visualizes the osteoblastic reaction to the presence of tumor cells. It detects <1% of bone metastases in patients with PSA <20 ng/mL (27, 29). Metastases were detected in 2.3% of patients having a PSA <10 ng/mL, 5.3% of patients having a PSA level between 10.1 and 19.9 ng/mL, and 16.2% of patients with a PSA between 20.0 and 49.9 ng/mL (8). The sensitivity and specificity of bone CT for the detection of bone metastases is 56 and 74%, respectively (30), when bone CT is indicated.

PET/CT using 18F- or 11C-labeled choline (choline-PET/CT) dramatically improved the detection of infra-radiological bone metastases, with a sensitivity >90–95% and a specificity ranging from 92 to 99% (31, 32) (Figure 2). Indeed, choline is a precursor of phospholipids constituting the cellular membrane, and radio-labeled choline incorporation is increased in cell proliferation. Therefore, choline-PET/CT can distinguish between malignant and degenerative bone defects, which are not choline avid, even though choline can accumulate in recent traumatic bone lesions.

In a meta-analysis of 27 studies involving advanced PCa patients, Shen et al. showed that MRI was superior to choline-PET and bone scintigraphy for detecting bone metastases, with a sensitivity of 97% for MRI vs. 91% for choline-PET/CT vs. 79% for bone scintigraphy in and a specificity of 95% for MRI vs. 99% for choline-PET/CT vs. 82% for bone scintigraphy (25). When a doubt persists about bone slices, suggesting traumatic lesions or a flare reaction with an increase in osteoblastic activity, the results must be confirmed by bone MRI or bone CT.

Nevertheless, in modern and more robust prospective studies, choline-PET (33) and PSMA-PET (34) were significantly better especially when conventional imaging such as MRI were negative (35) or non-contributive (36).

Sodium fluoride (NaF) has high affinity for osteoblasts and reflects the same phenomenon as bone scans. NaF-PET/CT

can be used in the evaluation of primary and secondary bone malignancies, highlighting increased bone remodeling and allowing assessment of response in PCa (28). Several studies suggest that NaF-PET is superior to bone scan for the detection of bone metastases if PET is associated with CT (100% sensitivity and 100% specificity vs. 70 and 57%, respectively, for bone scintigraphy alone) (37).

Once again, bone MRI is a useful imaging technique for detecting bone metastases. Using a whole-body-MRI (WB-MRI), any pairwise combination of T1-weighted, short-TI Inversion Recovery (STIR), and DWI, has high diagnostic accuracy (38). The main limitations for using this exam in routine practice are the availability of WB-MRI and the high cost of the equipment (16).

Prostate physicians should discuss the association between MRI and bone CT in multidisciplinary consultations to better diagnose and treat bone metastasis. Choline-PET and PSMA-PET are valuable tools particularly when conventional imaging is negative.

### Search for Metastases in Recurrent Disease: Restaging

About 30% of patients treated radically for high or very high risk PCa have biochemical recurrence (BCR) (39), and with modern imaging, the diagnosis of oligometastatic PCa has become more common (6). Current guidelines from NCCN and EAU (6) but stay heterogeneous across different parts of the world. For example, National Comprehensive Cancer Network guidelines consider 18F fluciclovine-PET-CT for prostate cancer biochemical recurrence after radical prostatectomy<sup>1</sup> (NCCN guidelines), whereas European Association of Urology guidelines recommend prostate-specific membrane antigen PSMA-PET/CT (39). Tables 4, 5 summarize the literature on the following issues.

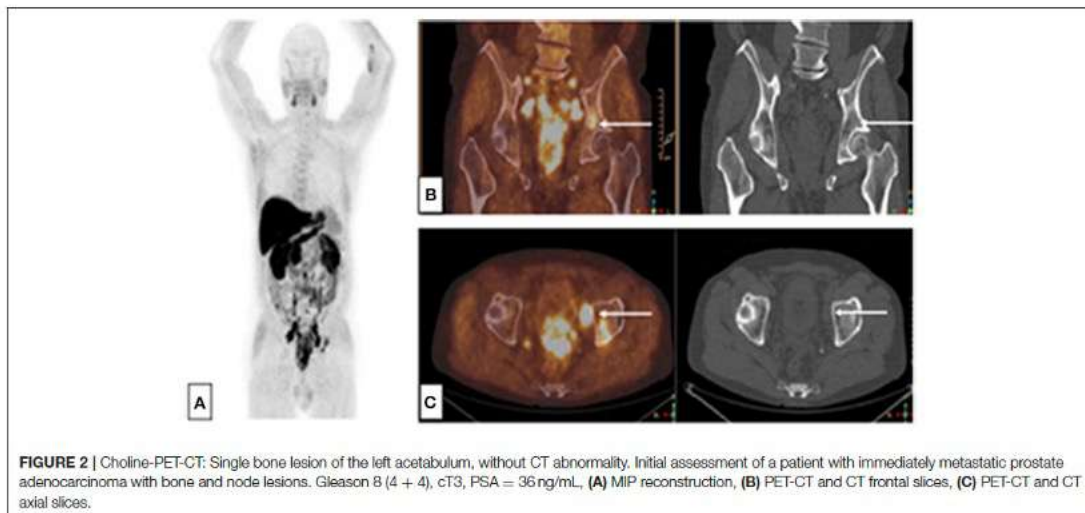
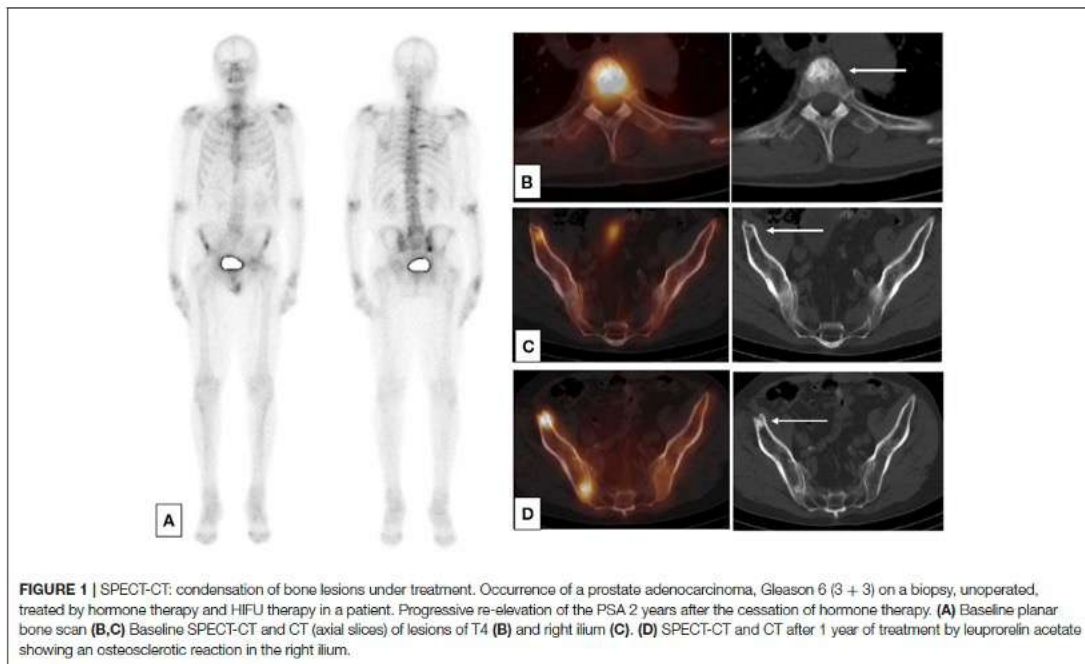
#### Is There Residual Tumor in the Prostate Bed?

If abnormalities were best appreciated on T2W axial images as focal hypointense lesions (50), dynamic contrast-enhanced imaging (DCE-MRI) or DWI in combination with T2W at 3T with a phased-array coil, appears to be more useful than T2W alone in evaluating suspected soft tissue lesions of the prostate bed after RP (51).

In a study of 76 consecutive patients with suspected PCa recurrence after RP, WB and dedicated prostate MRI was completed successfully in all patients. Suspected disease recurrence was identified in 21% (16/76) of patients, including local recurrence in the prostate bed in 8% (46).

Choline-PET/CT and MRI showed comparable results in terms of sensitivity, specificity, PPV, and NPV for PCa characterization when restaging PCa patients with BCR following RP (52). The sensitivity and specificity of choline-PET were 73.3 and 75.6%, respectively (53). In a study by Kitajima et al. the sensitivity and specificity for loco-regional recurrence detection were 54.1 and 92.3% for choline-PET/CT, and 88.5 and 84.6%

<sup>1</sup>[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/prostate.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf). Version 4.2019, 08/19/19 © 2019 National Comprehensive Cancer Network® (NCCN®), All rights reserved.



for MRI, respectively (47). Choline in the prostate bed and bladder-urethral junction along the midline must be considered suspicious for local relapse in patients treated radically for PCa, especially if they are presenting with a PSA level >1 ng/mL (53).

PET/MRI suffers from limited availability, and technical modifications in PET/CT protocols may improve localization of prostate bed disease. In the case of PSMA-PET/CT, early dynamic imaging led to an increase in the detection rate from 20.3 to 29.7% in a subgroup of 64 patients with BCR (42). Similarly,

**TABLE 4 |** Currently available functional and targeted imaging methods for detection of suspected recurrence in PCa with biological relapse in patient-based analyses.

References	Type of imaging	Number of patients	Diagnosed recurrence (%)	LR (%)	BR (%)	LNR (%)
Gauvin et al. (40)	Choline-PET	N = 60	63.3	26.6	8	20
Schwenck et al. (41)	Choline-PET	N = 123	79	–	64	71
	PSMA-PET		83	–	98	94
Uprimny et al. (42)	PSMA-PET	N = 203	62.1	12.8	17.2	39.9
Afshar-Oromieh et al. (43)	PSMA-PET	N = 1,007	79.5	9.6	13	26.1
Calais et al. (44)	PSMA-PET	N = 50	56	14	8	30
	Fluciclovine-PET		26	18	0	8
Mena et al. (45)	DCFBC-PET	N = 68	60.3	44	16.6	57
Robertson et al. (46)	WB-MRI	N = 76	21	9	9	8

Choline-PET, choline C-11 positron emission tomography; DCFBC-PET, DCFBC positron emission tomography; PSMA-PET, prostate-specific membrane antigen-positron emission tomography; WB-MRI, whole body magnetic resonance imaging; LR, local recurrence; BR, bone recurrence; LNR, lymph node recurrence.

**TABLE 5 |** Sensitivity and specificity of currently available functional and targeted imaging methods for detection of suspected recurrence in PCa with biological relapse in patient-based analyses.

References	Type of imaging	Number of patients	Se (%)			Sp (%)		
			PB	LN	BM	PB	LN	BM
Huyse et al. (36)	Bone MRI	N = 64	–	–	100	–	–	96
	Choline-PET		–	–	87	–	–	100
Kitajima et al. (47)	MRI	N = 115	88.5	64	87.5	84.6	85	96.2
	Choline-PET		54.1	90	81.3	92.3	100	98.7
Afshar-Oromieh et al. (43)	PSMA-PET	N = 1,007	79.5%	–	–	–	–	–
Zacho et al. (48)	MRI	N = 60	–	–	25	–	–	87
	PSMA-PET		–	–	80	–	–	100
	NaF-PET		–	–	90	–	–	98
Bach-Gansmo et al. (49)	Fluciclovine-PET	N = 596	88.1	–	–	32.6	–	–

PB, prostate bed; LN, lymph node; BM, bone metastasis; Bone MRI, bone magnetic resonance imaging; Choline-PET, choline C-11 positron emission tomography; MRI, magnetic resonance imaging; NaF-PET, 18F-sodium fluoride positron emission tomography; PSMA-PET, prostate-specific membrane antigen-positron emission tomography; Se, sensitivity; Sp, specificity.

early pelvic imaging was found to be of benefit in another study of 203 patients with BCR. The number of equivocal findings on PET scans 60 min post injection was significantly reduced with the help of early imaging (15.8 vs. 4.5%;  $P < 0.001$ ) (42). DCE imaging performed the best for suspected prostate bed recurrence, detecting correlates for 87.5% (14/16) of PSMA-positive prostate bed foci (54). With 18F-DCFBC PET/CT, using another PSMA-targeted PET agent, recurrences were detected in 60.3% of patients with BCR, but the results were dependent on PSA levels. Above a threshold PSA value of 0.78 ng/mL, among a total of 79 18F-DCFBC avid lesions, 30 were in the prostate bed (45). Moreover, as salvage radiotherapy is most effective at low serum PSA values, PSMA-PET/CT imaging could be used to optimize radiotherapy planning by defining the target lesions or areas that are most appropriate for boost radiotherapy (55).

As fluciclovine is an 18F radiotracer, an on-site cyclotron is not required for its production, which is useful in clinical routine. In a prospective trial of 100 patients, there was a statistically significant difference in terms of detection of local relapse between 11C-choline and 18F-fluciclovine ( $p < 0.0001$ ) (56). Nevertheless, in patients with an intact prostate, fluciclovine-PET demonstrates high sensitivity and low specificity in identifying

local recurrent disease with a sensitivity of 88–90% and specificity of 32–40% (57). In a new a single-center study including 50 participants, Calais et al. tested PSMA-PET and fluciclovine-PET head-to-head in the same patients and compared their cancer detection rates in patients with low serum PSA levels (<2 ng/ml) after radical prostatectomy. Detection rates for prostate bed recurrence did not differ significantly between the two radiotracers (18 vs. 14%;  $p = 0.73$ ) (44).

### Is There LN Involvement?

In the case of biological recurrence, 11C-choline PET/CT is superior for detecting pelvic LN metastases when restaging prostatectomy patients with suspected recurrent disease (47). Choline-PET/CT showed good sensitivity and specificity for the early detection of LN metastases (58, 59), especially in cases of failure of conventional imaging to detect metastases.

In the study by Kitajima et al., the sensitivity and specificity for LN recurrence detection were 90% and 100% for choline-PET/CT, and 64% and 85% for MRI, respectively (47). Choline-PET/CT performances are better for higher PSA levels and higher PSA doubling time. Various PSA cut-offs, between 1.4 and 2.6 ng/mL, have been suggested to determine the optimal timing



to perform choline-PET/CT (40). Previous studies have indicated that recurrence can be identified with a detection rate of 19% (60), 26% (61), or 31% (62) in patients with PSA < 1 ng/mL. This threshold can be lowered when the PSA velocity is >1 ng/mL/year, if PSA doubling time is <6 months, or if androgen deprivation therapy is ongoing (62–64). In a study of 123 patients with relapsed PCa, PSMA-PET/CT showed a higher LN detection rate than choline-PET/CT (94 vs. 71%,  $p < 0.001$ ), even though ultimately there were mismatches for both tracers (41).

In 2016, the U.S. Food and Drug Administration found the accuracy of fluciclovine-PET to be superior to that of other molecular imaging techniques, including Choline-PET and subsequently granted approval for its use in PET of recurrent prostate cancer.

A large multisite study of 596 patients found a high PPV of 92.3% in the detection of extraprostatic disease (49). In patients with PSA values <1 ng/mL, fluciclovine has relatively low sensitivity for extraprostatic disease ranging from 21 to 39%.

The results of the head to head Calais's trial, revealed that cancer detection rates of BCR per patient were significantly lower with fluciclovine PET than with PSMA-PET (26 vs. 56%;  $p = 0.0026$ ). On further analysis, fluciclovine detection rates of BCR were significantly lower than PSMA-PET detection rates for the pelvic lymph node region (8 vs. 30%;  $p = 0.0034$ ) and for any extrapelvic lesions (0 vs. 16%;  $p = 0.0078$ ) (44).

### Is There Bone Disease?

When PSA is high (>10 ng/mL), standard imaging i.e., CT scan and bone scan is usually sufficient to confirm the metastatic status (63). However, in cases of BCR and a low PSA level, PET/CT may be indicated to view the recurrence site and search for distant metastases with more accuracy than conventional imaging (39, 65).

In the study by Kitajima et al., the sensitivity and specificity for bone recurrence detection were 81.3 and 98.7% for choline-PET/CT, and 87.5 and 96.2% for MRI, respectively (47). In another study of 64 patients with biological relapse, the sensitivity of MRI was significantly better compared to that of choline-PET/CT ( $p = 0.031$ ), and the specificity did not differ significantly ( $p = 0.125$ ) (36).

In a single-center retrospective study, of 106 patients with metastatic prostate cancer who had both fluciclovine-PET/CT and bone scan within 3-month interval, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for bone scan were 79, 86, 45, and 96%, respectively; and 100, 98, 89, and 100% in fluciclovine PET/CT, respectively. These results demonstrated that fluciclovine-PET/CT detected more bone metastases than bone scan. Importantly, there were no lesions identified by bone scan that was missed by fluciclovine-PET/CT (66).

Currently, recurrent PCa is the main indication for the use of PSMA-PET, and the majority of published data focus on this setting. In patients who have undergone RP, PSMA-PET/CT improves detection of metastatic PCa compared with conventional cross-sectional imaging or bone scintigraphy. Furthermore, it increases the detection of lesions even at serum PSA values <0.5 ng/mL compared with conventional imaging or

PET examination with different tracers. In a study including over 1,000 patients, PSMA-PET/CT detected at least one recurrence site in 801 patients (79.5%), with high detection rates even for low PSA levels, at 46 and 73% for PSA <0.5 ng/mL and PSA between 0.5 and 1 ng/mL, respectively (43). In another study of 123 patients with relapsed PCa, PSMA-PET showed a higher detection rate than choline-PET/CT for bone lesions (98 vs. 64%), even though ultimately there were mismatches for both tracers (41). PSMA-PET/CT and 18FNa-PET/CT methods were comparable and performed significantly better than DW600-MRI, which was less adequate for diagnosing bone metastases when conducted in accordance with the European Society of Urogenital Radiology guidelines (48).

In the Calais's trial, no significant differences were observed between different levels of extrapelvic disease (M1a, M1b, and M1c) between fluciclovine-PET and PSMA-PET, most probably because the sample sizes were too small ( $N = 50$ ) (44).

## Monitoring of Metastatic PCa

### Extent of Disease

New imaging modalities such as MRI, choline, fluciclovine, and PSMA-PET/CT, appear to have excellent sensitivity and specificity for lesion detection, although they have not yet been adequately tested in formal clinical trials. For example, the lymph node detection sensitivity of choline-PET/CT varies from 41.5 to 56%, while the specificity varies from 94 to 98.8%, with higher sensitivity observed for the detection of LN >5 mm, and particularly outside lymphadenectomy territories (67–69). Data on the impact of this gain in sensitivity on patient care is lacking. Moreover, the CT scan of the past bears little resemblance of the CT scanning we use today, particularly with resolution. And PSMA-scans vary in the radio-isotope used as well as the molecules used as imaging probes. These PSMA-scans are generally undertaken in conjunction with an axial imaging modality.

Currently, the therapeutic decision is based on the experience of clinicians, the status of the disease, and patient comorbidities (63). The St Gallen consensus proposes thoracic and abdominopelvic CT as well as a bone scintigraphy before the beginning of a new treatment and for use during patient follow-up (3, 4). In previous clinical trials among metastatic PCa patients, heterogeneity in terms of imaging is the rule. The various modalities employed at initial staging and evaluation of treatment response are summarized in Table 6 for hormone-sensitive PCa, Table 7 for first-line castration-resistant PCa, and Table 8 for castration-resistant PCa in subsequent lines.

### Response to Treatment

To date, limited data are available on the use of modern imaging in the evaluation of therapeutic response. This is particularly the case with fluciclovine-PET/CT.

### Choline-PET/CT

Few studies have been published regarding the evaluation of therapeutic response with choline-PET/CT. In a retrospective study of 172 consecutive patients with BCR, choline-PET/CT was

**TABLE 6 |** Assessment exams in former phase III trials.

	GETUG-15 (70)		CHAARTED (71)		LATITUDE (72)	
	Type of evaluation	Time	Type of evaluation	Time	Type of evaluation	Time
Clinical exam	x	Baseline then/3 weeks in the docetaxel group/3 months in the ADT group	x	Baseline then/3 weeks in the docetaxel group/3 months in the ADT group	–	–
Bone scan	–	–	x	Baseline then to the diagnosis of castration or if clinically indicated	–	–
Bone CT	x	Baseline then/3 months	–	–	x bone metastases diagnosis	Baseline then by/4 months from week 16
Thoracic CT	x	“CT Scan”: Baseline then/3 months	x or thoracic radio	Baseline then to the diagnosis of castration or if clinically indicated	x diagnosis measurable metastases according to RECIST 1.1	Baseline then by/4 months from week 16
Abdomen and pelvis CT	x	–	x	–	x diagnosis measurable metastases according to RECIST 1.1	Baseline then by/4 months from week 16
MRI	–	–	–	–	x diagnosis measurable metastases according to RECIST 1.1	Baseline then by/4 months from week 16
PSA	x	Baseline then/3 weeks in the docetaxel group/3 months in the ADT group	x	Baseline then/3 weeks in the docetaxel group/3 months in the ADT group	x	Baseline then 1/month the first year then 1/2 months

**TABLE 7 |** Assessment exams in former phase III trials in patients who are resistant to castration in the first line setting.

