UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

INSERM UMR 1069 « Nutrition, Croissance et Cancer »

THÈSE présentée par :

Fanny BERY

soutenue le : **06 juillet 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Rôle de la signalisation calcique et de la transition épithélio-mésenchymateuse dans l'agressivité et la différenciation neuroendocrine du cancer de la prostate

THÈSE dirigée par :

Mme. FROMONT Gaëlle	PU-PH, Université de Tours
Mme. MAHEO Karine	PU, Université de Tours

RAPPORTEURS :

M. POURQUIER Philippe	DR INSERM, Université de Montpellier
M. VERRECCHIA Franck	DR INSERM, Université de Nantes

PRESIDENT DU JURY :

M. BRUYERE Franck	PU-PH, Université de Tours

JURY :

M. BRUYERE Franck	PU-PH, Université de Tours
Mme. FROMONT Gaëlle	PU-PH, Université de Tours
M. GOFFIN Vincent	DR INSERM, Université de Paris
Mme. HOUEDE Nadine	PU-PH, Université de Montpellier
Mme. MAHEO Karine	PU, Université de Tours
M. POURQUIER Philippe	DR INSERM, Université de Montpellier
M. VERRECCHIA Franck	DR INSERM, Université de Nantes

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie ainsi les directeurs de recherche Philippe Pourquier et Franck Verrecchia d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit ainsi que le professeur Franck Bruyère, la professeure Nadine Houede et le directeur de recherche Vincent Goffin pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je remercie le professeur Christophe Vandier, directeur de l'UMR 1069 Nutrition Croissance et Cancer pour m'avoir permis de réaliser mes stages de Master ainsi que ma thèse universitaire au sein du laboratoire.

Je souhaite remercier tout particulièrement mes deux directrices de thèse, les professeures Karine Mahéo et Gaëlle Fromont. Je vous remercie de m'avoir prise en tant que stagiaire puis de m'avoir fait confiance pour la poursuite en thèse. Votre encadrement de qualité m'a permis de réaliser ma thèse sereinement, dans de bonnes conditions et de m'investir pleinement dans cette thèse pour former avec vous une réelle équipe de travail. Cette co-direction m'a permis d'allier recherche fondamentale et recherche clinique, ce qui pour moi donne tout son sens à mes travaux. Merci pour tout le temps que vous m'avez consacré, pour nos nombreuses réunions, pour l'écriture des papiers et pour la relecture de ce manuscrit. Travailler avec vous deux