	TAX 327 (73)		COU-AA 302 (74)		PREVAIL (75)	
	Type of evaluation	Time	Type of evaluation	Time	Type of evaluation	Time
Clinical exam	x	/3 weeks	x	Baseline and pre-specified visits	x	Baseline and pre-specified visits
Bone scan	–	–	x	CT or MRI and bone scan every 8 weeks during the first 24 weeks and then every 12 weeks beyond	x	CT or MRI and bone scinti at the time of screening, at weeks 9, 17, and 25, and every 12 weeks thereafter
Thoracic CT	–	–	x	–	x	–
Abdominal and pelvic CT	–	–	x	–	x	–
MRI	–	–	x	–	x	–
PSA dosage	x	/3 weeks	x	Baseline and pre-specified visits	x	Unspecified time. Discontinuation of treatment on isolated elevation of the PSA not recommended
Unspecified imaging and other	x	All 6–9 weeks repeated after 4 weeks if response	–	–	–	–

positive in 80% of cases, resulting in a management change in 43.6% of cases (79).

Maines et al. evaluated the role of choline-PET/CT in monitoring the response to enzalutamide in 30 patients with

metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). The authors observed that the maximum standardized uptake value (SUV<sub>max</sub>) measured in choline-PET/CT before treatment with enzalutamide was significantly related to survival without BCR,

**TABLE 8** | Assessment exams in former phase III trials in patients who are resistant to castration in subsequent lines.

	ALSYMPCA (76)		TROPIC (77)		COU-AA-301 (78)	
	Type of evaluation	Time	Type of evaluation	Time	Type of evaluation	Time
Clinical exam	×	Baseline and follow-up	×	Baseline and at each injection	×	–
Bone scan	–	–	–	–	–	–
Thoracic CT	–	–	–	–	×	–
Abdomen and pelvic CT	–	–	–	–	–	–
MRI	–	–	–	–	–	–
PSA dosage	×	After the 12th week	×	–	×	–
Unspecified imaging and other	ALP 1st symptomatic bone events	After the 12th week for ALP	×	–	–	–

survival without radiological progression, and overall survival (OS) (80). De Giorgi et al. evaluated choline-PET/CT in the assessment of response to abiraterone in 43 patients. There was a discrepancy between PSA response and choline-PET/CT response in 52% of the patients, and only PET was associated with progression-free survival and OS, in the multivariate analysis (81). Studies were less conclusive in docetaxel response assessment, with disparate findings either in favor of an added value of choline-PET/CT in comparison with PSA kinetics (82), or of limited value in comparison to response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) 1.1 criteria (83).

#### PSMA-PET/CT

In a study of 262 patients, 336 PSMA-PET/CTs were performed and detected disease progression and resistance to castration in 100% of cases. A diagnosis of extra-prostatic disease was made at baseline in 53.2% of cases before starting any treatment (84). Albinini et al. studied the clinical impact of PSMA-PET in patient management and found a change in the treatment plan for 76% of patients (85). This new imaging modality is very promising and might be at the center of treatment planning in the BCR setting in the future, especially for oligometastatic patients.

PSMA-PET has opened new therapeutic avenues. PSMA-positive mCRPC can be treated with specific inhibitors such as Lutetium-177 [177Lu]-PSMA-617. An open-label single-center phase 2 trial from the Peter MacCallum Cancer Center in Melbourne, Australia has shown high response rates, low toxic effects, and a reduction of pain in men with mCRPC who have progressed after conventional treatments (86).

As PSMA-PET/CT is increasingly adopted in clinical trials and routine practice worldwide, a unified language for image reporting is urgently needed.

#### NaF-PET/CT

In the US registry study on PET, in 3,531 patients with PCa, NaF-PET/CT impact management replaced the use of other advanced imaging techniques in 50% of cases (87). Treatment plan modification was recommended in 76% of cases (87). Furthermore, Etchebehere et al.'s (88) recent study in 42 patients with castration-resistant PCa during radium-223 treatment

showed that NaF can be a predictive marker for OS and occurrence of bone-related events.

#### Bone-scan

Concerning the monitoring of patients with bone metastases, evaluation of response to treatment with a bone scan is also challenging because of the flare-up effect that can occur up to 12 weeks after the beginning of treatment. This is why intensity changes or minor changes in the extent of existing lesions are non-specific, and should not be considered as a determinant of progression (37). Bone scintigraphy with or without SPECT-CT only distinguishes “progression/non-progression” or “new lesion/absence of new lesions” without the possibility of early identification of “response/non-response.” For exclusive bone metastases, bone progression is defined by the PCa Clinical Trials Working Group 3 (PCWG3) (89) as the occurrence of at least two new lesions. The PCWG3 emphasized that only positivity on the bone scan defines metastatic disease to the bone.

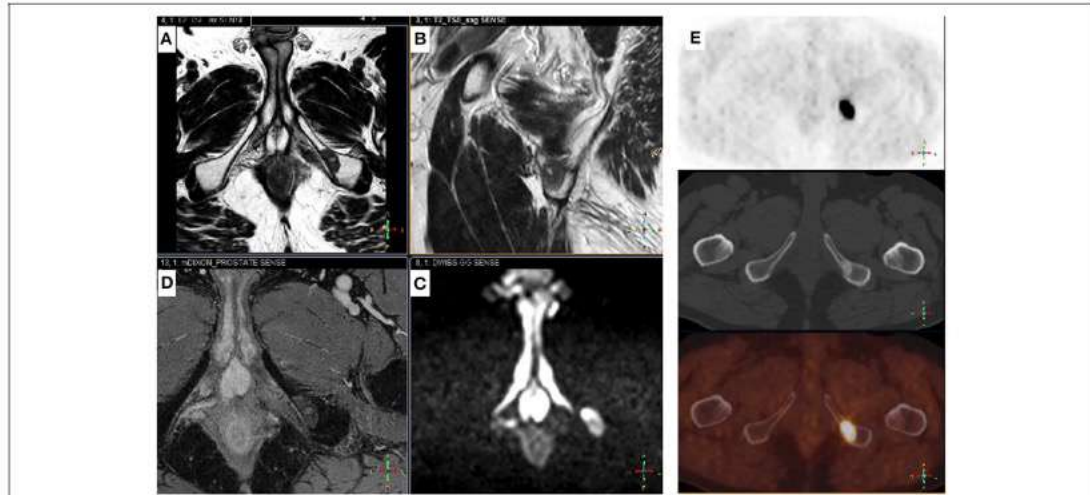
#### MRI

Regarding bone MRI, there have been few studies with specific evaluation of the response in bone metastatic PCa patients (90, 91). Reischauer et al. found that the mean diffusivity of the lesions increased considerably after hormone therapy. There was also a spatial heterogeneity in the metastases, as the diffusivity of water increases at the center of the lesions. An important challenge is attempting to evaluate the activity of the disease through the MRI sequences. Some abnormalities, such as false pseudo-progression in the T1-W sequence, may exist due to an edematous reaction of the bone marrow related to tumor destruction and inflammation (92). In MRI, T1 and saturated fat sequences improve the identification of the radiological response due to the recognition of the return of the fat from the responder marrow. In patients with castration-resistant PCa, T1-W MRI more than doubled the proportion of patients with measurable lesions (29% on the scanner vs. 66% on the MRI) and allowed discrimination of the radiological responses between complete response, partial response, stability, or progression. Thus, MRI size/volume measurements are useful for evaluating the response beyond bone scintigraphy, which

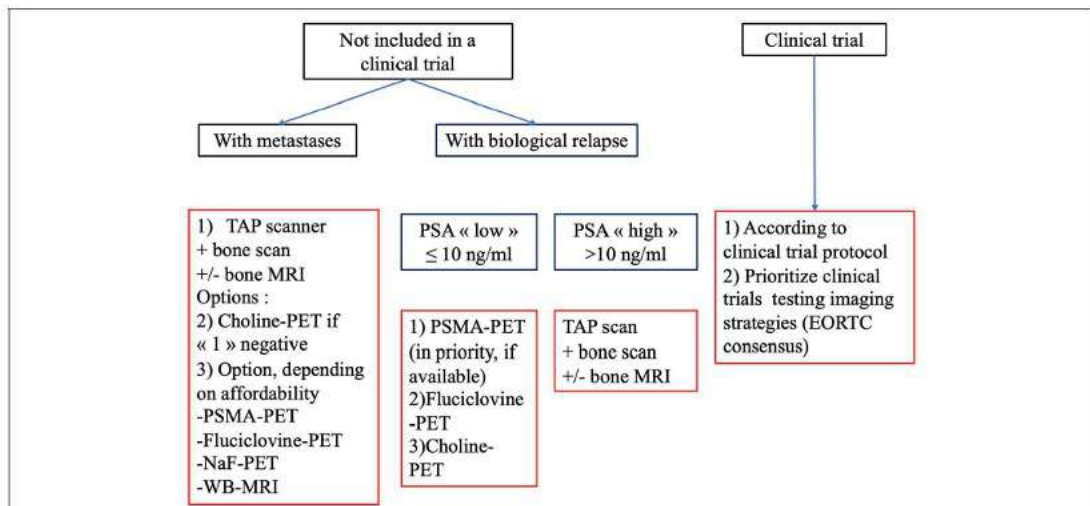
identifies progression only (93). The results of diffusion MRI are heterogeneous. A confounding factor in the interpretation of the results is the concomitant use of inhibitors of bone resorption, such as bisphosphonates or anti-RANKL. Their individual effects

have not yet been described in the interpretation of bone parameters in functional MRI.

WB-MRI is more reliable in identifying and measuring bone disease than CT (94) or scintigraphy (95). Morphological



**FIGURE 3 |** Complementary Choline-TEP and pelvic MRI. Patient with a history of Gleason 7 (4 + 3) prostatic adenocarcinoma treated by radical prostatectomy 9 years ago (pT3aNMOR1). PSA recurrence 5 years later followed by EBRT, external beam radiation therapy. Three years later, rising PSA from 0.5 to 1.4 ng/mL in 6 months. Prostate MRI performed before 18-F choline-PET-CT shows no sign of recurrence in the prostatectomy bed, but detected a 17-mm suspicious bone lesion in the left ischiopubic branch. Typical signal on axial (A) and sagittal (B) T2-w images were low and homogeneous; high on b-1000 axial diffusion-weighted images (DWI) (C) and high on late T1-w dynamic contrast-enhanced (DCE) images (D), corresponding to high cellular density and hypervascularization, respectively. 18F choline-PET-CT (E): axial slices of the pelvis showing an osteosclerotic lesion on the right ischiopubic branch with high uptake of the tracer. From top to bottom: PET, CT, PET-CT.



**FIGURE 4 |** Flow chart of recommended imaging in evaluating metastatic PCa in routine practice.

approaches to MRI using diffusion and contrast have recently been extended to bone and significantly contributed to improving the diagnostic performance of WB-MRI (96). MRI and PET-CT allow quantification of disease and categorization of patients into “complete response,” “partial response,” “stable disease,” or “progressive disease” and therefore provide objective evidence of therapeutic benefits. In the future, hybrid PET/MRI scanners may play a key role in the imaging of metastatic bone disease.

## DISCUSSION

### Summary of the Main Findings

The most thoroughly validated tests in clinical trials and in clinical practice are the “good old tests” such as bone scan and contrast-enhanced thorax, abdomen, and pelvis CT.

Nevertheless, most of the evidence based for bone scan and CT are old and retrospective. There is actually a much larger amount of prospective data for “modern” PET/CT. Prospective data also shows clear superiority of PSMA-PET or fluciclovine-PET to choline-PET. Data from a new study suggests that PSMA-PET imaging is superior to fluciclovine-PET for detecting biochemical recurrence in men with prostate cancer (44). However, whether one of these radiotracers improves patient survival over the other is unknown and further research is needed to determine which has the greater effect.

The new tracers do not have the same accessibility and need further validation in clinical trials to evaluate their benefits and clarify their usage in routine clinical practice. It is important that we consider the imaging requirements of the PCWG as this defines the imaging definitions for subjects in those clinical trials. EORTC algorithms also need to be considered for the imaging strategies. Experts in nuclear medicine and radiology should be represented in medical decision-making teams for PCa.

### Brief Idea for the Future

Modern PET/CT have a high overall sensitivity, whereas WB-MRI has a high specificity. They are therefore complementary techniques, hence the interest in PET/MRI (97) (Figure 3). The future is certainly in the combination of imaging techniques, and a recent EORTC consensus proposed clinical trials that use modern imaging methods to evaluate the benefits of metastasis-directed therapies. The EORTC imaging group suggested a clinical algorithm to integrate modern imaging methods into care pathways to identify oligometastatic disease at the various PCa stages (6). Recently, Eiber et al. proposed a molecular imaging tumor, node, and metastasis system (miTNM Version 1.0) as a standardized reporting framework for PSMA-ligand PET/CT or PET/MRI (98). Padhani et al. proposed the METastasis Reporting and Data System for PCa, which provides imaging recommendations designed to promote standardization and reduce variations in MRI acquisition, interpretation, and reporting in advanced PCa, not only at the beginning of treatment, but also as the disease progresses. However, this technique requires validation in clinical trials (99).

### Developing Landscape for Non-metastatic Castration-Resistant PCa

Non-metastatic CRPC (nmCRPC) prevalence has been estimated at 7% of PCa in the European Union (100). Owing to the advent of modern imaging, the prevalence of this subgroup has declined. These newer imaging agents i.e., fluciclovine or PSMA can identify local recurrence or metastases at PSA levels far below the traditional PSA threshold for other imaging modalities such as CT or bone scan. Some of the new PET agents can identify metastatic lesions at PSA values as low as 0.2–0.5 ng/mL, allowing the prompt identification of M1 CRPC (100). This is interesting given the recent randomized studies in this field (SPARTAN and PROSPER), which show the efficacy of apalutamide (101) and enzalutamide (102). The metastasis-free survival of patients with nmCRPC was previously estimated as ~25–30 months, but can now be significantly prolonged using combination next-generation hormone therapy with ADT (100). The use of PSA doubling time to determine risk for progression can guide the appropriate timing for starting therapy. For instance, a PSA doubling time  $\leq 10$  months is appropriate to initiate therapy. There is no currently established standard of care option for treatment of this population, hence the need for enrollment in clinical trials (103).

## CONCLUSION

This is a wide critical literature review of the imaging methods in prostatic cancer, focused especially on metastasis detection and treatment response assessment. In this common but paradoxical cancer, many imaging methods are available, but the recommendations are not clearly established.

Modern PET/CT imaging techniques provide better sensitivity and specificity of metastasis detection, especially in cases of biochemical recurrence with low values of prostate specific antigen. Conventional imaging i.e., bone scan, CT-scan or MRI still have a role, especially in localized and metastatic disease for the follow-up of patients under systemic treatment. We have summarized our findings in Figure 4 with a proposed algorithm to facilitate communication between imagers and clinicians, in order to select the most-validated imaging. Validated clinical trials with new radiotracers are needed.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AT, EG, and NP did the concept of the review. AT and EG acquired the data and select the articles of interest in the literature. NP controlled the quality of data. AT, EG, CB, and PP prepared the manuscript. PP and CB selected images of interest and did the figures. AV, JO, and DP reviewed the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Severine Marchant (Centre Oscar Lambret) for editing the manuscript and Editage ([www.editage.com](http://www.editage.com)) for English language editing.

## REFERENCES

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* (2018) 68:394–424. doi: 10.3322/caac.21492
- Sartor O, de Bono JS. Metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* (2018) 378:1653–4. doi: 10.1056/NEJMra1701695
- Gillessen S, Omlin A, Attard G, de Bono JS, Efstathiou E, Fizazi K, et al. Management of patients with advanced prostate cancer: recommendations of the St Gallen Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) 2015. *Ann Oncol.* (2015). 26:1589–604. doi: 10.1093/annonc/mdv360
- Gillessen S, Attard G, Beer TM, Beltran H, Bossi A, Bristow R, et al. Management of patients with advanced prostate cancer: the Report of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference APCCC 2017. *Eur Urol.* (2017). 73:178–211. doi: 10.1016/j.eururo.2017.06.002
- Fanti S, Minozzi S, Antoch G, Banks I, Briganti A, Carrio I, et al. Consensus on molecular imaging and theranostics in prostate cancer. *Lancet Oncol.* (2018) 19:e696–708. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30604-1
- Lecouvet FE, Oprea-Lager DE, Liu Y, Ost P, Bidaut I, Collette L, et al. Use of modern imaging methods to facilitate trials of metastasis-directed therapy for oligometastatic disease in prostate cancer: a consensus recommendation from the EORTC Imaging Group. *Lancet Oncol.* (2018) 19:e534–45. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30571-0
- Rouvière O, Vitry T, Lyonnet D. Imaging of prostate cancer local recurrences: why and how? *Eur Radiol.* (2010) 20:1254–66. doi: 10.1007/s00330-009-1647-4
- Abuzalouf S, Dayes I, Lukka H. Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. *J Urol.* (2004) 171:2122–7. doi: 10.1097/01.ju.0000123981.03084.06
- Hövels AM, Heesakkers RM, Adang EM, Jager GJ, Strum S, Hoogeveen YL, et al. The diagnostic accuracy of CT and MRI in the staging of pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Radiol.* (2008) 63:387–95. doi: 10.1016/j.crad.2007.05.022
- Mapelli P, Picchio M. Initial prostate cancer diagnosis and disease staging—the role of choline-PET-CT. *Nat Rev Urol.* (2015) 12:510–8. doi: 10.1038/nrurol.2015.191
- Maurer T, Gschwend JE, Rauscher I, Souvatzoglou M, Haller B, Weirich G, et al. Diagnostic efficacy of 68Gallium-PSMA positron emission tomography compared to conventional imaging for lymph node staging of 130 consecutive patients with intermediate to high risk prostate cancer. *J Urol.* (2016) 195:1436–43. doi: 10.1016/j.juro.2015.12.025
- Kim S-J, Lee S-W, Ha HK. Diagnostic performance of radiolabeled prostate-specific membrane antigen positron emission tomography/computed tomography for primary lymph node staging in newly diagnosed intermediate to high-risk prostate cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Urol Int.* (2018) 102:27–36. doi: 10.1159/000493169
- Harisinghani MG, Barentsz J, Hahn PF, Deserno WM, Tabatabaei S, van de Kaa CH, et al. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N Engl J Med.* (2003) 348:2491–9. doi: 10.1056/NEJMoa022749
- Thoeny HC, Froehlich JM, Triantafyllou M, Huesler J, Bains LJ, Vermathen P, et al. Metastases in normal-sized pelvic lymph nodes: detection with diffusion-weighted MR imaging. *Radiology.* (2014) 273:125–35. doi: 10.1148/radiol.14132921
- Weinreb JC, Barentsz JO, Choyke PL, Cornud F, Haider MA, Macura KJ, et al. PI-RADS prostate imaging - reporting and data system: 2015, version 2. *Eur Urol.* (2016) 69:16–40. doi: 10.1016/j.eururo.2015.08.052
- Pesapane F, Czarniecki M, Suter MB, Turkbey B, Villeirs G. Imaging of distant metastases of prostate cancer. *Med Oncol.* (2018) 35:148. doi: 10.1007/s12032-018-1208-2
- Hillner BE, Siegel BA, Shields AE, Liu D, Gareen IF, Hunt E, et al. Relationship between cancer type and impact of PET and PET/CT on intended management: findings of the national oncologic PET registry. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* (2008) 49:1928–35. doi: 10.2967/jnumed.108.056713
- Beauregard J-M, Blouin A-C, Fradet V, Caron A, Fradet Y, Lemay C, et al. FDG-PET/CT for pre-operative staging and prognostic stratification of patients with high-grade prostate cancer at biopsy. *Cancer Imaging Off Publ Int Cancer Imaging Soc.* (2015) 15:2. doi: 10.1186/s40644-015-0038-0
- Grivas N, Hinnen K, de Jong J, Heemsbergen W, Moonen L, Witteveen T, et al. Seminal vesicle invasion on multi-parametric magnetic resonance imaging: correlation with histopathology. *Eur J Radiol.* (2018) 98:107–12. doi: 10.1016/j.ejrad.2017.11.013
- Pinaquy J-B, De Clermont-Galleran H, Pasticier G, Rigou G, Alberti N, Hindie E, et al. Comparative effectiveness of [(18) F]-fluorocholine PET-CT and pelvic MRI with diffusion-weighted imaging for staging in patients with high-risk prostate cancer. *Prostate.* (2015) 75:323–31. doi: 10.1002/pros.22921
- Fendler WP, Schmidt DF, Wenter V, Thierfelder KM, Zach C, Stief C, et al. 68Ga-PSMA PET/CT detects the location and extent of primary prostate cancer. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* (2016) 57:797–5. doi: 10.2967/jnumed.116.172627
- Soylu FN, Peng Y, Jiang Y, Wang S, Schmid-Tannwald C, Sethi I, et al. Seminal vesicle invasion in prostate cancer: evaluation by using multiparametric endorectal MR imaging. *Radiology.* (2013) 267:797–806. doi: 10.1148/radiol.13121319
- Dominguez C, Plata M, Cataño JG, Palau M, Aguirre D, Narvaez J, et al. Diagnostic accuracy of multiparametric magnetic resonance imaging in detecting extracapsular extension in intermediate and high - risk prostate cancer. *Int Braz J Urol.* (2018) 44:688–96. doi: 10.1590/s1677-5538.1016.0485
- de Rooij M, Hamoen EHJ, Fütterer JJ, Barentsz JO, Rovers MM. Accuracy of multiparametric MRI for prostate cancer detection: a meta-analysis. *Am J Roentgenol.* (2014) 202:343–51. doi: 10.2214/AJR.13.11046
- Shen G, Deng H, Hu S, Jia Z. Comparison of choline-PET/CT, MRI, SPECT, and bone scintigraphy in the diagnosis of bone metastases in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Skeletal Radiol.* (2014) 43:1503–13. doi: 10.1007/s00256-014-1903-9
- Beheshti M, Langsteger W, Fogelman I. Prostate cancer: role of SPECT and PET in imaging bone metastases. *Semin Nucl Med.* (2009) 39:396–407. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2009.05.003
- O'Sullivan JM, Norman AR, Cook GJ, Fisher C, Dearnaley DP. Broadening the criteria for avoiding staging bone scans in prostate cancer: a retrospective study of patients at the Royal Marsden Hospital. *BJU Int.* (2003) 92:685–9. doi: 10.1046/j.1464-410X.2003.04480.x
- Beheshti M, Rezaee A, Geinitz H, Loidl W, Pirich C, Langsteger W. Evaluation of prostate cancer bone metastases with 18F-NaF and 18F-fluorocholine PET/CT. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* (2016) 57(Suppl. 3):55S–60S. doi: 10.2967/jnumed.115.169730
- Lin K, Szabo Z, Chin BB, Civelek AC. The value of a baseline bone scan in patients with newly diagnosed prostate cancer. *Clin Nucl Med.* (1999) 24:579–82. doi: 10.1097/00003072-199908000-00007
- O'Sullivan GJ, Carty FL, Cronin CG. Imaging of bone metastasis: an update. *World J Radiol.* (2015) 7:202–11. doi: 10.4329/wjr.v7.i8.202
- Kjölhede H, Ahlgren G, Almquist H, Liedberg F, Lyttkens K, Ohlsson T, et al. Combined 18F-fluorocholine and 18F-fluoride positron emission tomography/computed tomography imaging for staging of high-risk prostate cancer. *BJU Int.* (2012) 110:1501–6. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11123.x
- Poulsen MH, Bouchelouche K, Høiland-Carlson PF, Petersen H, Gerke O, Steffansen SI, et al. [18F]fluoromethylcholine (FCH) positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) for lymph node staging of prostate cancer: a prospective study of 210 patients. *BJU Int.* (2012) 110:1666–71. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11150.x
- Wieder H, Beer AJ, Holzapfel K, Henninger M, Maurer T, Schwarzenboeck S, et al. 11C-choline PET/CT and whole-body MRI including diffusion-weighted imaging for patients with recurrent prostate cancer. *Oncotarget.* (2017) 8:66516–27. doi: 10.18632/oncotarget.16227
- Emmett L, Metser U, Bauman G, Hicks RJ, Weickhardt A, Davis ID, et al. A prospective, multi-site, international comparison of F-18 fluoromethyl-choline, multi-parametric magnetic resonance and Ga-68 HBED-CC (PSMA-11) in men with high-risk features and biochemical failure after radical prostatectomy: clinical performance and patient outcome. *J Nucl Med.* (2018) 60:794–800. doi: 10.2967/jnumed.118.220103

35. Gillebert Q, Huchet V, Rousseau C, Cochet A, Olivier P, Courbon F, et al. 18F-fluorocholine PET/CT in patients with occult biochemical recurrence of prostate cancer: detection rate, impact on management and adequacy of impact. A prospective multicentre study. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0191487. doi: 10.1371/journal.pone.0191487
36. Huyse W, Lecouvet F, Castellucci P, Ost P, Lambrecht V, Artigas C, et al. Prospective comparison of F-18 choline PET/CT scan versus axial MRI for detecting bone metastasis in biochemically relapsed prostate cancer patients. *Diagn Basel Switz*. (2017) 7:e56. doi: 10.3390/diagnostics7040056
37. Fox JJ, Morris MJ, Larson SM, Schöder H, Scher HI. Developing imaging strategies for castration resistant prostate cancer. *Acta Oncol*. (2011) 50(Suppl. 1):39–48. doi: 10.1019/0284186X.2011.572914
38. Larbi A, Omoumi P, Pasoglou V, Michoux N, Triqueneaux P, Tombal B, et al. Whole-body MRI to assess bone involvement in prostate cancer and multiple myeloma: comparison of the diagnostic accuracies of the T1, short tau inversion recovery (STIR), and high b-values diffusion-weighted imaging (DWI) sequences. *Eur Radiol*. (2018). 29:4503–13. doi: 10.1007/s00330-018-5796-1
39. Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, De Santis M, Gross T, et al. EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of relapsing, metastatic, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*. (2016) 71:630–42. doi: 10.1016/j.eururo.2016.08.002
40. Gauvin S, Cerantola Y, Haberer E, Pelsser V, Probst S, Bladou F, et al. Initial single-centre Canadian experience with 18F-fluoromethylcholine positron emission tomography-computed tomography (18F-FCH PET/CT) for biochemical recurrence in prostate cancer patients initially treated with curative intent. *Can Urol Assoc J*. (2017) 11:47–52. doi: 10.5489/auaj.4068
41. Schwenck J, Rempp H, Reischl G, Kruck S, Stenzl A, Nikolaou K, et al. Comparison of (68)Ga-labelled PSMA-11 and (11)C-choline in the detection of prostate cancer metastases by PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. (2017) 44:92–101. doi: 10.1007/s00259-016-3490-6
42. Uprimny C, Kroiss AS, Decristoforo C, Fritz J, Warwitz B, Scarpa L, et al. Early dynamic imaging in 68Ga-PSMA-11 PET/CT allows discrimination of urinary bladder activity and prostate cancer lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. (2017) 44:765–75. doi: 10.1007/s00259-016-3578-z
43. Afshar-Oromieh A, Holland-Letz T, Giesel FL, Kratochwil C, Mier W, Haufe S, et al. Diagnostic performance of 68Ga-PSMA-11 (HBED-CC) PET/CT in patients with recurrent prostate cancer: evaluation in 1007 patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. (2017) 44:1258–68. doi: 10.1007/s00259-017-3711-7
44. Calais J, Ceci F, Eiber M, Hope TA, Hofman MS, Rischpler C, et al. 18F-fluciclovine PET-CT and 68Ga-PSMA-11 PET-CT in patients with early biochemical recurrence after prostatectomy: a prospective, single-centre, single-arm, comparative imaging trial. *Lancet Oncol*. (2019) 20:1286–94. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30415-2
45. Mena E, Lindenberg ML, Shih JH, Adler S, Harmon S, Bergvall E, et al. Clinical impact of PSMA-based 18F-DCFC PET/CT imaging in patients with biochemically recurrent prostate cancer after primary local therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. (2018) 45:4–11. doi: 10.1007/s00259-017-3818-x
46. Robertson NL, Sala E, Benz M, Landa J, Scardino P, Scher HI, et al. Combined whole body and multiparametric prostate magnetic resonance imaging as a 1-step approach to the simultaneous assessment of local recurrence and metastatic disease after radical prostatectomy. *J Urol*. (2017) 198:65–70. doi: 10.1016/j.juro.2017.02.071
47. Kitajima K, Murphy RC, Nathan MA, Froemming AT, Hagen CE, Takahashi N, et al. Detection of recurrent prostate cancer after radical prostatectomy: comparison of 11C-choline PET/CT with pelvic multiparametric MR imaging with endorectal coil. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. (2014) 55:223–32. doi: 10.2967/jnumed.113.123018
48. Zacho HD, Nielsen JB, Afshar-Oromieh A, Haberkorn U, deSouza N, De Paep K, et al. Prospective comparison of 68Ga-PSMA PET/CT, 18F-sodium fluoride PET/CT and diffusion weighted-MRI at for the detection of bone metastases in biochemically recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. (2018) 45:1884–97. doi: 10.1007/s00259-018-4058-4
49. Bach-Gansmo T, Nanni C, Nieh PT, Zanoni L, Bogsrud TV, Sletten H, et al. Multisite experience of the safety, detection rate and diagnostic performance of fluciclovine (18F) positron emission tomography/computerized tomography imaging in the staging of biochemically recurrent prostate cancer. *J Urol*. (2017) 197:676–83. doi: 10.1016/j.juro.2016.09.117
50. Liauw SL, Pitroda SP, Eggenner SE, Stadler WM, Pelizzari CA, Vannier MW, et al. Evaluation of the prostate bed for local recurrence after radical prostatectomy using endorectal magnetic resonance imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. (2013) 85:378–84. doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.05.015
51. Cha D, Kim CK, Park SY, Park JJ, Park BK. Evaluation of suspected soft tissue lesion in the prostate bed after radical prostatectomy using 3T multiparametric magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging*. (2015) 33:407–12. doi: 10.1016/j.mri.2014.12.003
52. Vadi SK, Singh B, Basher RK, Watts A, Sood AK, Lal A, et al. 18F-Fluorocholine PET/CT complementing the role of dynamic contrast-enhanced MRI for providing comprehensive diagnostic workup in prostate cancer patients with suspected relapse following radical prostatectomy. *Clin Nucl Med*. (2017) 42:e355–61. doi: 10.1097/RLU.00000000000001689
53. Matti A, Lima GM, Zanoni L, Pultrone C, Schiavina R, Lodi F, et al. Interpretation of 11C-choline PET/CT for the diagnosis of local relapse in radically treated prostate cancer. *Eur J Hybrid Imaging*. (2017) 1:5. doi: 10.1186/s41824-017-0007-x
54. Lake ST, Greene KL, Westphalen AC, Behr SC, Zagoria R, Small EJ, et al. Optimal MRI sequences for 68Ga-PSMA-11 PET/MRI in evaluation of biochemically recurrent prostate cancer. *EJNMMI Res*. (2017) 7:77. doi: 10.1186/s13550-017-0327-7
55. Maurer T, Eiber M, Schwaiger M, Gschwend JE. Current use of PSMA-PET in prostate cancer management. *Nat Rev Urol*. (2016) 13:226–35. doi: 10.1038/nrurol.2016.26
56. Nanni C, Schiavina R, Brunocilla E, Boschi S, Borghesi M, Zanoni L, et al. 18F-fluciclovine PET/CT for the detection of prostate cancer relapse: a comparison to 11C-choline PET/CT. *Clin Nucl Med*. (2015) 40:e386–91. doi: 10.1097/RLU.0000000000000849
57. Nanni C, Zanoni L, Pultrone C, Schiavina R, Brunocilla E, Lodi F, et al. (18)F-FACBC (anti-1-amino-3-(18)F-fluorocyclobutane-1-carboxylic acid) versus (11)C-choline PET/CT in prostate cancer relapse: results of a prospective trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. (2016) 43:1601–10. doi: 10.1007/s00259-016-3329-1
58. Karnes RJ, Murphy CR, Bergstralh EJ, DiMonte G, Chevillet JC, Lowe VJ, et al. Salvage lymph node dissection for prostate cancer nodal recurrence detected by 11C-choline positron emission tomography/computerized tomography. *J Urol*. (2015) 193:111–6. doi: 10.1016/j.juro.2014.08.082
59. Rigatti P, Suardi N, Briganti A, Da Pozzo LF, Tutolo M, Villa L, et al. Pelvic/retroperitoneal salvage lymph node dissection for patients treated with radical prostatectomy with biochemical recurrence and nodal recurrence detected by [11C]choline positron emission tomography/computed tomography. *Eur Urol*. (2011) 60:935–43. doi: 10.1016/j.eururo.2011.07.060
60. Giovacchini G, Picchio M, Scattoni V, Garcia Parra R, Briganti A, Gianolli L, et al. PSA doubling time for prediction of [(11)C]choline PET/CT findings in prostate cancer patients with biochemical failure after radical prostatectomy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. (2010) 37:1106–16. doi: 10.1007/s00259-010-1403-7
61. Castellucci P, Ceci F, Graziani T, Schiavina R, Brunocilla E, Mazzarotto R, et al. Early biochemical relapse after radical prostatectomy: which prostate cancer patients may benefit from a restaging 11C-Choline PET/CT scan before salvage radiation therapy? *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. (2014) 55:1424–9. doi: 10.2967/jnumed.114.138313
62. Cimitan M, Evangelista L, Hodolich M, Mariani G, Baseric T, Bodanza V, et al. Gleason score at diagnosis predicts the rate of detection of 18F-choline PET/CT performed when biochemical evidence indicates recurrence of prostate cancer: experience with 1,000 patients. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. (2015) 56:209–15. doi: 10.2967/jnumed.114.141887
63. Hricak H, Choyke PL, Eberhardt SC, Leibel SA, Scardino PT. Imaging prostate cancer: a multidisciplinary perspective. *Radiology*. (2007) 243:28–53. doi: 10.1148/radiol.2431030580
64. Beheshti M, Haim S, Zakavi R, Steinmair M, Waldenberger P, Kunit T, et al. Impact of 18F-choline PET/CT in prostate cancer patients with biochemical recurrence: influence of androgen deprivation therapy and correlation with PSA kinetics. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. (2013) 54:833–40. doi: 10.2967/jnumed.112.110148

65. Li R, Ravizzini GC, Gorin MA, Maurer T, Eiber M, Cooperberg MR, et al. The use of PET/CT in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* (2018) 21:4–21. doi: 10.1038/s41391-017-0007-8
66. Chen B, Wei P, Macapinlac HA, Lu Y. Comparison of 18F-fluciclovine PET/CT and <sup>99m</sup>Tc-MDP bone scan in detection of bone metastasis in prostate cancer. *Nucl Med Commun.* (2019) 40:940–6. doi: 10.1097/MNM.0000000000001051
67. Beheshti M, Imamovic I, Broinger G, Vali R, Waldenberger P, Stoiber F, et al. 18F choline PET/CT in the preoperative staging of prostate cancer in patients with intermediate or high risk of extracapsular disease: a prospective study of 130 patients. *Radiology.* (2010) 254:925–33. doi: 10.1148/radiol.09090413
68. Contractor K, Challapalli A, Barwick T, Winkler M, Hellawell G, Hazell S, et al. Use of [11C]choline PET-CT as a noninvasive method for detecting pelvic lymph node status from prostate cancer and relationship with choline kinase expression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* (2011) 17:7673–83. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2048
69. Schiavina R, Scattoni V, Castellucci P, Picchio M, Corti B, Briganti A, et al. 11C-choline positron emission tomography/computerized tomography for preoperative lymph-node staging in intermediate-risk and high-risk prostate cancer: comparison with clinical staging nomograms. *Eur Urol.* (2008) 54:392–401. doi: 10.1016/j.eururo.2008.04.030
70. Gravis G, Fizazi K, Joly F, Oudard S, Priou F, Esterni B, et al. Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* (2013) 14:149–58. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70560-0
71. Sweeney CJ, Chen Y-H, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med.* (2015) 373:737–46. doi: 10.1056/NEJMoa1503747
72. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus prednisone in metastatic, castration-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med.* (2017) 377:352–60. doi: 10.1056/NEJMoa1704174
73. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* (2004) 351:1502–12. doi: 10.1056/NEJMoa040720
74. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PFA, Sternberg CN, et al. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* (2015) 16:152–60. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71205-7
75. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med.* (2014) 371:424–33. doi: 10.1056/NEJMoa1405095
76. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fossà SD, et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* (2013) 369:213–23. doi: 10.1056/NEJMoa1213755
77. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels J-P, Kocak I, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet Lond Engl.* (2010) 376:1147–54. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61389-X
78. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* (2011) 364:1995–2005. doi: 10.1056/NEJMoa1014618
79. Colombiè M, Campion L, Bailly C, Rusu D, Rousseau T, Mathieu C, et al. Prognostic value of metabolic parameters and clinical impact of <sup>18</sup>F-fluorocholine PET/CT in biochemical recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2015) 42:1784–93. doi: 10.1007/s00259-015-3123-5
80. Maines F, Caffo O, Donner D, Sperduti I, Bria E, Vecchia A, et al. Serial 18F-choline-PET imaging in patients receiving enzalutamide for metastatic castration-resistant prostate cancer: response assessment and imaging biomarkers. *Future Oncol Lond Engl.* (2016) 12:333–42. doi: 10.2217/fon.15.277
81. De Giorgi U, Caroli P, Burgio SL, Menna C, Conteduca V, Bianchi E, et al. Early outcome prediction on 18F-fluorocholine PET/CT in metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone. *Oncotarget.* (2014) 5:12448–58. doi: 10.18632/oncotarget.2558
82. Ceci F, Castellucci P, Graziani T, Schiavina R, Renzi R, Borghesi M, et al. (11)C-Choline PET/CT in castration-resistant prostate cancer patients treated with docetaxel. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2016) 43:84–91. doi: 10.1007/s00259-015-3177-4
83. Schwarzenböck SM, Eiber M, Kundt G, Retz M, Sakretz M, Kurth J, et al. Prospective evaluation of [11C]choline PET/CT in therapy response assessment of standardized docetaxel first-line chemotherapy in patients with advanced castration refractory prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2016) 43:2105–13. doi: 10.1007/s00259-016-3439-9
84. Kallur KG, Ramachandra PG, Rajkumar K, Swamy SS, Desai I, Rao RM, et al. Clinical utility of gallium-68 PSMA PET/CT scan for prostate cancer. *Indian J Nucl Med.* (2017) 32:110–7. doi: 10.4103/0972-3919.202255
85. Albisinni S, Artigas C, Aoun F, Biaou I, Grosman J, Gil T, et al. Clinical impact of 68Ga-prostate-specific membrane antigen (PSMA) positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) in patients with prostate cancer with rising prostate-specific antigen after treatment with curative intent: preliminary analysis of a multidisciplinary approach. *BJU Int.* (2017) 120:197–203. doi: 10.1111/bju.13739
86. Hofman MS, Violet J, Hicks RJ, Ferdinandus J, Thang SP, Akhurst T, et al. [177Lu]-PSMA-617 radionuclide treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (LuPSMA trial): a single-centre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* (2018) 19:825–33. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30198-0
87. Hillner BE, Siegel BA, Hanna L, Duan F, Quinn B, Shields AF. 18F-fluoride PET used for treatment monitoring of systemic cancer therapy: results from the National Oncologic PET Registry. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* (2015) 56:222–8. doi: 10.2967/jnumed.114.150391
88. Etcheberry EC, Araujo JC, Fox PS, Swanston NM, Macapinlac HA, Rohren EM. Prognostic factors in patients treated with 223Ra: the role of skeletal tumor burden on baseline 18F-fluoride PET/CT in predicting overall survival. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* (2015) 56:1177–84. doi: 10.2967/jnumed.115.158626
89. Scher HI, Morris MJ, Stadler WM, Higano C, Basch E, Fizazi K, et al. Trial design and objectives for castration-resistant prostate cancer: updated recommendations from the prostate cancer clinical trials working group 3. *J Clin Oncol.* (2016) 34:1402–18. doi: 10.1200/JCO.2015.64.2702
90. Reischauer C, Froehlich JM, Koh D-M, Graf N, Padevit C, John H, et al. Bone metastases from prostate cancer: assessing treatment response by using diffusion-weighted imaging and functional diffusion maps—initial observations 1. *Radiology.* (2010) 257:523–31. doi: 10.1148/radiol.10092469
91. Messiou C, Collins DJ, Giles S, de Bono JS, Bianchini D, de Souza NM. Assessing response in bone metastases in prostate cancer with diffusion weighted MRI. *Eur Radiol.* (2011) 21:2169–77. doi: 10.1007/s00330-011-2173-8
92. Cook GJR, Azad G, Padhani AR. Bone imaging in prostate cancer: the evolving roles of nuclear medicine and radiology. *Clin Transl Imaging.* (2016) 4:439–47. doi: 10.1007/s40336-016-0196-5
93. Tombal B, Rezazadeh A, Therasse P, Van Cangh PJ, Vande Berg B, Lecouvet FE. Magnetic resonance imaging of the axial skeleton enables objective measurement of tumor response on prostate cancer bone metastases. *Prostate.* (2005) 65:178–87. doi: 10.1002/pros.20280
94. Lecouvet FE, Talbot JN, Messiou C, Bourguet P, Liu Y, de Souza NM. Monitoring the response of bone metastases to treatment with Magnetic Resonance Imaging and nuclear medicine techniques: a review and position statement by the European Organisation for Research and Treatment of Cancer imaging group. *Eur J Cancer.* (2014) 50:2519–31. doi: 10.1016/j.ejca.2014.07.002
95. Ghanem N, Altheoefer C, Högerle S, Schäfer O, Winterer J, Moser E, et al. Comparative diagnostic value and therapeutic relevance of magnetic resonance imaging and bone marrow scintigraphy in patients with metastatic solid tumors of the axial skeleton. *Eur J Radiol.* (2002) 43:256–61. doi: 10.1016/S0720-048X(01)00477-6
96. Liu L-P, Cui L-B, Zhang X-X, Cao J, Chang N, Tang X, et al. Diagnostic performance of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in bone malignancy: evidence from a meta-analysis. *Medicine.* (2015) 94:e1998. doi: 10.1097/MD.0000000000001998



97. Conde-Moreno AJ, Herrando-Parreño G, Muelas-Soria R, Ferrer-Rebolleda J, Broseta-Torres R, Cozar-Santiago MP, et al. Whole-body diffusion-weighted magnetic resonance imaging (WB-DW-MRI) vs choline-positron emission tomography-computed tomography (choline-PET/CT) for selecting treatments in recurrent prostate cancer. *Clin Transl Oncol.* (2017) 19:553–61. doi: 10.1007/s12094-016-1563-4
98. Eiber M, Herrmann K, Calais J, Hadaschik B, Giesel FL, Hartenbach M, et al. Prostate Cancer Molecular Imaging Standardized Evaluation (PROMISE): proposed mTNM classification for the interpretation of PSMA-Ligand PET/CT. *J Nucl Med.* (2018) 59:469–78. doi: 10.2967/jnumed.117.198119
99. Padhani AR, Lecouvet FE, Tunariu N, Koh D-M, De Keyser F, Collins DJ, et al. METastasis reporting and data system for prostate cancer: practical guidelines for acquisition, interpretation, and reporting of whole-body magnetic resonance imaging-based evaluations of multiorgan involvement in advanced prostate cancer. *Eur Urol.* (2017) 71:81–92. doi: 10.1016/j.eururo.2016.05.033
100. Lorient Y, Supiot S, Beauval J-B, Schürmann F, Pasticier G, Sargos P, et al. Management of non-metastatic castrate-resistant prostate cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev.* (2018) 70:223–31. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.09.006
101. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, et al. Apalutamide treatment and metastasis-free survival in prostate cancer. *N Engl J Med.* (2018) 378:1408–18. doi: 10.1056/NEJMoa1715546
102. Hussain M, Fizazi K, Saad F, Rathenborg P, Shore N, Ferreira U, et al. Enzalutamide in men with nonmetastatic, castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* (2018) 378:2465–74. doi: 10.1056/NEJMoa1800536
103. Anantharaman A, Small EJ. Tackling non-metastatic castration-resistant prostate cancer: special considerations in treatment. *Expert Rev Anticancer Ther.* (2017) 17:625–33. doi: 10.1080/14737140.2017.1333903

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Turpin, Girard, Baillet, Pasquier, Olivier, Villers, Puech and Penel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## **BIBLIOGRAPHIE**



Abida, Wassim, Michael L. Cheng, Joshua Armenia, Sumit Middha, Karen A. Autio, Hebert Alberto Vargas, Dana Rathkopf, et al. (2019). « Analysis of the Prevalence of Microsatellite Instability in Prostate Cancer and Response to Immune Checkpoint Blockade ». *JAMA Oncology* 5 (4): 471-78. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.5801>.

Abida, Wassim, Joanna Cyrta, Glenn Heller, Davide Prandi, Joshua Armenia, Ilsa Coleman, Marcin Cieslik, et al. (2019). « Genomic Correlates of Clinical Outcome in Advanced Prostate Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (23): 11428-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902651116>.

Abida, Wassim, Joshua Armenia, Anuradha Gopalan, Ryan Brennan, Michael Walsh, David Barron, Daniel Danila, et al. (2017). « Prospective Genomic Profiling of Prostate Cancer Across Disease States Reveals Germline and Somatic Alterations That May Affect Clinical Decision Making ». *JCO Precision Oncology* 2017. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00029>.

Abrahamsson, P. A. (1996). « Neuroendocrine Differentiation and Hormone-Refractory Prostate Cancer ». *The Prostate. Supplement* 6: 3-8. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0045](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0045)

Aggarwal, Rahul Raj, Dan Costin, Vincent J. O'Neill, Cedric R Burg, Diane I. Healey, Johann S. De Bono, Jingsong Zhang, et al. (2020). « Safety of BXCL701, a Small Molecule Inhibitor of Dipeptidyl Peptidases (DPP), with Pembrolizumab, (Pembro, Anti-PD-1) Monoclonal Antibody, in Men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (MCRPC). » *Journal of Clinical Oncology* 38 (6\_suppl): 140-140. [https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.6\\_suppl.140](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.6_suppl.140).

Aggarwal, Rahul Raj, Tian Zhang, Eric J. Small, Andrew J. Armstrong. (2014). « Neuroendocrine Prostate Cancer: Subtypes, Biology, and Clinical Outcomes ». *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 12 (5): 719-26. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2014.0073>.

Akamatsu, Shusuke, Alexander W. Wyatt, Dong Lin, Summer Lysakowski, Fan Zhang, Soojin Kim, Charan Tse, et al. (2015). « The Placental Gene PEG10 Promotes Progression of Neuroendocrine Prostate Cancer ». *Cell Reports* 12 (6): 922-36. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.012>.

Alix-Panabières, Catherine, et Klaus Pantel. (2016). « Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy ». *Cancer Discovery* 6 (5): 479-91. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>.

Antonarakis, Emmanuel. S., Andrew J. Armstrong, Scott M. Dehm, Jacob Luo. (2016). « Androgen Receptor Variant-Driven Prostate Cancer: Clinical Implications and Therapeutic Targeting ». *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 19 (3): 231-41. <https://doi.org/10.1038/pcan.2016.17>.

Antonarakis, Emmanuel. S., Changxue Lu, Hao Wang, Brandon Luber, Mary Nakazawa, Jeffrey C. Roeser, Yan Chen, et al. (2014). « AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 371 (11): 1028-38. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315815>.

Aparicio, Ana M., Andrea L. Harzstark, Paul G. Corn, Sijin Wen, John C. Araujo, Shi-Ming Tu, Lance C. Pagliaro, et al. (2013). « Platinum-Based Chemotherapy for Variant Castrate-

Resistant Prostate Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (13): 3621-30. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3791>.

Armenia, Joshua, Stephanie A. M. Wankowicz, David Liu, Jianjiong Gao, Ritika Kundra, Ed Reznik, Walid K. Chatila, et al. (2018). « The Long Tail of Oncogenic Drivers in Prostate Cancer ». *Nature Genetics* 50 (5): 645-51. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0078-z>.

Armstrong, Andrew J., Russell Z. Szmulewitz, Daniel P. Petrylak, Jeffrey Holzbeierlein, Arnaud Villers, Arun Azad, Antonio Alcaraz, et al. (2019). « ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 37 (32): 2974-86. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00799>.

Asangani, Irfan A., Vijaya L. Dommeti, Xiaoju Wang, Rohit Malik, Marcin Cieslik, Rendong Yang, June Escara-Wilke, et al. (2014). « Therapeutic Targeting of BET Bromodomain Proteins in Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Nature* 510 (7504): 278-82. <https://doi.org/10.1038/nature13229>.

Attard, Gerhardt, Chris Parker, Ros A. Eeles, Fritz Schröder, Scott A. Tomlins, Ian Tannock, Charles G. Drake, et al. (2015). « Prostate Cancer ». *Lancet (London, England)* 387 (10013): 70-82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61947-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61947-4).

Attwell, Sarah, Ravi Jahagirdar, Karen Norek, Cyrus Calosing, Laura Tsujikawa, Olesya A. Kharenko, Reena G. Patel, et al. (2016). « Abstract LB-207: Preclinical characterization of ZEN-3694, a novel BET bromodomain inhibitor entering phase I studies for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) ». In *Experimental and Molecular Therapeutics, LB-207-LB-207*. American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2016-LB-207>.

Baca, Sylvan C., Davide Prandi, Michael S. Lawrence, Juan Miguel Mosquera, Alessandro Romanel, Yotam Drier, Kyung Park, et al. 2013. « Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes ». *Cell* 153 (3): 666-77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.021>.

Barbieri, Christopher E., Sylvan C. Baca, Michael S. Lawrence, Francesca Demichelis, Mirjam Blattner, Jean-Philippe Theurillat, Thomas A. White, et al. (2012). « Exome Sequencing Identifies Recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 Mutations in Prostate Cancer ». *Nature Genetics* 44 (6): 685-89. <https://doi.org/10.1038/ng.2279>.

Beer, Tomasz M., Andrew J. Armstrong, Dana E. Rathkopf, Yohann Loriot, Cora N. Sternberg, Celestia S. Higano, Peter Iversen, et al. (2014). « Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy ». *The New England Journal of Medicine* 371 (5): 424-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1405095>.

Beer, Tomasz M., Andrew J. Armstrong, Dana Rathkopf, Yohann Loriot, Cora N. Sternberg, Celestia S. Higano, Peter Iversen, et al. (2017). « Enzalutamide in Men with Chemotherapy-Naïve Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Extended Analysis of the Phase 3 PREVAIL Study ». *European Urology* 71 (2): 151-54. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.07.032>.

Beer, Tomasz M., Eugene D. Kwon, Charles G. Drake, Karim Fizazi, Christopher Logothetis, Gwenaëlle Gravis, Vinod Ganju, et al. (2017). « Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Ipilimumab Versus Placebo in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Patients With Metastatic Chemotherapy-Naive Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (1): 40-47. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.1584>.

Beltran, Himisha, Kenneth Eng, Juan Miguel Mosquera, Alexandros Sigaras, Alessandro Romanel, Hanna Rennert, Myriam Kossai, et al. (2015). « Whole-Exome Sequencing of Metastatic Cancer and Biomarkers of Treatment Response ». *JAMA Oncology* 1 (4): 466-74. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.1313>.

Beltran, Himisha, Clara Oromendia, Daniel C. Danila, Bruce Montgomery, Christopher Hoimes, Russell Z. Szmulewitz, Ulka Vaishampayan, et al. (2019). « A Phase II Trial of the Aurora Kinase A Inhibitor Alisertib for Patients with Castration-Resistant and Neuroendocrine Prostate Cancer: Efficacy and Biomarkers ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25 (1): 43-51. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1912>.

Beltran, Himisha, Davide Prandi, Juan Miguel Mosquera, Matteo Benelli, Loredana Puca, Joanna Cyrta, Clarisse Marotz, et al. (2016). « Divergent Clonal Evolution of Castration-Resistant Neuroendocrine Prostate Cancer ». *Nature Medicine* 22 (3): 298-305. <https://doi.org/10.1038/nm.4045>.

Beltran, Himisha, David S. Rickman, Kyung Park, Sung Suk Chae, Andrea Sboner, Theresa Y. MacDonald, Yuwei Wang, et al. (2011). « Molecular Characterization of Neuroendocrine Prostate Cancer and Identification of New Drug Targets ». *Cancer Discovery* 1 (6): 487-95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0130>.

Beltran, Himisha, Scott T. Tagawa, Kyung Park, Theresa MacDonald, Matthew I. Milowsky, Juan Miguel Mosquera, Mark A. Rubin, et David M. Nanus. (2012). « Challenges in Recognizing Treatment-Related Neuroendocrine Prostate Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (36): e386-389. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.5166>.

Berger, Michael F., Michael S. Lawrence, Francesca Demichelis, Yotam Drier, Kristian Cibulskis, Andrey Y. Sivachenko, Andrea Sboner, et al. (2011). « The Genomic Complexity of Primary Human Prostate Cancer ». *Nature* 470 (7333): 214-20. <https://doi.org/10.1038/nature09744>.

Bettegowda, Chetan, Mark Sausen, Rebecca J. Leary, Isaac Kinde, Yuxuan Wang, Nishant Agrawal, Bjarne R. Bartlett, et al. (2014). « Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies ». *Science Translational Medicine* 6 (224): 224ra24. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>.

Biankin, Andrew V., Nicola Waddell, Karin S. Kassahn, Marie-Claude Gingras, Lakshmi B. Muthuswamy, Amber L. Johns, David K. Miller, et al. (2012). « Pancreatic Cancer Genomes Reveal Aberrations in Axon Guidance Pathway Genes ». *Nature* 491 (7424): 399-405. <https://doi.org/10.1038/nature11547>.

Binch, Abbie L. A., Ashley A. Cole, Lee M. Breakwell, Anthony L. R. Michael, Neil Chiverton, Laura B. Creemers, Alison K. Cross, et al. (2015). « Class 3 Semaphorins Expression and Association with Innervation and Angiogenesis within the Degenerate Human Intervertebral Disc ». *Oncotarget* 6 (21): 18338-54. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4274>.

Bishop, Jennifer L., Daksh Thaper, Sepideh Vahid, Alastair Davies, Kirsi Ketola, Hidetoshi Kuruma, Randy Jama, et al. (2017). « The Master Neural Transcription Factor BRN2 Is an Androgen Receptor-Suppressed Driver of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer ». *Cancer Discovery* 7 (1): 54-71. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1263>.

Blanc, Véronique, Joseph Nariculam, Phillipa Munson, Alex Freeman, Helmut Klocker, John R. Masters, Magali Williamson. (2011). « A Role for Class 3 Semaphorins in Prostate Cancer ». *The Prostate* 71 (6): 649-58. <https://doi.org/10.1002/pros.21281>.

Bluemn, Eric G., Ilsa M. Coleman, Jared M. Lucas, Roger T. Coleman, Susana Hernandez-Lopez, Robin Tharakan, Daniella Bianchi-Frias, et al. (2017). « Androgen Receptor Pathway-Independent Prostate Cancer Is Sustained through FGF Signaling ». *Cancer Cell* 32 (4): 474-489.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.003>.

Boevé, Liselotte M.S., Maarten C.C.M. Hulshof, André N. Vis, Aeilko H. Zwinderman, Jos W.R. Twisk, Wim P.J. Witjes, Karl P.J. Delaere, et al. (2019). « Effect on Survival of Androgen Deprivation Therapy Alone Compared to Androgen Deprivation Therapy Combined with Concurrent Radiation Therapy to the Prostate in Patients with Primary Bone Metastatic Prostate Cancer in a Prospective Randomised Clinical Trial: Data from the HORRAD Trial ». *European Urology* 75 (3): 410-18. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.09.008>.

Bonkhoff, H., U. Stein, C. Welter, et K. Remberger. (1995). « Differential Expression of the PS2 Protein in the Human Prostate and Prostate Cancer: Association with Premalignant Changes and Neuroendocrine Differentiation ». *Human Pathology* 26 (8): 824-28. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90002-0).

Bono, Johann S. de, Joaquin Mateo, Karim Fizazi, Fred Saad, Neal Shore, Shahneen Sandhu, Kim N. Chi, et al. (2020). « Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 382 (22): 2091-2102. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1911440>.

Bono, Johann S. de, Christopher J. Logothetis, Arturo Molina, Karim Fizazi, Scott North, Luis Chu, Kim N. Chi, et al. (2011). « Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 364 (21): 1995-2005. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1014618>.

Bono, Johann S. de, Stephane Oudard, Mustafa Ozguroglu, Steinbjørn Hansen, Jean-Pascal Machiels, Ivo Kocak, Gwenaëlle Gravis, et al. (2010). « Prednisone plus Cabazitaxel or Mitoxantrone for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Progressing after Docetaxel Treatment: A Randomised Open-Label Trial ». *Lancet (London, England)* 376 (9747): 1147-54. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61389-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61389-X).

Bono Johann S. de et al., (2020) *Annals of Oncology* 31 (suppl\_4): S1142-S1215. [10.1016/annonc/annonc325](https://doi.org/10.1016/annonc/annonc325)



Börno, Stefan T., Axel Fischer, Martin Kerick, Maria Fälth, Mark Laible, Jan C. Brase, Ruprecht Kuner, et al. (2012). « Genome-Wide DNA Methylation Events in TMPRSS2-ERG Fusion-Negative Prostate Cancers Implicate an EZH2-Dependent Mechanism with MiR-26a Hypermethylation ». *Cancer Discovery* 2 (11): 1024-35. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0041>.

Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, Ahmedin Jemal. (2018). « Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

Bryant, Helen E, Niklas Schultz, Huw D. Thomas, Kayan M. Parker, Dan Flower, Elena Lopez, Suzanne Kyle, Mark Meuth, Nicola J. Curtin, et al. (2005). « Specific Killing of BRCA2-Deficient Tumours with Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase ». *Nature* 434 (7035): 913-17. <https://doi.org/10.1038/nature03443>.

Burchardt, Tatjana, Martin Burchardt, Min Wei Chen, Y. Cao, Alexandre de la Taille, Ahmad Shabsigh, Omar Hayek, Thambi Dorai, et al. (1999). « Transdifferentiation of Prostate Cancer Cells to a Neuroendocrine Cell Phenotype in Vitro and in Vivo ». *The Journal of Urology* 162 (5): 1800-1805.

Cai, Zhonglin, Weijie Chen, Jianzhong Zhang, et Hongjun Li. (2018). « Androgen Receptor: What We Know and What We Expect in Castration-Resistant Prostate Cancer ». *International Urology and Nephrology* 50 (10): 1753-64. <https://doi.org/10.1007/s11255-018-1964-0>.

Campedel, Luca, Myriam Kossaï, Paul Blanc-Durand, Morgan Rouprêt, Thomas Seisen, Eva Compérat, Jean-Philippe Spano, et al. (2017). « Le cancer de la prostate neuro-endocrine : histoire naturelle, caractéristiques moléculaires, prise en charge et perspectives ». *Bulletin du Cancer* 104 (9): 789-99. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.05.007>.

Cantuti-Castelvetri, Ludovico, Ravi Ojha, Liliana D. Pedro, Minou Djannatian, Jonas Franz, Suvi Kuivanen, Franziska van der Meer, et al. (2020). « Neuropilin-1 Facilitates SARS-CoV-2 Cell Entry and Infectivity ». *Science* 370 (6518): 856-60. <https://doi.org/10.1126/science.abd2985>.

Carioli, Greta., Paola Bertuccio, Paolo Boffetta, Fabio Levi, Carlo La Vecchia, Eva Negri, Matteo Malvezzi. (2020). « European Cancer Mortality Predictions for the Year 2020 with a Focus on Prostate Cancer ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 31 (5): 650-58. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.02.009>.

Carter, Brett S., Terri H. Beaty, Gary D. Steinberg, Barton Childs, et Patrick C. Walsh. (1992). « Mendelian Inheritance of Familial Prostate Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8): 3367-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3367>.

Carver, Brett S. (2016). « Defining and Targeting the Oncogenic Drivers of Neuroendocrine Prostate Cancer ». *Cancer Cell* 29 (4): 431-32. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.023>.

Cassinello, Javier, José Ángel Arranz, Josep Maria Piulats, Alfredo Sánchez, Begoña Pérez-Valderrama, Begoña Mellado, Miguel Ángel Climent, et al. (2018). « SEOM Clinical Guidelines for the Treatment of Metastatic Prostate Cancer (2017) ». *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 20 (1): 57-68. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1783-2>.

Cerami, Ethan, Jianjiong Gao, Ugur Dogrusoz, Benjamin E. Gross, Selcuk Onur Sumer, Bülent Arman Aksoy, Anders Jacobsen, et al. (2012). « The CBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data: Figure 1. » *Cancer Discovery* 2 (5): 401-4. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>.

Chandrasekar, Thenappan, Joy C. Yang, Allen C. Gao, Christopher P. Evans. (2015). « Mechanisms of Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC) ». *Translational Andrology and Urology* 4 (3): 365-80. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02>.

Chaudhary, Belal, Yazan S. Khaled, Basil J. Ammori, Eyad Elkord. (2014). « Neuropilin 1: Function and Therapeutic Potential in Cancer ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 63 (2): 81-99. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1500-0>.

Chi, Kim N., Matti Annala, Katherine Sunderland, Daniel Khalaf, Daygen Finch, Conrad D. Oja, Joanna Vergidis, et al. (2017). « A Randomized Phase II Cross-over Study of Abiraterone + Prednisone (ABI) vs Enzalutamide (ENZ) for Patients (Pts) with Metastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer (MCRPC). » *Journal of Clinical Oncology* 35 (15\_suppl): 5002-5002. [https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15\\_suppl.5002](https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.5002).

Chng, Kern Rei, Cheng Wei Chang, Si Kee Tan, Chong Yang, Shu Zhen Hong, Noel Yan Wei Sng, Edwin Cheung. (2012). « A Transcriptional Repressor Co-Regulatory Network Governing Androgen Response in Prostate Cancers ». *The EMBO Journal* 31 (12): 2810-23. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.112>.

Choi, Youn Jin, Nam Jin Yoo, Sug Hyung Lee. (2014). « Down-Regulation of ROBO2 Expression in Prostate Cancers ». *Pathology Oncology Research: POR* 20 (3): 517-19. <https://doi.org/10.1007/s12253-013-9722-1>.

Chuckran, Christopher A, Chang Liu, Tullia C Bruno, Creg J Workman, Dario AA Vignali. (2020). « Neuropilin-1: A Checkpoint Target with Unique Implications for Cancer Immunology and Immunotherapy ». *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 8 (2): e000967. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000967>.

Clark, Jeremy., Gerhardt. Attard, Sameer Jhavar, Penny Flohr, Alison Reid, Johann S De-Bono, Ros Eeles, et al. (2008). « Complex Patterns of ETS Gene Alteration Arise during Cancer Development in the Human Prostate ». *Oncogene* 27 (14): 1993-2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210843>.

Clermont, Pier-Luc, Dong Lin, Francesco Crea, Rebecca Wu, Hui Xue, Yuwei Wang, Kelsie L. Thu, et al. (2015). « Polycomb-Mediated Silencing in Neuroendocrine Prostate Cancer ». *Clinical Epigenetics* 7: 40. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0074-4>.

Conteduca, Vincenza, Anuradha Jayaram, Nuria Romero-Laorden, Daniel Wetterskog,

Samanta Salvi, Giorgia Gurioli, Emanuela Scarpi, et al. (2019). « Plasma Androgen Receptor and Docetaxel for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *European Urology* 75 (3): 368-73. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.09.049>.

Corn, Paul G., Elisabeth I. Heath, Amado Zurita, Naveen Ramesh, Lianchun Xiao, Emi Sei, Elsa Li-Ning-Tapia, et al. (2019). « Cabazitaxel plus Carboplatin for the Treatment of Men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancers: A Randomised, Open-Label, Phase 1-2 Trial ». *The Lancet. Oncology* 20 (10): 1432-43. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30408-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30408-5).

Cornford, Philip, Joaquim Bellmunt, Michel Bolla, Erik Briers, Maria De Santis, Tobias Gross, Ann M. Henry, et al. (2016). « EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer ». *European Urology*, août. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.002>.

Culig, Zoran, Alfred Hobisch, Marcus V. Cronauer, Andrew. C. Cato, Anton Hittmair, Christian Radmayr, Johannes Eberle, Georg Bartsch, et al. (1993). « Mutant Androgen Receptor Detected in an Advanced-Stage Prostatic Carcinoma Is Activated by Adrenal Androgens and Progesterone ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 7 (12): 1541-50. <https://doi.org/10.1210/mend.7.12.8145761>.

Culine, Stéphane, Mounira El Demery, Pierre-Jean Lamy, François Iborra, Christophe Avancès, et Frédéric Pinguet. (2007). « Docetaxel and Cisplatin in Patients with Metastatic Androgen Independent Prostate Cancer and Circulating Neuroendocrine Markers ». *The Journal of Urology* 178 (3 Pt 1): 844-48; discussion 848. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.05.044>.

D'Amico, Anthony. V (1998). « Biochemical Outcome after Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer ». *JAMA* 280 (11): 969-74. <https://doi.org/10.1001/jama.280.11.969>.

Daly, James L., Boris Simonetti, Katja Klein, Kai-En Chen, Maia Kavanagh Williamson, Carlos Antón-Plágaro, Deborah K. Shoemark, et al. (2020). « Neuropilin-1 Is a Host Factor for SARS-CoV-2 Infection ». *Science* 370 (6518): 861-65. <https://doi.org/10.1126/science.abd3072>.

Damber, Jan-Erik, et Gunnar Aus. (2008). « Prostate Cancer ». *Lancet (London, England)* 371 (9625): 1710-21. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60729-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60729-1).

Dardenne, Etienne, Himisha Beltran, Matteo Benelli, Kaitlyn Gayvert, Adeline Berger, Loredana Puca, Joanna Cyrta, et al. (2016). « N-Myc Induces an EZH2-Mediated Transcriptional Program Driving Neuroendocrine Prostate Cancer ». *Cancer Cell* 30 (4): 563-77. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.005>.

Darnel, Andrew D., Emy Behmoaram, Robin T. Vollmer, Jacques Corcos, Krikor Bijian, Kanishka Sircar, Jie Su, Jinsong Jiao, Moulay A. Alaoui-Jamali, et al. (2009). « Fascin Regulates Prostate Cancer Cell Invasion and Is Associated with Metastasis and Biochemical Failure in Prostate Cancer ». *Clinical Cancer Research* 15 (4): 1376-83. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1789>.

Davies, Alastair H., Himisha Beltran, Amina Zoubeidi. (2018). « Cellular Plasticity and the Neuroendocrine Phenotype in Prostate Cancer ». *Nature Reviews. Urology* 15 (5): 271-86. <https://doi.org/10.1038/nrrol.2018.22>.

Davis, Ian D., Andrew J. Martin, Martin R. Stockler, Stephen Begbie, Kim N. Chi, Simon Chowdhury, Xanthi Coskinas, et al. (2019). « Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 381 (2): 121-31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903835>.

De Arcangelis, Adèle, Elisabeth Georges-Labouesse, Josephine C. Adams. (2004). « Expression of Fascin-1, the Gene Encoding the Actin-Bundling Protein Fascin-1, during Mouse Embryogenesis ». *Gene Expression Patterns: GEP* 4 (6): 637-43. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2004.04.012>.

Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Colonna M, Dantony E, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse. Saint-Maurice : Santé publique France, 2019. 20 p. Disponible à partir des URL : <http://www.santepubliquefrance.fr/> ; <https://geodes.santepubliquefrance.fr/#c=home> ; <http://lesdonnees.e-cancer.fr/> ; <https://www.e-cancer.fr/>

Dehm, Scott M., et Donald J. Tindall. (2011). « Alternatively Spliced Androgen Receptor Variants ». *Endocrine-Related Cancer* 18 (5): R183-196. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0141>.

Delliaux, Carine, Tian V. Tian, Mathilde Bouchet, Anais Fradet, Nathalie Vanpouille, Anne Flourens, Rachel Deplus, et al. (2018). « Tmprss2:ERG Gene Fusion Expression Regulates Bone Markers and Enhances the Osteoblastic Phenotype of Prostate Cancer Bone Metastases ». *Cancer Letters* 438: 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.08.027>.

Dellis, Athanasios, et Athanasios Papatsoris. (2017). « Therapeutic Outcomes of the LHRH Antagonists ». *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research* 17 (5): 481-88. <https://doi.org/10.1080/14737167.2017.1375855>.

Dellis, Athanasios, Flora Zagouri, Michalis Lontos, Dionysios Mitropoulos, Aristotelis Bamias, Athanasios G. Papatsoris, et Hellenic Genito-Urinary Cancer Group (HCUCG). (2019). « Management of Advanced Prostate Cancer: A Systematic Review of Existing Guidelines and Recommendations ». *Cancer Treatment Reviews* 73 : 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.11.005>.

Delloye-Bourgeois, Céline, Lorette Bertin, Karine Thoinet, Loraine Jarrosson, Karine Kindbeiter, Thomas Buffet, Servane Tauszig-Delamasure, et al. (2017). « Microenvironment-Driven Shift of Cohesion/Detachment Balance within Tumors Induces a Switch toward Metastasis in Neuroblastoma ». *Cancer Cell* 32 (4): 427-443.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.006>.

Delloye-Bourgeois, Céline, et Valérie Castellani. (2019). « Hijacking of Embryonic Programs by Neural Crest-Derived Neuroblastoma: From Physiological Migration to Metastatic Dissemination ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12: 52. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00052>.

Deplus, Rachel, Carine Delliaux, Nathalie Marchand, Anne Flourens, Nathalie Vanpouille, Xavier Leroy, Yvan de Launoit, et al. (2017). « Tmprss2-ERG Fusion Promotes Prostate Cancer Metastases in Bone ». *Oncotarget* 8 (7): 11827-40. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14399>.

DiNatale, Anthony, et Alessandro Fatatis. (2019). « The Bone Microenvironment in Prostate Cancer Metastasis ». In *Prostate Cancer*, édité par Scott M. Dehm et Donald J. Tindall, 1210:171-84. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-32656-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-32656-2_9).

Ding, Qingjie, Zhuming Zhang, Jin-Jun Liu, Nan Jiang, Jing Zhang, Tina M. Ross, Xin-Jie Chu, et al. (2013). « Discovery of RG7388, a Potent and Selective P53-MDM2 Inhibitor in Clinical Development ». *Journal of Medicinal Chemistry* 56 (14): 5979-83. <https://doi.org/10.1021/jm400487c>.

Ding, Yi, Dandan He, Diego Florentin, Anna Frolov, Sue Hilsenbeck, Michael Ittmann, Dov Kadmon, Brian Miles, David Rowley, et al. (2013). « Semaphorin 4F as a Critical Regulator of Neuroepithelial Interactions and a Biomarker of Aggressive Prostate Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (22): 6101-11. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3669>.

Don-Doncow, Nicholas, Zilma Escobar, Martin Johansson, Sven Kjellström, Victor Garcia, Eduardo Munoz, Olov Sterner, Anders Bjartell, et al. (2014). « Galiellalactone Is a Direct Inhibitor of the Transcription Factor STAT3 in Prostate Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (23): 15969-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.564252>.

Edlind, Merritt P., et Andrew C. Hsieh. (2014). « PI3K-AKT-MTOR Signaling in Prostate Cancer Progression and Androgen Deprivation Therapy Resistance ». *Asian Journal of Andrology* 16 (3): 378-86. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122876>.

Eisenhauer, E. Anton, Patrick Therasse, Jan Bogaerts, Lawrence H. Schwartz, Dan Sargent, Robert Ford, Janet Dancey, et al. (2009). « New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (Version 1.1) ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 45 (2): 228-47. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>.

Epstein, Jonathan I., Mahul B. Amin, Himisha Beltran, Tamara L. Lotan, Juan-Miguel Mosquera, Victor E. Reuter, Brian D. Robinson, Patricia Troncoso, et Mark A. Rubin. (2014). « Proposed Morphologic Classification of Prostate Cancer with Neuroendocrine Differentiation ». *The American Journal of Surgical Pathology* 38 (6): 756-67. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000208>.

Evans, Andrew J., Peter A. Humphrey, Jay Belani, Theodorus H. van der Kwast, et John R. Srigley. (2006). « Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of Prostate: A Clinicopathologic Summary of 7 Cases of a Rare Manifestation of Advanced Prostate Cancer ». *The American Journal of Surgical Pathology* 30 (6): 684-93. <https://doi.org/10.1097/00000478-200606000-00003>.

Eymard, Jean-Christophe, Stéphane Oudard, Gwenaëlle Gravis, Jean-Marc Ferrero, Christine Theodore, Florence Joly, Frank Priou, et al. (2010). « Docetaxel Reintroduction in Patients with Metastatic Castration-Resistant Docetaxel-Sensitive Prostate Cancer: A Retrospective

Multicentre Study ». *BJU International* 106 (7): 974-78. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09296.x>.

Farmer, Hannah, Nuala McCabe, Christopher J. Lord, Andrew N. J. Tutt, Damian A. Johnson, Tobias B. Richardson, Manuela Santarosa, et al. (2005). « Targeting the DNA Repair Defect in BRCA Mutant Cells as a Therapeutic Strategy ». *Nature* 434 (7035): 917-21. <https://doi.org/10.1038/nature03445>.

Fine, Samson W., Anuradha Gopalan, Margaret A. Leversha, Hikmat A. Al-Ahmadie, Satish K. Tickoo, Qin Zhou, Jaya M. Satagopan, Peter T. Scardino, William L. Gerald, et Victor E. Reuter. (2010). « TMPRSS2-ERG Gene Fusion Is Associated with Low Gleason Scores and Not with High-Grade Morphological Features ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23 (10): 1325-33. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.120>.

Fizazi, Karim et al., Collège des enseignants de cancérologie, chapitre Cancer de la prostate, éditions MEDLINE, 2017.

Fizazi, Karim, Michael Carducci, Matthew Smith, Ronaldo Damião, Janet Brown, Lawrence Karsh, Piotr Milecki, 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 (London, England)* 377 (9768): 813-22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62344-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62344-6).

Fizazi, Karim, Neal Shore, Teuvo L. Tammela, Albertas Ulys, Egils Vjaters, Sergey Polyakov, Mindaugas Jievaltas, et al. (2019). « Darolutamide in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 380 (13): 1235-46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1815671>.

Fizazi, Karim, NamPhuong Tran, Luis Fein, Nobuaki Matsubara, Alfredo Rodriguez-Antolin, Boris Y. Alekseev, Mustafa Özgüroğlu, et al. (2017). « Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 377 (4): 352-60. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704174>.

Fizazi, Karim, NamPhuong Tran, Luis Fein, Nobuaki Matsubara, Alfredo Rodriguez-Antolin, Boris Y. Alekseev, Mustafa Özgüroğlu, et al. (2019). « Abiraterone Acetate plus Prednisone in Patients with Newly Diagnosed High-Risk Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer (LATITUDE): Final Overall Survival Analysis of a Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial ». *The Lancet. Oncology* 20 (5): 686-700. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30082-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30082-8).

Flajollet, Sébastien, Tian V. Tian, Anne Flourens, Nathalie Tomavo, Arnaud Villers, Edith Bonnelye, Sébastien Aubert, Xavier Leroy, et al. (2011). « Abnormal Expression of the ERG Transcription Factor in Prostate Cancer Cells Activates Osteopontin ». *Molecular Cancer Research: MCR* 9 (7): 914-24. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0537>.

Fléchon, Aude, Damien Pouessel, Céline Ferlay, David Perol, Philippe Beuzebec, Gwenaëlle Gravis, Florence Joly, et al. (2011). « Phase II Study of Carboplatin and Etoposide in Patients with Anaplastic Progressive Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (MCRPC) with or without Neuroendocrine Differentiation: Results of the French Genito-Urinary Tumor Group

(GETUG) P01 Trial ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 22 (11): 2476-81. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr004>.

Fong, Ka-Wing, Jonathan C. Zhao, Jung Kim, Shangze Li, Yeqing A. Yang, Bing Song, Laure Rittie, et al. (2017). « Polycomb-Mediated Disruption of an Androgen Receptor Feedback Loop Drives Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Cancer Research* 77 (2): 412-22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1949>.

Fradet, Anaïs, Hélène Sorel, Baptiste Depalle, Claire Marie Serre, Delphine Farlay, Andrei Turtoi, Akeila Bellahcene, et al. (2013). « A New Murine Model of Osteoblastic/Osteolytic Lesions from Human Androgen-Resistant Prostate Cancer ». *PloS One* 8 (9): e75092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075092>.

Fraser, Michael, Veronica Y. Sabelnykova, Takafumi N. Yamaguchi, Lawrence E. Heisler, Julie Livingstone, Vincent Huang, Yu-Jia Shiah, et al. (2017). « Genomic Hallmarks of Localized, Non-Indolent Prostate Cancer ». *Nature* 541 (7637): 359-64. <https://doi.org/10.1038/nature20788>.

Fuse, Miki, Nijiro Nohata, Satoko Kojima, Shinichi Sakamoto, Takeshi Chiyomaru, Kazumori Kawakami, Hideki Enokida, et al. (2011). « Restoration of MiR-145 Expression Suppresses Cell Proliferation, Migration and Invasion in Prostate Cancer by Targeting FSCN1 ». *International Journal of Oncology* 38 (4): 1093-1101. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.919>.

Gao, Jianjiong, Bülent Arman Aksoy, Ugur Dogrusoz, Gideon Dresdner, Benjamin Gross, S. Onur Sumer, Yichao Sun, et al. (2013). « Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the CBioPortal ». *Science Signaling* 6 (269): p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>.

Gasi Tandefelt, Delila, Joost Boormans, Karin Hermans, et Jan Trapman. (2014). « ETS Fusion Genes in Prostate Cancer ». *Endocrine-Related Cancer* 21 (3): R143-152. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0390>.

Gillessen, Silke, Aurelius Omlin, Gerhardt Attard, Johann S. de Bono, Eleni Efstathiou, Karim Fizazi, Susan Halabi, et al. (2015). « Management of Patients with Advanced Prostate Cancer: Recommendations of the St Gallen Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) 2015 ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 26 (8): 1589-1604. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv257>.

Gillessen, Silke, Aurelius Omlin, Gerhardt Attard, Johann S. de Bono, Eleni Efstathiou, Karim Fizazi, Susan Halabi, et al. (2019). « Management of Patients with Advanced Prostate Cancer: Recommendations of the St Gallen Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (12): e3. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw180>.

Gillessen, Silke, Gerhardt Attard, Tomasz M. Beer, Himisha Beltran, Alberto Bossi, Rob Bristow, Brett Carver, et al. (2018). « Management of Patients with Advanced Prostate Cancer: The Report of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference APCCC 2017 ». *European Urology* 73 (2): 178-211. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.06.002>.

Goel, Hira Lal, Cheng Chang, Bryan Pursell, Irwin Leav, Stephen Lyle, Hualin Simon Xi,

Chung-Cheng Hsieh, et al. (2012). « VEGF/Neuropilin-2 Regulation of Bmi-1 and Consequent Repression of IGF-IR Define a Novel Mechanism of Aggressive Prostate Cancer ». *Cancer Discovery* 2 (10): 906-21. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0085>.

Göhrig, Andreas, Katharina M. Detjen, Georg Hilfenhaus, Jan L. Körner, Martina Welzel, Ruza Arsenic, Rosa Schmuck, et al. (2014). « Axon Guidance Factor SLIT2 Inhibits Neural Invasion and Metastasis in Pancreatic Cancer ». *Cancer Research* 74 (5): 1529-40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1012>.

Golabek, Tomasz, Jonathan Belsey, Tomasz Drewa, Anna Kołodziej, Iwona Skoneczna, Piotr Milecki, Jakub Dobruch, Marcin Słojewski, et al. (2016). « Evidence-Based Recommendations on Androgen Deprivation Therapy for Localized and Advanced Prostate Cancer ». *Central European Journal of Urology* 69 (2): 131-38. <https://doi.org/10.5173/cej.2016.812>.

Gottlieb, Bruce, Lenore K. Beitel, Abbesha Nadarajah, Miltiadis Paliouras, Mark Trifiro. (2012). « The Androgen Receptor Gene Mutations Database: 2012 Update ». *Human Mutation* 33 (5): 887-94. <https://doi.org/10.1002/humu.22046>.

Grasso, Catherine S., Yi-Mi Wu, Dan R. Robinson, Xuhong Cao, Saravana M. Dhanasekaran, Amjad P. Khan, Michael J. Quist, et al. (2012). « The Mutational Landscape of Lethal Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Nature* 487 (7406): 239-43. <https://doi.org/10.1038/nature11125>.

Gravis, Gwenaëlle, Jean-Marie Boher, Yu-Hui Chen, Glenn Liu, Karim Fizazi, Michael A. Carducci, Stéphane Oudard, et al. (2018). « Burden of Metastatic Castrate Naive Prostate Cancer Patients, to Identify Men More Likely to Benefit from Early Docetaxel: Further Analyses of CHARTED and GETUG-AFU15 Studies ». *European Urology* 73 (6): 847-55. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.02.001>.

Gravis, Gwenaëlle, Karim Fizazi, Florence Joly, Stéphane Oudard, Franck Priou, Benjamin Esterni, Igor Latorzeff, et al. (2013). « Androgen-Deprivation Therapy Alone or with Docetaxel in Non-Castrate Metastatic Prostate Cancer (GETUG-AFU 15): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial ». *The Lancet Oncology* 14 (2): 149-58. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70560-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70560-0).

Gritsina, Galina, Wei-Qiang Gao, Jindan Yu. (2019). « Transcriptional Repression by Androgen Receptor: Roles in Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Asian Journal of Andrology* 21 (3): 215. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_19\\_19](https://doi.org/10.4103/aja.aja_19_19).

Guo, Charles C., Jane Y. Dancer, Yan Wang, Ana Aparicio, Nora M. Navone, Patricia Troncoso, Bogdan A. Czerniak. (2011). « TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Small Cell Carcinoma of the Prostate ». *Human Pathology* 42 (1): 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.05.026>.

Guo, Zhiyong, Xi Yang, Feng Sun, Richeng Jiang, Douglas E. Linn, Hege Chen, Hegang Chen, et al. (2009). « A Novel Androgen Receptor Splice Variant Is Up-Regulated during Prostate Cancer Progression and Promotes Androgen Depletion-Resistant Growth ». *Cancer Research* 69 (6): 2305-13. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3795>.

Hänze, Jörg, Peter Rexin, Peter Jakubowski, Henner Schreiber, Hendrik Heers, Susanne



Lingelbach, Ralf Kinscherf, et al. (2018). « Prostate Cancer Tissues with Positive TMPRSS2-ERG-Gene-Fusion Status May Display Enhanced Nerve Density ». *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, S1078143918302928. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.07.019>.

Harris, Sandra L., et Arnold J. Levine. (2005). « The P53 Pathway: Positive and Negative Feedback Loops ». *Oncogene* 24 (17): 2899-2908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208615>.

Hashimoto, Yosuke, Marek Skacel, et Josephine C. Adams. (2005). « Roles of Fascin in Human Carcinoma Motility and Signaling: Prospects for a Novel Biomarker? » *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (9): 1787-1804. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.05.004>.

Hayashi, Mikihiro, Tomoki Nakashima, Masahiko Taniguchi, Tatsuhiko Kodama, Atsushi Kumanogoh, Hiroshi Takayanagi. (2012). « Osteoprotection by Semaphorin 3A ». *Nature* 485 (7396): 69-74. <https://doi.org/10.1038/nature11000>.

Heemers, Hannelore V., et Donald J. Tindall. (2007). « Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex ». *Endocrine Reviews* 28 (7): 778-808. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0019>.

Hellsten, Rebecka, Martin Johansson, Anna Dahlman, Olov Sterner, Anders Bjartell. (2011). « Galiellalactone Inhibits Stem Cell-like ALDH-Positive Prostate Cancer Cells ». *PloS One* 6 (7): e22118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022118>.

Helpap, Burkhard., Jens Köllermann, et Ulrich Oehler. (1999). « Neuroendocrine Differentiation in Prostatic Carcinomas: Histogenesis, Biology, Clinical Relevance, and Future Therapeutical Perspectives ». *Urologia Internationalis* 62 (3): 133-38. <https://doi.org/10.1159/000030376>.

Hensel, Janine, Antoinette Wetterwald, Ramzi Temanni, Irene Keller, Carsten Riether, Gabri van der Pluijm, Marco G. Cecchini, et al. (2018). « Osteolytic Cancer Cells Induce Vascular/Axon Guidance Processes in the Bone/Bone Marrow Stroma ». *Oncotarget* 9 (48): 28877-96. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25608>.

Herman, Jeffery G., et Gary G. Meadows. (2007). « Increased Class 3 Semaphorin Expression Modulates the Invasive and Adhesive Properties of Prostate Cancer Cells ». *International Journal of Oncology* 30 (5): 1231-38.

Hieronimus, Haley, Nikolaus Schultz, Anuradha Gopalan, Brett S. Carver, Matthew T. Chang, Yonghong Xiao, Adriana Heguy, et al. (2014). « Copy Number Alteration Burden Predicts Prostate Cancer Relapse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (30): 11139-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411446111>.

Hoyle, Alex P., Adnan Ali, Nicholas D. James, Adrian Cook, Christopher C. Parker, Johann S. de Bono, Gerhardt Attard, et al. (2019). « Abiraterone in “High-” and “Low-Risk” Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer ». *European Urology* 76 (6): 719-28. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.006>.

Hu, Rong, Thomas A. Dunn, Shuanzeng Wei, Sumit Isharwal, Robert W. Veltri, Elizabeth

Humphreys, Misop Han, et al. (2009). « Ligand-Independent Androgen Receptor Variants Derived from Splicing of Cryptic Exons Signify Hormone-Refractory Prostate Cancer ». *Cancer Research* 69 (1): 16-22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2764>.

Hu, Chang-Deng, Richard Choo, et Jiaoti Huang. (2015). « Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer: A Mechanism of Radioresistance and Treatment Failure ». *Frontiers in Oncology* 5: 90. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00090>.

Hudes, Gary, Scott T. Tagawa, Young E. Whang, Ming Qi, Xiang Qin, Thomas A. Puchalski, Manjula Reddy, Mark Cornfeld, et al. (2013). « A Phase 1 Study of a Chimeric Monoclonal Antibody against Interleukin-6, Siltuximab, Combined with Docetaxel in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Investigational New Drugs* 31 (3): 669-76. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9857-z>.

Hussain, Maha, Karim Fizazi, Fred Saad, Per Rathenborg, Neal Shore, Ubirajara Ferreira, Petro Ivashchenko, et al. (2018). « Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 378 (26): 2465-74. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800536>.

Hussain, Maha, Joaquin Mateo, Karim Fizazi, Fred Saad, Neal Shore, Shahneen Sandhu, Kim N. Chi, et al. (2020). « Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine*, septembre. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022485>.

Hussain, Maha, Catherine M. Tangen, Donna L. Berry, Celestia S. Higano, E. David Crawford, Glenn Liu, George Wilding, et al. (2013). « Intermittent versus Continuous Androgen Deprivation in Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 368 (14): 1314-25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1212299>.

Ibuki, Naokazu, Mazyar Ghaffari, Mitali Pandey, Irene Iu, Ladan Fazli, Masahide Kashiwagi, Hideaki Tojo, et al. (2013). « TAK-441, a Novel Investigational Smoothed Antagonist, Delays Castration-Resistant Progression in Prostate Cancer by Disrupting Paracrine Hedgehog Signaling ». *International Journal of Cancer* 133 (8): 1955-66. <https://doi.org/10.1002/ijc.28193>.

Ishida, Eiwa, Mitsutoshi Nakamura, Keiji Shimada, Masato Tasaki, Noboru Konishi. (2009). « Immunohistochemical Analysis of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer ». *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 76 (1): 30-38. <https://doi.org/10.1159/000178153>.

James, Nicholas D., Johann S. de Bono, Melissa R. Spears, Noel W. Clarke, Malcolm D. Mason, David P. Dearnaley, Alastair W. S. Ritchie, et al. (2017). « Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy ». *The New England Journal of Medicine* 377 (4): 338-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702900>.

James, Nicholas D., Matthew R. Sydes, Noel W. Clarke, Malcolm D. Mason, David P. Dearnaley, Melissa R. Spears, Alastair W. S. Ritchie, et al. (2016). « Addition of Docetaxel, Zoledronic Acid, or Both to First-Line Long-Term Hormone Therapy in Prostate Cancer (STAMPEDE): Survival Results from an Adaptive, Multiarm, Multistage, Platform Randomised Controlled Trial ». *Lancet (London, England)* 387 (10024): 1163-77.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01037-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01037-5).

Jiang, Zhengdong, Gang Liang, Ying Xiao, Tao Qin, Xin Chen, Erxi Wu, Qingyong Ma, et al. (2019). « Targeting the SLIT/ROBO Pathway in Tumor Progression: Molecular Mechanisms and Therapeutic Perspectives ». *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, Jun 6;11:1758835919855238. doi: 10.1177/1758835919855238. eCollection 2019.

Jefferies, Matthew T., Christopher S. Pope, Howard G. Kynaston, Alan R. Clarke, Richard M. Martin, Josephine C. Adams. (2017). « Analysis of Fascin-1 in Relation to Gleason Risk Classification and Nuclear ETS-Related Gene Status of Human Prostate Carcinomas: An Immunohistochemical Study of Clinically Annotated Tumours From the Wales Cancer Bank ». *Biomarkers in Cancer* 9: 1179299X17710944. <https://doi.org/10.1177/1179299X17710944>.

Joseph, James D., Nhin Lu, Jing Qian, John Sensintaffar, Gang Shao, Dan Brigham, Michael Moon, et al. (2013). « A Clinically Relevant Androgen Receptor Mutation Confers Resistance to Second-Generation Antiandrogens Enzalutamide and ARN-509 ». *Cancer Discovery* 3 (9): 1020-29. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0226>.

Jurcak, Noelle R., Agnieszka A. Rucki, Stephen Muth, Elizabeth Thompson, Rajni Sharma, Ding Ding, Qingfeng Zhu, et al. (2019). « Axon Guidance Molecules Promote Perineural Invasion and Metastasis of Orthotopic Pancreatic Tumors in Mice ». *Gastroenterology*, juin. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.05.065>.

Kamel, Dalia, Christopher Gray, Jagdeep Singh Walia, Vikaash Kumar. (2018). « PARP Inhibitor Drugs in the Treatment of Breast, Ovarian, Prostate and Pancreatic Cancers: An Update of Clinical Trials ». *Current Drug Targets* 19 (1): 21-37. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170711151518>.

Kantoff, Philip W., Celestia S. Higano, Neal D. Shore, E. Roy Berger, Eric J. Small, David F. Penson, Charles H. Redfern, et al. (2010). « Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 363 (5): 411-22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001294>.

Karantanos, Theodoros, Christopher P. Evans, Bertrand Tombal, Timothy C. Thompson, Rodolfo Montironi, William B. Isaacs. (2015). « Understanding the Mechanisms of Androgen Deprivation Resistance in Prostate Cancer at the Molecular Level ». *European Urology* 67 (3): 470-79. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.09.049>.

Kelly, Kathleen, et Steven P. Balk. (2017). « Reprogramming to Resist ». *Science (New York, N.Y.)* 355 (6320): 29-30. <https://doi.org/10.1126/science.aam5355>.

Ketola, Kirsi, Olli Kallioniemi, et Kristiina Iljin. (2012). « Chemical Biology Drug Sensitivity Screen Identifies Sunitinib as Synergistic Agent with Disulfiram in Prostate Cancer Cells ». *PloS One* 7 (12): e51470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051470>.

Khemlina, Galina, Sadakatsu Ikeda, et Razelle Kurzrock. (2015). « Molecular Landscape of Prostate Cancer: Implications for Current Clinical Trials ». *Cancer Treatment Reviews* 41 (9): 761-66. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.07.001>.

Kleb, Brittany, Marcos R. H. Estécio, Jiexin Zhang, Vassiliki Tzelepi, Woonbok Chung,

Jaroslav Jelinek, Nora M. Navone, et al. (2016). « Differentially Methylated Genes and Androgen Receptor Re-Expression in Small Cell Prostate Carcinomas ». *Epigenetics* 11 (3): 184-93. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1146851>.

Knutson, Sarah K., Satoshi Kawano, Yukinori Minoshima, Natalie M. Warholic, Kuan-Chun Huang, Yonghong Xiao, Tadashi Kadowaki, et al. (2014). « Selective Inhibition of EZH2 by EPZ-6438 Leads to Potent Antitumor Activity in EZH2-Mutant Non-Hodgkin Lymphoma ». *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (4): 842-54. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0773>.

Koch, Sina, Laurens A. van Meeteren, Eric Morin, Chiara Testini, Simone Weström, Hanna Björkelund, Sébastien Le Jan, et al. (2014). « NRP1 Presented in Trans to the Endothelium Arrests VEGFR2 Endocytosis, Preventing Angiogenic Signaling and Tumor Initiation ». *Developmental Cell* 28 (6): 633-46. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.02.010>.

Kohli, Manish, Jian Li, Meijun Du, David W Hillman, Scott M. Dehm, Winston Tan, Rachel Carlson, et al. (2018). « Prognostic Association of Plasma Cell-Free DNA-Based Androgen Receptor Amplification and Circulating Tumor Cells in Pre-Chemotherapy Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients ». *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 21 (3): 411-18. <https://doi.org/10.1038/s41391-018-0043-z>.

Ku, Sheng Yu, Spencer Rosario, Yanqing Wang, Ping Mu, Mukund Seshadri, Zachary W. Goodrich, Maxwell M. Goodrich, et al. (2017). « Rb1 and Trp53 Cooperate to Suppress Prostate Cancer Lineage Plasticity, Metastasis, and Antiandrogen Resistance ». *Science (New York, N.Y.)* 355 (6320): 78-83. <https://doi.org/10.1126/science.aah4199>.

Kumar-Sinha, Chandan, Scott A. Tomlins, Arul M. Chinnaiyan. (2008). « Recurrent Gene Fusions in Prostate Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (7): 497-511. <https://doi.org/10.1038/nrc2402>.

Kumar, Akash, Ilsa Coleman, Colm Morrissey, Xiaotun Zhang, Lawrence D. True, Roman Gulati, Ruth Etzioni, et al. (2016). « Substantial Interindividual and Limited Intraindividual Genomic Diversity among Tumors from Men with Metastatic Prostate Cancer ». *Nature Medicine* 22 (4): 369-78. <https://doi.org/10.1038/nm.4053>.

Kureishy, Nina, Vasileia Sapountzi, Soren Prag, N. Anilkumar, Josephine Clare Adams. (2002). « Fascins, and Their Roles in Cell Structure and Function ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 24 (4): 350-61. <https://doi.org/10.1002/bies.10070>.

Kwon, Eugene D, Charles G Drake, Howard I Scher, Karim Fizazi, Alberto Bossi, Alfons J M van den Eertwegh, Michael Krainer, et al. (2014). « Ipilimumab versus Placebo after Radiotherapy in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer That Had Progressed after Docetaxel Chemotherapy (CA184-043): A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial ». *The Lancet Oncology* 15 (7): 700-712. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70189-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70189-5).

Kyriakopoulos, Christos E., Yu-Hui Chen, Michael A. Carducci, Glenn Liu, David F. Jarrard, Noah M. Hahn, Daniel H. Shevrin, et al. (2018). « Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Long-Term Survival Analysis of the Randomized Phase

III E3805 CHAARTED Trial ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (11): 1080-87. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.3657>.

Lapuk, Anna V., Chunxiao Wu, Alexander W. Wyatt, Andrew McPherson, Brian J. McConeghy, Sonal Brahmabhatt, Fan Mo, et al. (2012). « From Sequence to Molecular Pathology, and a Mechanism Driving the Neuroendocrine Phenotype in Prostate Cancer ». *The Journal of Pathology* 227 (3): 286-97. <https://doi.org/10.1002/path.4047>.

Latil, Alain, Ivan Bièche, Sandrine Pesche, Antoine Valéri, Georges Fournier, Olivier Cussenot, Rosette Lidereau. (2000). « VEGF Overexpression in Clinically Localized Prostate Tumors and Neuropilin-1 Overexpression in Metastatic Forms ». *International Journal of Cancer* 89 (2): 167-71.

Latil, Alain, Laurent Chêne, Béatrix Cochant-Priollet, Philippe Mangin, Georges Fournier, Philippe Berthon, Olivier Cussenot. (2003). « Quantification of Expression of Netrins, Slits and Their Receptors in Human Prostate Tumors ». *International Journal of Cancer* 103 (3): 306-15. <https://doi.org/10.1002/ijc.10821>.

Le, Dung T., Jennifer N. Uram, Hao Wang, Bjarne R. Bartlett, Holly Kemberling, Aleksandra D. Eyring, Andrew D. Skora, et al. (2015). « PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency ». *New England Journal of Medicine* 372 (26): 2509-20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1500596>.

Le, Dung T., Jennifer N. Durham, Kellie N. Smith, Hao Wang, Bjarne R. Bartlett, Laveet K. Aulakh, Steve Lu, et al. (2017). « Mismatch Repair Deficiency Predicts Response of Solid Tumors to PD-1 Blockade ». *Science (New York, N.Y.)* 357 (6349): 409-13. <https://doi.org/10.1126/science.aan6733>.

Lee, Changki, Young Mi Whang, Preston Campbell, Patrick L. Mulcrone, Florent Elefteriou, Sun Wook Cho, Serk In Park. (2018). « Dual Targeting C-Met and VEGFR2 in Osteoblasts Suppresses Growth and Osteolysis of Prostate Cancer Bone Metastasis ». *Cancer Letters* 414: 205-13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.016>.

Lee, John K., John W. Phillips, Bryan A. Smith, Jung Wook Park, Tanya Stoyanova, Erin F. McCaffrey, Robert Baertsch, et al. (2016). « N-Myc Drives Neuroendocrine Prostate Cancer Initiated from Human Prostate Epithelial Cells ». *Cancer Cell* 29 (4): 536-47. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.001>.

Li, Ang, John C. Dawson, Manuel Forero-Vargas, Heather J. Spence, Xinzi Yu, Ireen König, Kurt Anderson, et al. (2010). « The Actin-Bundling Protein Fascin Stabilizes Actin in Invadopodia and Potentiates Protrusive Invasion ». *Current Biology: CB* 20 (4): 339-45. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.035>.

Li, Ang, Jennifer P. Morton, YaFeng Ma, Saadia A. Karim, Yan Zhou, William J. Faller, Emma F. Woodham, et al. (2014). « Fascin Is Regulated by Slug, Promotes Progression of Pancreatic Cancer in Mice, and Is Associated with Patient Outcomes ». *Gastroenterology* 146 (5): 1386-1396.e1-17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.046>.

Li, Likun, Styliani Karanika, Guang Yang, Jiangxiang Wang, Sanghee Park, Bradley M. Broom, Ganiraju C. Manyam, et al. (2017). « Androgen Receptor Inhibitor-Induced

“BRCAness” and PARP Inhibition Are Synthetically Lethal for Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Science Signaling* 10 (480). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aam7479>.

Li, Linhao, Xian Jiang, Qian Zhang, Xuesong Dong, Yuqiang Gao, Yuanlong He, Haiquan Qiao, et al. (2016). « Neuropilin-1 Is Associated with Clinicopathology of Gastric Cancer and Contributes to Cell Proliferation and Migration as Multifunctional Co-Receptors ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 35 (janvier): 16. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0291-5>.

Li, Yinan, Nilgun Donmez, Cenk Sahinalp, Ning Xie, Yuwei Wang, Hui Xue, Fan Mo, et al. (2017). « SRRM4 Drives Neuroendocrine Transdifferentiation of Prostate Adenocarcinoma Under Androgen Receptor Pathway Inhibition ». *European Urology* 71 (1): 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.04.028>.

Lilly, Michael B., Chongze Ma, Ying Yuan, Wen-Pin Chen, Adam C. Soloff, Christine E. McLaren, Xiaolin Zi. (2015). « A Phase I Trial of Docetaxel Combined with Synthetic Lycopene in Subjects with Metastatic Prostate Cancer. » *Journal of Clinical Oncology* 33 (15\_suppl): e16109-e16109. [https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15\\_suppl.e16109](https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e16109).

Lin, Dong, Alexander W. Wyatt, Hui Xue, Yuwei Wang, Xin Dong, Anne Haegert, Rebecca Wu, et al. (2014). « High Fidelity Patient-Derived Xenografts for Accelerating Prostate Cancer Discovery and Drug Development ». *Cancer Research* 74 (4): 1272-83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2921-T>.

Lin, Tzu-Ping, Yi-Ting Chang, Sung-Yuan Lee, Mel Campbell, Tien-Chiao Wang, Shu-Huei Shen, Hsiao-Jen Chung, et al. (2016). « REST Reduction Is Essential for Hypoxia-Induced Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer Cells by Activating Autophagy Signaling ». *Oncotarget* 7 (18): 26137-51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8433>.

Lindberg, Johan, Ian G. Mills, Daniel Klevebring, Wennuan Liu, Mårten Neiman, Jianfeng Xu, Pernilla Wikström, et al. (2013). « The Mitochondrial and Autosomal Mutation Landscapes of Prostate Cancer ». *European Urology* 63 (4): 702-8. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.11.053>.

Liu, Fuzhou, Weiwei Shen, Hao Qiu, Xu Hu, Chao Zhang, Tongwei Chu. (2015). « Prostate Cancer Cells Induce Osteoblastic Differentiation via Semaphorin 3A: PCa Induces Osteoblastic Lesions ». *The Prostate* 75 (4): 370-80. <https://doi.org/10.1002/pros.22923>.

Liu, Wang-Qing, Yves Lepelletier, Matthieu Montès, Lucia Borriello, Rafika Jarray, Renaud Grépin, Bertrand Leforban, et al. (2018). « NRPa-308, a New Neuropilin-1 Antagonist, Exerts in Vitro Anti-Angiogenic and Anti-Proliferative Effects and in Vivo Anti-Cancer Effects in a Mouse Xenograft Model ». *Cancer Letters* 414: 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.039>.

Loriot, Yohann., Christophe Massard, Marina Gross-Goupil, Mario Di Palma, Bernard Escudier, Alberto Bossi, Karim Fizazi. (2009). « Combining Carboplatin and Etoposide in Docetaxel-Pretreated Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer: A Prospective Study Evaluating Also Neuroendocrine Features ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 20 (4): 703-8. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn694>.

Lotan, Tamara L., Nilesh S. Gupta, Wenle Wang, Antoun Toubaji, Michael C. Haffner, Alcides Chau, Jessica L. Hicks, et al. (2011). « ERG Gene Rearrangements Are Common in Prostatic Small Cell Carcinomas ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24 (6): 820-28. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.7>.

Luchino, Jonathan, Mélanie Hocine, Marie-Claude Amoureux, Benjamin Gibert, Agnès Bernet, Amélie Royet, Isabelle Treilleux, et al. (2013). « Semaphorin 3E Suppresses Tumor Cell Death Triggered by the Plexin D1 Dependence Receptor in Metastatic Breast Cancers ». *Cancer Cell* 24 (5): 673-85. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.010>.

Machesky, Laura M., et Ang Li. (2010). « Fascin: Invasive Filopodia Promoting Metastasis ». *Communicative & Integrative Biology* 3 (3): 263-70. <https://doi.org/10.4161/cib.3.3.11556>.

Magnon, Claire, Simon J. Hall, Juan Lin, Xiaonan Xue, Leah Gerber, Stephen J. Freedland, Paul S. Frenette. (2013). « Autonomic Nerve Development Contributes to Prostate Cancer Progression ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6142): 1236361. <https://doi.org/10.1126/science.1236361>.

Marcus, David M., Michael Goodman, Alshesh B. Jani, Adeboye O. Osunkoya, Peter J. Rossi. (2012). « A Comprehensive Review of Incidence and Survival in Patients with Rare Histological Variants of Prostate Cancer in the United States from 1973 to 2008 ». *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 15 (3): 283-88. <https://doi.org/10.1038/pcan.2012.4>.

Marech, Ilaria, Rosa Patruno, Nicola Zizzo, Claudia Gadaleta, Marcello Introna, Alfredo Francesco Zito, Cosmo Damiano Gadaleta, et al. (2014). « Masitinib (AB1010), from Canine Tumor Model to Human Clinical Development: Where We Are? » *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 91 (1): 98-111. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.12.011>.

Mateo, Joaquin, Suzanne Carreira, Shahneen Sandhu, Susana Miranda, Helen Mossop, Raquel Perez-Lopez, Daniel Nava Rodrigues, et al. (2015). « DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 373 (18): 1697-1708. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506859>.

Mateo, Joaquin, Nuria Porta, Diletta Bianchini, Ursula McGovern, Tony Elliott, Robert Jones, Isabel Syndikus, et al. (2020). « Olaparib in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with DNA Repair Gene Aberrations (TOPARP-B): A Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 2 Trial ». *The Lancet Oncology* 21 (1): 162-74. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30684-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30684-9).

Maudouit, Margaux, et Michaël Rochoy. (2019). « [Systematic review of the impact of chlordecone on human health in the French West Indies] ». *Thérapie* 74 (6): 611-25. <https://doi.org/10.1016/j.therap.2019.01.010>.

Mauffrey, Philippe, Nicolas Tchitchek, Vilma Barroca, Alexis Bemelmans, Virginie Firlej, Yves Allory, Paul-Henri Roméo, et al. (2019). « Progenitors from the Central Nervous System Drive Neurogenesis in Cancer ». *Nature* 569 (7758): 672-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1219-y>.

McGuire, Sean, Betul Kara, Peter C. Hart, Anthony Montag, Kristen Wroblewski, Sarah Fazal, Xin-Yun Huang, et al. (2019). « Inhibition of Fascin in Cancer and Stromal Cells Blocks Ovarian Cancer Metastasis ». *Gynecologic Oncology* 153 (2): 405-15. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.01.020>.

Meulenbeld, Hielke J., Jean P. Bleuse, Elio M. Vinci, Eric Raymond, Giordano Vitali, Armando Santoro, Luigi Dogliotti, et al. (2013). « Randomized Phase II Study of Danusertib in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer after Docetaxel Failure ». *BJU International* 111 (1): 44-52. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11404.x>.

Moch, Holger, Antonio L. Cubilla, Peter A. Humphrey, Victor E. Reuter, Thomas M. Ulbricht. (2016). « The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours ». *European Urology* 70 (1): 93-105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>.

Morris, Michael J., R. Bryan Rumble, Ethan Basch, Sebastien J. Hotte, Andrew Loblaw, Dana Rathkopf, Paul Celano, et al. (2018). « Optimizing Anticancer Therapy in Metastatic Non-Castrate Prostate Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (15): 1521-39. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.0619>.

Mosquera, Juan-Miguel, Himisha Beltran, Kyung Park, Theresa Y. MacDonald, Brian D. Robinson, Scott T. Tagawa, Sven Perner, et al. (2013). « Concurrent AURKA and MYCN Gene Amplifications Are Harbingers of Lethal Treatment-Related Neuroendocrine Prostate Cancer ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 15 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1593/neo.121550>.

Mosquera, Juan-Miguel, Rohit Mehra, Meredith M. Regan, Sven Perner, Elizabeth M. Genega, Gerri Bueti, Rajal B. Shah, et al. (2009). « Prevalence of TMPRSS2-ERG Fusion Prostate Cancer among Men Undergoing Prostate Biopsy in the United States ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (14): 4706-11. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2927>.

Mottet, Nicolas, Maria De Santis, Erik Briers, Liam Bourke, Silke Gillessen, Jeremy P. Grummet, Thomas B. Lam, et al. (2018). « Updated Guidelines for Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Abiraterone Acetate Combined with Castration Is Another Standard ». *European Urology* 73 (3): 316-21. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.09.029>.

Mu, Ping, Zeda Zhang, Matteo Benelli, Wouter R. Karthaus, Elizabeth Hoover, Chi-Chao Chen, John Wongvipat, et al. (2017). « SOX2 Promotes Lineage Plasticity and Antiandrogen Resistance in TP53- and RB1-Deficient Prostate Cancer ». *Science (New York, N.Y.)* 355 (6320): 84-88. <https://doi.org/10.1126/science.aah4307>.

Mudryj, Maria, et Clifford G. Tepper. (2013). « On the Origins of the Androgen Receptor Low Molecular Weight Species ». *Hormones and Cancer* 4 (5): 259-69. <https://doi.org/10.1007/s12672-013-0152-z>.

Mukherjee, Rono, David H McGuinness, Patrick McCall, Mark A Underwood, Morag Seywright, Clare Orange, Joanne Edwards. (2011). « Upregulation of MAPK Pathway Is Associated with Survival in Castrate-Resistant Prostate Cancer ». *British Journal of Cancer* 104 (12): 1920-28. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.163>.



Murphy, Danielle A., et Sara A. Courtneidge. (2011). « The “ins” and “Outs” of Podosomes and Invadopodia: Characteristics, Formation and Function ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (7): 413-26. <https://doi.org/10.1038/nrm3141>.

Narayanan, Sujata, Sandy Srinivas, et David Feldman. (2016). « Androgen-Glucocorticoid Interactions in the Era of Novel Prostate Cancer Therapy ». *Nature Reviews. Urology* 13 (1): 47-60. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2015.254>.

Nava Rodrigues, Daniel, Pasquale Rescigno, David Liu, Wei Yuan, Suzanne Carreira, Maryou B. Lambros, George Seed, et al. (2018). « Immunogenomic Analyses Associate Immunological Alterations with Mismatch Repair Defects in Prostate Cancer ». *The Journal of Clinical Investigation* 128 (10): 4441-53. <https://doi.org/10.1172/JCI121924>.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Version 1/2021 02/02/21. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/prostate.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf)

Neufeld, Gera, et Ofra Kessler. (2008). « The Semaphorins: Versatile Regulators of Tumour Progression and Tumour Angiogenesis ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (8): 632-45. <https://doi.org/10.1038/nrc2404>.

Neufeld, Gera, Yelena Mumblat, Tatyana Smolkin, Shira Toledano, Inbal Nir-Zvi, Keren Ziv, Ofra Kessler. (2016). « The Role of the Semaphorins in Cancer ». *Cell Adhesion & Migration*, août, 1-23. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1197478>.

Nilsson, Ingrid, Fuad Bahram, Xiujuan Li, Laura Gualandi, Sina Koch, Malin Jarvius, Ola Söderberg, et al. (2010). « VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts ». *The EMBO Journal* 29 (8): 1377-88. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.30>.

Nogi, Terukazu, Norihisa Yasui, Emiko Mihara, Yukiko Matsunaga, Masanori Noda, Naoya Yamashita, Toshihiko Toyofuku, et al. (2010). « Structural Basis for Semaphorin Signalling through the Plexin Receptor ». *Nature* 467 (7319): 1123-27. <https://doi.org/10.1038/nature09473>.

Nuhn, Philipp, Johann S. De Bono, Karim Fizazi, Stephen J. Freedland, Maurizio Grilli, Philip W. Kantoff, Guru Sonpavde, et al. (2019). « Update on Systemic Prostate Cancer Therapies: Management of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer in the Era of Precision Oncology ». *European Urology* 75 (1): 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.03.028>.

Oberg, Kjell, Irvin M. Modlin, Wouter De Herder, Marianne Pavel, David Klimstra, Andrea Frilling, David C. Metz, et al. (2015). « Consensus on Biomarkers for Neuroendocrine Tumour Disease ». *The Lancet. Oncology* 16 (9): e435-46. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00186-2).

Ooi, Lezanne, et Ian C. Wood. (2007). « Chromatin Crosstalk in Development and Disease: Lessons from REST ». *Nature Reviews. Genetics* 8 (7): 544-54. <https://doi.org/10.1038/nrg2100>.

Oudard, Stéphane, Karim Fizazi, Lisa Sengeløv, Gedske Daugaard, Fred Saad, Steinbjørn

Hansen, Marie Hjälms-Eriksson, et al. (2017). « Cabazitaxel Versus Docetaxel As First-Line Therapy for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial-FIRSTANA ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (28): 3189-97. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.72.1068>.

Özdemir, Berna C., Janine Hensel, Chiara Secondini, Antoinette Wetterwald, Ruth Schwaninger, Achim Fleischmann, Wolfgang Raffelsberger, 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 ». Édité par Adriano Angelucci. *PLoS ONE* 9 (12): e114530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114530>.

Papandreou, Christos N., Danaï D. Daliani, Peter F. Thall, Shi-Ming Tu, Xuemei Wang, Adriana Reyes, Patricia Troncoso, et al. (2002). « Results of a Phase II Study with Doxorubicin, Etoposide, and Cisplatin in Patients with Fully Characterized Small-Cell Carcinoma of the Prostate ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 20 (14): 3072-80. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.12.065>.

Parimi, Vamsi, Rajen Goyal, Kate Poropatich, Ximing J. Yang. (2014). « Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer: A Review ». *American Journal of Clinical and Experimental Urology* 2 (4): 273-85.

Parker, Christopher, Silke. Gillissen, Axel Heidenreich, Alan Horwich, et ESMO Guidelines Committee. (2015). « Cancer of the Prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 26 Suppl 5: v69-77. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv222>.

Parker, Christopher, Sten Nilsson, Daniel Heinrich, Svein I. Helle, Joe M. O'Sullivan, Sophie D. Fosså, Aleš Chodacki, et al. (2013). « Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 369 (3): 213-23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213755>.

Parker, Christopher, Nicholas D. James, Christopher D. Brawley, Noel W. Clarke, Alex P. Hoyle, Adnan Ali, Alastair W. S. Ritchie, et al. (2018). « Radiotherapy to the Primary Tumour for Newly Diagnosed, Metastatic Prostate Cancer (STAMPEDE): A Randomised Controlled Phase 3 Trial ». *Lancet (London, England)* 392 (10162): 2353-66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32486-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32486-3).

Pavel, Marianne, Dermot O'Toole, Frederico Costa, Jaume Capdevila, David Gross, Reza Kianmanesh, Eric Krenning, et al. (2016). « ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site ». *Neuroendocrinology* 103 (2): 172-85. <https://doi.org/10.1159/000443167>.

Peacock, James W., Ario Takeuchi, Norihiro Hayashi, Liangliang Liu, Kevin J. Tam, Nader Al Nakouzi, Nastaran Khazamipour, et al. (2018). « SEMA3C Drives Cancer Growth by Transactivating Multiple Receptor Tyrosine Kinases via Plexin B1 ». *EMBO Molecular Medicine* 10 (2): 219-38. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707689>.

Pelosi, Giuseppe, Ugo Pastorino, Felice Pasini, Patrick Maissoneuve, Filippo Frassetto,

Antonio Iannucci, Aurelio Sonzogni, et al. (2003). « Independent Prognostic Value of Fascin Immunoreactivity in Stage I Nonsmall Cell Lung Cancer ». *British Journal of Cancer* 88 (4): 537-47. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600731>.

Pomerantz, Mark M., Fugen Li, David Y. Takeda, Romina Lenci, Apurva Chonkar, Matthew Chabot, Paloma Cejas, et al. (2015). « The Androgen Receptor Cistrome Is Extensively Reprogrammed in Human Prostate Tumorigenesis ». *Nature Genetics* 47 (11): 1346-51. <https://doi.org/10.1038/ng.3419>.

Posadas, Edwin M., Hikmat Al-Ahmadie, Victoria L. Robinson, Ramasamy Jagadeeswaran, Kristen Otto, Kristen E. Kasza, Maria Tretiakov, et al. (2009). « FYN Is Overexpressed in Human Prostate Cancer ». *BJU International* 103 (2): 171-77. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2008.08009.x>.

Poulet, Geoffroy, Joséphine Massias, et Valerie Taly. (2019). « Liquid Biopsy: General Concepts ». *Acta Cytologica* 63 (6): 449-55. <https://doi.org/10.1159/000499337>.

Pritchard, Colin C., Colm Morrissey, Akash Kumar, Xiaotun Zhang, Christina Smith, Ilsa Coleman, Stephen J. Salipante, et al. (2014). « Complex MSH2 and MSH6 Mutations in Hypermutated Microsatellite Unstable Advanced Prostate Cancer ». *Nature Communications* 5 (1): 4988. <https://doi.org/10.1038/ncomms5988>.

Prud'homme, Gérald J., et Yelena Glinka. (2012). « Neuropilins Are Multifunctional Coreceptors Involved in Tumor Initiation, Growth, Metastasis and Immunity ». *Oncotarget* 3 (9): 921-39. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.626>.

Puca, Loredana, Verena Sailer, Kaitlyn Gayvert, Kumiko Isse, Michael Sigouros, David M. Nanus, Scott T. Tagawa, et al. (2017). « Rovalpituzumab Tesirine (Rova-T) as a Therapeutic Agent for Neuroendocrine Prostate Cancer (NEPC). » *Journal of Clinical Oncology* 35 (15\_suppl): 5029-5029. [https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15\\_suppl.5029](https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.5029).

Puca, Loredana, Panagiotis J. Vlachostergios, et Himisha Beltran. (2019). « Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer: Emerging Biology, Models, and Therapies ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 9 (2): a030593. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030593>.

Quigley, David A., Ha X. Dang, Shuang G. Zhao, Paul Lloyd, Rahul Aggarwal, Joshi J. Alumkal, Adam Foye, et al. (2018). « Genomic Hallmarks and Structural Variation in Metastatic Prostate Cancer ». *Cell* 174 (3): 758-769.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.039>.

Ramakrishnan Geethakumari, Praveen, Matthew J. Schiewer, Karen E. Knudsen, Wm Kevin Kelly. (2017). « PARP Inhibitors in Prostate Cancer ». *Current Treatment Options in Oncology* 18 (6): 37. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0480-2>.

Rathkopf, Dana E., et Howard I. Scher. (2018). « Apalutamide for the Treatment of Prostate Cancer ». *Expert Review of Anticancer Therapy* 18 (9): 823-36. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1503954>.

Reddy, E. Shiam., Veena N. Rao, et Takis S. Papas. (1987). « The Erg Gene: A Human Gene Related to the Ets Oncogene. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (17):

6131-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.17.6131>.

Rehman, Michael, Sreeharsha Gurrapu, Gabriella Cagnoni, Lorena Capparuccia, et Luca Tamagnone. (2016). « PlexinD1 Is a Novel Transcriptional Target and Effector of Notch Signaling in Cancer Cells ». *PloS One* 11 (10): e0164660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164660>.

Rehman, Michael, et Luca Tamagnone. (2013). « Semaphorins in Cancer: Biological Mechanisms and Therapeutic Approaches ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24 (3): 179-89. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.10.005>.

Ren, Shancheng, Gong-Hong Wei, Dongbing Liu, Ligu Wang, Yong Hou, Shida Zhu, Lihua Peng, et al. (2018). « Whole-Genome and Transcriptome Sequencing of Prostate Cancer Identify New Genetic Alterations Driving Disease Progression ». *European Urology* 73 (3): 322-39. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.08.027>.

Rickman, David S., Himisha Beltran, Francesca Demichelis, Mark A. Rubin. (2017). « Biology and Evolution of Poorly Differentiated Neuroendocrine Tumors ». *Nature Medicine* 23 (6): 1-10. <https://doi.org/10.1038/nm.4341>.

Robinson, Dan, Eliezer M. Van Allen, Yi-Mi Wu, Nikolaus Schultz, Robert J. Lonigro, Juan-Miguel Mosquera, Bruce Montgomery, et al. (2015). « Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer ». *Cell* 161 (5): 1215-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.001>.

Rotinen, Mirja, Sungyong You, Julie Yang, Simon G. Coetzee, Mariana Reis-Sobreiro, Wen-Chin Huang, Fangjin Huang, et al. (2018). « ONECUT2 Is a Targetable Master Regulator of Lethal Prostate Cancer That Suppresses the Androgen Axis ». *Nature Medicine* 24 (12): 1887-98. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0241-1>.

Rozet, François, Pierre Mongiat-Artus, Christophe Hennequin, Jean Baptiste Beauval, Philippe Beuzeboc, Luc Cormier, Gaëlle Fromont-Hankard, et al. (2020). « Recommandations françaises du Comité de cancérologie de l'AFU – actualisation 2020–2022 : cancer de la prostate ». *Progrès en Urologie* 30 (12): S136-251. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(20\)30752-1](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(20)30752-1).

Rubin, Mark A., Christopher A. Maher, et Arul M. Chinnaiyan. (2011). « Common Gene Rearrangements in Prostate Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (27): 3659-68. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.1916>.

Rünker, Annette E., Graham E. Little, Fumikazu Suto, Hajime Fujisawa, Kevin J. Mitchell. (2008). « Semaphorin-6A Controls Guidance of Corticospinal Tract Axons at Multiple Choice Points ». *Neural Development* 3 (décembre): 34. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-34>.

Ryan, Charles J., Arturo Molina, Jinhui Li, Thian Kheoh, Eric J. Small, Christopher M. Haqq, Russell P. Grant, et al. (2013). « Serum Androgens as Prognostic Biomarkers in Castration-Resistant Prostate Cancer: Results from an Analysis of a Randomized Phase III Trial ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (22): 2791-98. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.4595>.

Ryan, Charles J., Matthew R. Smith, Karim Fizazi, Fred Saad, Peter F. A. Mulders, Cora N. Sternberg, Kurt Miller, et al. (2015). « Abiraterone Acetate plus Prednisone versus Placebo plus Prednisone in Chemotherapy-Naive Men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (COU-AA-302): Final Overall Survival Analysis of a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Study ». *The Lancet. Oncology* 16 (2): 152-60. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71205-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71205-7).

Saad, Fred, Donald M. Gleason, Robin Murray, Simon Tchekmedyian, Peter Venner, Louis Lacombe, Joseph L. Chin, et al. (2004). « Long-Term Efficacy of Zoledronic Acid for the Prevention of Skeletal Complications in Patients with Metastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer ». *Journal of the National Cancer Institute* 96 (11): 879-82. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh141>.

Saad, Fred, Neal Shore, Tian Zhang, Shikhar Sharma, Helen K. Cho, Ira A. Jacobs. (2019). « Emerging Therapeutic Targets for Patients with Advanced Prostate Cancer ». *Cancer Treatment Reviews* 76: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.03.002>.

Salehi, Mahsa, et Mohammadreza Sharifi. (2018). « Exosomal MiRNAs as Novel Cancer Biomarkers: Challenges and Opportunities ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (9): 6370-80. <https://doi.org/10.1002/jcp.26481>.

Salvi, Samanta, Valentina Casadio, Vincenza Conteduca, Cristian Lolli, Giorgia Gurioli, Filippo Martignano, Giuseppe Schepisi, et al. (2016). « Circulating AR Copy Number and Outcome to Enzalutamide in Docetaxel-Treated Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Oncotarget* 7 (25): 37839-45. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9341>.

Sant'Agnes, P. Anthony di. (1992). « Neuroendocrine Differentiation in Carcinoma of the Prostate. Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Implications ». *Cancer* 70 (1 Suppl): 254-68. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920701\)70:1+<254::aid-cncr2820701312>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920701)70:1+<254::aid-cncr2820701312>3.0.co;2-e).

Scheble, Veit J., Martin Braun, Rameen Beroukhim, Craig H. Mermel, Christian Ruiz, Theresia Wilbertz, Ann-Cathrin Stiedl, et al. (2010). « ERG Rearrangement Is Specific to Prostate Cancer and Does Not Occur in Any Other Common Tumor ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23 (8): 1061-67. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.87>.

Scher, Howard I., Karim Fizazi, Fred Saad, Mary-Ellen Taplin, Cora N. Sternberg, Kurt Miller, Ronald de Wit, et al. (2012). « Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy ». Édité par Richard C. Cabot, Nancy Lee Harris, Eric S. Rosenberg, Jo-Anne O. Shepard, Alice M. Cort, Sally H. Ebeling, et Emily K. McDonald. *New England Journal of Medicine* 367 (13): 1187-97. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1207506>.

Schreyer, Edwige, Philippe Barthélémy, Félicie Cottard, Pauline Ould Madi-Berthélémy, Frédérique Schaff-Wendling, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline. (2017). « Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate ». *médecine/sciences* 33 (8-9): 758-64. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173308021>.

Scott, Lesley J. (2018). « Enzalutamide: A Review in Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Drugs* 78 (18): 1913-24. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1029-9>.

Scott, Lesley J. (2020). « Darolutamide: A Review in Non-Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Targeted Oncology* 15 (6): 791-99. <https://doi.org/10.1007/s11523-020-00779-x>.

Segarra, Marta, Hidetaka Ohnuki, Dragan Maric, Ombretta Salvucci, Xu Hou, Anil Kumar, Xuri Li, et al. (2012). « Semaphorin 6A Regulates Angiogenesis by Modulating VEGF Signaling ». *Blood* 120 (19): 4104-15. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-410076>.

Seiradake, Elena, E. Yvonne Jones, et Rüdiger Klein. (2016). « Structural Perspectives on Axon Guidance ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 32 (1): 577-608. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125008>.

Sequist, Lecia V., Belinda A. Waltman, Dora Dias-Santagata, Subba Digumarthy, Alexa B. Turke, Panos Fidiias, Kristin Bergethon, et al. (2011). « Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors ». *Science Translational Medicine* 3 (75): 75ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002003>.

Shafi, Ayesha A., Aihua E. Yen, et Nancy L. Weigel. (2013). « Androgen Receptors in Hormone-Dependent and Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Pharmacology & Therapeutics* 140 (3): 223-38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.003>.

Sharma, Naomi L., Charlie E. Massie, Falk Butter, Matthias Mann, Helene Bon, Antonio Ramos-Montoya, Suraj Menon, et al. (2014). « The ETS Family Member GABP $\alpha$  Modulates Androgen Receptor Signalling and Mediates an Aggressive Phenotype in Prostate Cancer ». *Nucleic Acids Research* 42 (10): 6256-69. <https://doi.org/10.1093/nar/gku281>.

Singla, Nirmish, Rashed A. Ghandour, et Ganesh V. Raj. (2019). « Investigational Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) Agonists and Other Hormonal Agents in Early Stage Clinical Trials for Prostate Cancer ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 28 (3): 249-59. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1570130>.

Sizemore, Gina M., Jason R. Pitarresi, Subhasree Balakrishnan, Michael C. Ostrowski. (2017). « The ETS Family of Oncogenic Transcription Factors in Solid Tumours ». *Nature Reviews Cancer* 17 (6): 337-51. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.20>.

Smith, David C., Matthew R. Smith, Christopher Sweeney, Aymen A. Elfiky, Christopher Logothetis, Paul G. Corn, Nicholas J. Vogelzang, et al. (2013). « Cabozantinib in Patients with Advanced Prostate Cancer: Results of a Phase II Randomized Discontinuation Trial ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (4): 412-19. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.0494>.

Smith, Matthew R., Fred Saad, Simon Chowdhury, Stéphane Oudard, Boris A. Hadaschik, Julie N. Graff, David Olmos, et al. (2018). « Apalutamide Treatment and Metastasis-Free Survival in Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 378 (15): 1408-18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1715546>.

Steineck, Gunnar, Victor Reuter, William K. Kelly, Richard Frank, Larry Schwartz, et Howard I. Scher. (2002). « Cytotoxic Treatment of Aggressive Prostate Tumors with or without Neuroendocrine Elements ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 41 (7-8): 668-74. <https://doi.org/10.1080/028418602321028292>.

Steinkamp, Mara P., Orla A. O'Mahony, Michele Brogley, Haniya Rehman, Elizabeth W. Lapensee, Saravana Dhanasekaran, Matthias D. Hofer, et al. (2009). « Treatment-Dependent Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancer Exploit Multiple Mechanisms to Evade Therapy ». *Cancer Research* 69 (10): 4434-42. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3605>.

Suchting, Steven, Roy Bicknell, et Anne Eichmann. (2006). « Neuronal Clues to Vascular Guidance ». *Experimental Cell Research* 312 (5): 668-75. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.009>.

Sweeney, Christopher J., Yu-Hui Chen, Michael Carducci, Glenn Liu, David F. Jarrard, Mario Eisenberger, Yu-Ning Wong, et al. (2015). « Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 373 (8): 737-46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503747>.

Sydes, Matthew R., Melissa R. Spears, Malcom D. Mason, Noel W. Clarke, David P. Dearnaley, Johann S. de Bono, Gerhardt Attard, et al. (2018). « Adding Abiraterone or Docetaxel to Long-Term Hormone Therapy for Prostate Cancer: Directly Randomised Data from the STAMPEDE Multi-Arm, Multi-Stage Platform Protocol ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (5): 1235-48. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy072>.

Tagawa, Scott T., Emmanuel S. Antonarakis, Ada Gjyrezi, Giuseppe Galletti, Seaho Kim, Daniel Worroll, John Stewart, et al. (2019). « Expression of AR-V7 and ARv567es in Circulating Tumor Cells Correlates with Outcomes to Taxane Therapy in Men with Metastatic Prostate Cancer Treated in TAXYNERGY ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25 (6): 1880-88. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0320>.

Tam, Kevin J, Kush Dalal, Michael Hsing, Chi Wing Cheng, Shahram Khosravi, Parvin Yenki, Charan Tse, et al. (2017). « Androgen Receptor Transcriptionally Regulates Semaphorin 3C in a GATA2-Dependent Manner ». *Oncotarget* 8 (6). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14168>.

Tam, Kevin J, Daniel H. F. Hui, Wilson W. Lee, Mingshu Dong, Tabitha Tombe, Ivy Z. F. Jiao, Shahram Khosravi, et al. (2017). « Semaphorin 3C Drives Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Invasiveness, and Stem-like Characteristics in Prostate Cells ». *Scientific Reports* 7 (1): 11501. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11914-6>.

Tamagnone, Luca. (2012). « Emerging Role of Semaphorins as Major Regulatory Signals and Potential Therapeutic Targets in Cancer ». *Cancer Cell* 22 (2): 145-52. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.031>.

Tan, Hsueh-Li, Akshay Sood, Hameed A. Rahimi, Wenle Wang, Nilesh Gupta, Jessica Hicks, Stacy Mosier, et al. (2014). « Rb Loss Is Characteristic of Prostatic Small Cell Neuroendocrine Carcinoma ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (4): 890-903. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1982>.

Tan, Vanessa Y, Sarah J. Lewis, Josephine C. Adams, et Richard M. Martin. (2013). « Association of Fascin-1 with Mortality, Disease Progression and Metastasis in Carcinomas:

A Systematic Review and Meta-Analysis ». *BMC Medicine* 11 (février): 52. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-52>.

Tang, Yaxiong, Basmina Parmakhtiar, Anne R. Simoneau, Jun Xie, John Fruehauf, Michael Lilly, et Xiaolin Zi. (2011). « Lycopene Enhances Docetaxel's Effect in Castration-Resistant Prostate Cancer Associated with Insulin-like Growth Factor I Receptor Levels ». *Neoplasia* 13 (2): 108-19. <https://doi.org/10.1593/neo.101092>.

Tannock, Ian F., David Osoba, Martin R. Stockler, D. Scott Ernst, Alan J. Neville, Malcolm J. Moore, G. R. Armitage, et al. (1996). « Chemotherapy with Mitoxantrone plus Prednisone or Prednisone Alone for Symptomatic Hormone-Resistant Prostate Cancer: A Canadian Randomized Trial with Palliative End Points ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 14 (6): 1756-64.

Tannock, Ian F., Ronald de Wit, William R. Berry, Jozsef Horti, Anna Pluzanska, Kim N. Chi, Stephane Oudard, et al. (2004). « Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 351 (15): 1502-12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040720>.

Taplin, Mary-Ellen, Glenn J. Bubley, Todd D. Shuster, Martha E. Frantz, Amy E. Spooner, George K. Ogata, Harold N. Keer, et al (1995). « Mutation of the Androgen-Receptor Gene in Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 332 (21): 1393-98. <https://doi.org/10.1056/NEJM199505253322101>.

Taplin, Mary-Ellen, Arif Hussain, Neal D. Shore, Bill Bradley, Patrick Trojer, Claudia Lebedinsky, Adrian Mario Senderowicz, et al. (2018). « A Phase 1b/2 Study of CPI-1205, a Small Molecule Inhibitor of EZH2, Combined with Enzalutamide (E) or Abiraterone/Prednisone (A/P) in Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer (MCRPC). » *Journal of Clinical Oncology* 36 (6\_suppl): TPS398-TPS398. [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.6\\_suppl.TPS398](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.6_suppl.TPS398).

Taris, Michael, Jacques Irani, Pascal Blanchet, Luc Multigner, Xavier Cathelineau, Gaëlle Fromont. (2014). « ERG Expression in Prostate Cancer: The Prognostic Paradox: ERG and Prostate Cancer ». *The Prostate* 74 (15): 1481-87. <https://doi.org/10.1002/pros.22863>.

Taylor, Barry S., Nikolaus Schultz, Haley Hieronymus, Anuradha Gopalan, Yonghong Xiao, Brett S. Carver, Vivek K. Arora, et al. (2010). « Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer ». *Cancer Cell* 18 (1): 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.026>.

Terry, Stéphane, et Himisha Beltran. (2014). « The Many Faces of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer Progression ». *Frontiers in Oncology* 4: 60. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00060>.

Thakur, Abhimanyu, Aishwarya Roy, Arijit Ghosh, Mohit Chhabra, Sugato Banerjee. (2018). « Abiraterone Acetate in the Treatment of Prostate Cancer ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 101: 211-18. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.067>.

Théry, Clotilde, Sebastian Amigorena, Graça Raposo, Aled Clayton. (2006). « Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids ». *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 3: Unit 3.22.



<https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>.

Thomas, Christian, Martin Bögemann, Frank König, Stefan Machtens, Martin Schostak, Thomas Steuber, Axel Heidenreich. (2016). « [Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) 2015 in St. Gallen : Critical review of the recommendations on diagnosis and therapy of metastatic prostate cancer by a German expert panel] ». *Der Urologe. Ausg. A* 55 (6): 772-82. <https://doi.org/10.1007/s00120-016-0030-8>.

Tian, Tian V., Nathalie Tomavo, Ludovic Huot, Anne Flourens, Edith Bonnelye, Sébastien Flajollet et al. (2014). « Identification of Novel TMPRSS2:ERG Mechanisms in Prostate Cancer Metastasis: Involvement of MMP9 and PLXNA2 ». *Oncogene* 33 (17): 2204-14. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.176>.

Tiwari, Ritika, Nishat Manzar, Vipul Bhatia, Anjali Yadav, Mushtaq A. Nengroo, Dipak Datta, Shannon Carskadon, et al. (2020). « Androgen Deprivation Upregulates SPINK1 Expression and Potentiates Cellular Plasticity in Prostate Cancer ». *Nature Communications* 11 (1): 384. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14184-0>.

Tomlins, Scott A., Anders Bjartell, Arul M. Chinnaiyan, Guido Jenster, Robert K. Nam, Mark A. Rubin, et Jack A. Schalken. (2009). « ETS Gene Fusions in Prostate Cancer: From Discovery to Daily Clinical Practice ». *European Urology* 56 (2): 275-86. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.04.036>.

Tomlins, Scott A., Bharathi Laxman, Saravana M. Dhanasekaran, Beth E. Helgeson, Xuhong Cao, David S. Morris, Anjana Menon, et al. (2007). « Distinct Classes of Chromosomal Rearrangements Create Oncogenic ETS Gene Fusions in Prostate Cancer ». *Nature* 448 (7153): 595-99. <https://doi.org/10.1038/nature06024>.

Tomlins, Scott A., Daniel R. Rhodes, Sven Perner, Saravana M. Dhanasekaran, Rohit Mehra, Xiao-Wei Sun, Sooryanarayana Varambally, et al. (2005). « Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer ». *Science (New York, N.Y.)* 310 (5748): 644-48. <https://doi.org/10.1126/science.1117679>.

Topalian, Suzanne L., F. Stephen Hodi, Julie R. Brahmer, Scott N. Gettinger, David C. Smith, David F. McDermott, John D. Powderly, et al. (2012). « Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 366 (26): 2443-54. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>.

Tse, Brian W C, Marianna Volpert, Elca Ratther, Nataly Stylianou, Mannan Nouri, Kevin McGowan, Melanie L Lehman, et al. (2017). « Neuropilin-1 Is Upregulated in the Adaptive Response of Prostate Tumors to Androgen-Targeted Therapies and Is Prognostic of Metastatic Progression and Patient Mortality ». *Oncogene* 36 (24): 3417-27. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.482>.

Turpin, Anthony, Martine Duterque-Coquillaud, et Marie-Hélène Vieillard. (2020). « Bone Metastasis: Current State of Play ». *Translational Oncology* 13 (2): 308-20. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.10.012>.

Turpin, Anthony, Edwina Girard, Clio Baillet, David Pasquier, Jonathan Olivier, Arnaud Villers, Philippe Puech, et al. (2020). « Imaging for Metastasis in Prostate Cancer: A Review

of the Literature ». *Frontiers in Oncology* 10: 55. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00055>.

Turpin, Anthony, David Pasquier, Christophe Massard, Jean-François Berdah, Stéphane Culine, Nicolas Penel. (2017). « First-Line Management of Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer Patients: Audit of Real-Life Practices ». *Bulletin Du Cancer*, avril. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.02.002>.

Turpin, Anthony, Tiphaine Leblon. *L'Essentiel en Cancérologie*, réédition 2016. Chapitre Item 307-Tumeurs de la Prostate. ISBN: 2818308798

Tran, Chris, Samedy Ouk, Nicola J. Clegg, Yu Chen, Philip A. Watson, Vivek Arora, John Wongvipat, et al. (2009). « Development of a Second-Generation Antiandrogen for Treatment of Advanced Prostate Cancer ». *Science (New York, N.Y.)* 324 (5928): 787-90. <https://doi.org/10.1126/science.1168175>.

Valéri, Antoine. (2002). « Étude génétique, épidémiologique et clinique du cancer de la prostate familial ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 186 (4): 779-91. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)34297-9](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)34297-9).

Varambally, Sooryanarayana, Saravana M. Dhanasekaran, Ming Zhou, Terrence R. Barrette, Chandan Kumar-Sinha, Martin G. Sanda, Debashis Ghosh, et al. (2002). « The Polycomb Group Protein EZH2 Is Involved in Progression of Prostate Cancer ». *Nature* 419 (6907): 624-29. <https://doi.org/10.1038/nature01075>.

Varinot, Justine, Olivier Cussenot, Morgan Roupret, Pierre Conort, Marc-Olivier Bitker, Emmanuel Chartier-Kastler, Liang Cheng, et al. (2013). « HOXB13 Is a Sensitive and Specific Marker of Prostate Cells, Useful in Distinguishing between Carcinomas of Prostatic and Urothelial Origin ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 463 (6): 803-9. <https://doi.org/10.1007/s00428-013-1495-0>.

Varinot, Justine, Adéline Furudoï, Sarah Drouin, Véronique Phe, Raphaelle Renard Penna, Morgan Roupret, Marc-Olivier Bitker, et al. (2016). « HOXB13 Protein Expression in Metastatic Lesions Is a Promising Marker for Prostate Origin ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 468 (5): 619-22. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1917-x>.

Vaswani, Rishi G., Victor S. Gehling, Les A. Dakin, Andrew S. Cook, Christopher G. Nasveschuk, Martin Duplessis, Priyadarshini Iyer, et al. (2016). « Identification of (R)-N-((4-Methoxy-6-Methyl-2-Oxo-1,2-Dihydropyridin-3-Yl)methyl)-2-Methyl-1-(1-(1-(2,2,2-Trifluoroethyl)Piperidin-4-Yl)ethyl)-1H-Indole-3-Carboxamide (CPI-1205), a Potent and Selective Inhibitor of Histone Methyltransferase EZH2, Suitable for Phase I Clinical Trials for B-Cell Lymphomas ». *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (21): 9928-41. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01315>.

Verlinden, Lieve, Carsten Kriebitzsch, Ine Beullens, Biau Keng Tan, Geert Carmeliet, Annemieke Verstuyf. (2013). « Nrp2 Deficiency Leads to Trabecular Bone Loss and Is Accompanied by Enhanced Osteoclast and Reduced Osteoblast Numbers ». *Bone* 55 (2): 465-75. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.03.023>.

Vivekanandhan, Sneha, Lijuan Yang, Ying Cao, Engfeng Wang, Shamit K. Dutta, Anil K.

Sharma, Debabrata Mukhopadhyay. (2017). « Genetic Status of KRAS Modulates the Role of Neuropilin-1 in Tumorigenesis ». *Scientific Reports* 7 (1): 12877. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12992-2>.

Wadosky, Kristine M., et Shahriar Koochekpour. (2016). « Therapeutic Rationales, Progresses, Failures, and Future Directions for Advanced Prostate Cancer ». *International Journal of Biological Sciences* 12 (4): 409-26. <https://doi.org/10.7150/ijbs.14090>.

Wang, Gang, Jun Wang, et Marianne D. Sadar. (2008). « Crosstalk between the Androgen Receptor and Beta-Catenin in Castrate-Resistant Prostate Cancer ». *Cancer Research* 68 (23): 9918-27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1718>.

Watson, Philip A., Vivek K. Arora, et Charles L. Sawyers. (2015). « Emerging Mechanisms of Resistance to Androgen Receptor Inhibitors in Prostate Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 15 (12): 701-11. <https://doi.org/10.1038/nrc4016>.

Weekes, Colin D., Muralidhar Beeram, Anthony W. Tolcher, Kyriakos P. Papadopoulos, Lia Gore, Priti Hegde, Yan Xin, et al. (2014). « A Phase I Study of the Human Monoclonal Anti-NRP1 Antibody MNRP1685A in Patients with Advanced Solid Tumors ». *Investigational New Drugs* 32 (4): 653-60. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0071-z>.

Whittemore, Alice S., Laurence N. Kolonel, Anna H. Wu, Esther M. John, Richard P. Gallagher, Geoffrey R. Howe, Jean David Burch, 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 ». *Journal of the National Cancer Institute* 87 (9): 652-61. <https://doi.org/10.1093/jnci/87.9.652>.

Williamson, Magali, Patricia de Winter, et John R Masters. (2016). « Plexin-B1 Signalling Promotes Androgen Receptor Translocation to the Nucleus ». *Oncogene* 35 (8): 1066-72. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.160>.

Williamson, Magali, Ritu Garg, et Claire M. Wells. (2019). « PlexinB1 Promotes Nuclear Translocation of the Glucocorticoid Receptor ». *Cells* 9 (1): 3. <https://doi.org/10.3390/cells9010003>.

Williamson, Sean R., Shaobo Zhang, Jorge L. Yao, Jiaoti Huang, Antonio Lopez-Beltran, Steven Shen, Adeboye O. Osunkoya, et al. (2011). « ERG-TMPRSS2 Rearrangement Is Shared by Concurrent Prostatic Adenocarcinoma and Prostatic Small Cell Carcinoma and Absent in Small Cell Carcinoma of the Urinary Bladder: Evidence Supporting Monoclonal Origin ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24 (8): 1120-27. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.56>.

Wong, Oscar Gee-Wan, Tharani Nitkunan, Izumi Oinuma, Chun Zhou, Veronique Blanc, Richard S. D. Brown, Simon R. J. Bott, et al. (2007). « Plexin-B1 Mutations in Prostate Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (48): 19040-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702544104>.

Wu, Longtao, Christine Runkle, Hong Jian. Jin, Jindan Yu, Jinting Li, Xushan Yang, Timothy Kuzel et al. (2014). « CCN3/NOV Gene Expression in Human Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor ». *Oncogene* 33 (4): 504-13.

<https://doi.org/10.1038/onc.2012.602>.

Wu, Yi-Mi, Marcin Cieřlik, Robert J. Lonigro, Pankaj Vats, Melissa A. Reimers, Xuhong Cao, Yu Ning, et al. (2018). « Inactivation of CDK12 Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer ». *Cell* 173 (7): 1770-1782.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.034>.

Wynn, San San, Satyagnani Nagabundi, Jaik Koo, Nena W. Chin. (2000). « Recurrent Prostate Carcinoma Presenting as Omental Large Cell Carcinoma with Neuroendocrine Differentiation and Resulting in Bowel Obstruction ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 124 (7): 1074-76. [https://doi.org/10.1043/0003-9985\(2000\)124<1074:RPCPAO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-9985(2000)124<1074:RPCPAO>2.0.CO;2).

Xin, Zhixiang, Yong Zhang, Zhou Jiang, Ling Zhao, Liancheng Fan, Yanqing Wang, Shaowei Xie, et al. (2018). « Insulinoma-Associated Protein 1 Is a Novel Sensitive and Specific Marker for Small Cell Carcinoma of the Prostate ». *Human Pathology* 79: 151-59. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.05.014>.

Xu, Xuejun, Zhiping Zhao, Shixiang Guo, Jian Li, Songsong Liu, Yu You, Bing Ni, Huaizhi Wang, et Ping Bie. (2017). « Increased Semaphorin 3c Expression Promotes Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Activating the ERK1/2 Signaling Pathway ». *Cancer Letters* 397: 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.014>.

Yacoub, Mokrane, Alix Coulon, Olivier Celhay, Jacques Irani, Olivier Cussenot, Gaelle Fromont. (2009). « Differential Expression of the Semaphorin 3A Pathway in Prostatic Cancer ». *Histopathology* 55 (4): 392-98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2009.03406.x>.

Yao, Jorge L., Ralph Madeb, Patricia Bourne, Junyi Lei, Ximing Yang, Satish Tickoo, Zhengzhi Liu, et al. (2006). « Small Cell Carcinoma of the Prostate: An Immunohistochemical Study ». *The American Journal of Surgical Pathology* 30 (6): 705-12. <https://doi.org/10.1097/00000478-200606000-00005>.

Yamashiro, S., Y. Yamakita, S. Ono, et F. Matsumura. (1998). « Fascin, an Actin-Bundling Protein, Induces Membrane Protrusions and Increases Cell Motility of Epithelial Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 9 (5): 993-1006. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.5.993>.

Yap, Timothy A., Jane N. Winter, Lisa Giulino-Roth, Jemma Longley, Juanita Lopez, Jean-Marie Michot, John P. Leonard, et al. (2019). « Phase I Study of the Novel Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Inhibitor GSK2816126 in Patients with Advanced Hematologic and Solid Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25 (24): 7331-39. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4121>.

Yasumizu, Yota, Hasan Rajabi, Caining Jin, Tsuyoshi Hata, Sean Pitroda, Mark D. Long, Masayuki Hagiwara, et al. (2020). « MUC1-C Regulates Lineage Plasticity Driving Progression to Neuroendocrine Prostate Cancer ». *Nature Communications* 11 (1): 338. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14219-6>.

Yokoyama, Noriko N., Shujuan Shao, Bang H. Hoang, Dan Mercola, Xiaolin Zi. (2014). « Wnt Signaling in Castration-Resistant Prostate Cancer: Implications for Therapy ». *American Journal of Clinical and Experimental Urology* 2 (1): 27-44.

Yu, W., J. Hurley, D. Roberts, S. Chakraborty, D. Enderle, M. Noerholm, X. O. Breakefield, et al. (2021). « Exosome-Based Liquid Biopsies in Cancer: Opportunities and Challenges ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.01.074>.

Yuan, Ta-Chun, Suresh Veeramani, Fen-Fen Lin, Dmitry Kondrikou, Stanislav Zelivianski, Tsukasa Igawa, Dev Karan, Surinder et al. (2006). « Androgen Deprivation Induces Human Prostate Epithelial Neuroendocrine Differentiation of Androgen-Sensitive LNCaP Cells ». *Endocrine-Related Cancer* 13 (1): 151-67. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01043>.

Yuan, Ta-Chun, Suresh Veeramani, et Ming-Fong Lin. (2007). « Neuroendocrine-like Prostate Cancer Cells: Neuroendocrine Transdifferentiation of Prostate Adenocarcinoma Cells ». *Endocrine-Related Cancer* 14 (3): 531-47. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0061>.

Zhang, Fa-Ren, Li-Hua Tao, Zhong-Ying Shen, Zhuo Lv, Li-Yan Xu, En-Min Li. (2008). « Fascin Expression in Human Embryonic, Fetal, and Normal Adult Tissue ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 56 (2): 193-99. <https://doi.org/10.1369/jhc.7A7353.2007>.

Zhang, Yan, Dayong Zheng, Ting Zhou, Haiping Song, Mohit Hulsurkar, Ning Su, Ying Liu, et al. (2018). « Androgen Deprivation Promotes Neuroendocrine Differentiation and Angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 Pathway in Prostate Cancers ». *Nature Communications* 9 (1): 4080. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06177-2>.

Zhao, Xiao-Yan, Peter J. Malloy, Aruna V. Krishnan, Srilatha Swami, Nora M. Navone, Donna M. Peehl, David Feldman. (2000). « Glucocorticoids Can Promote Androgen-Independent Growth of Prostate Cancer Cells through a Mutated Androgen Receptor ». *Nature Medicine* 6 (6): 703-6. <https://doi.org/10.1038/76287>.

Zou, Min, Roxanne Toivanen, Antonina Mitrofanova, Nicolas Floch, Sheida Hayati, Yanping Sun, Clémentine Le Magnen, et al. (2017). « Transdifferentiation as a Mechanism of Treatment Resistance in a Mouse Model of Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Cancer Discovery* 7 (7): 736-49. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1174>.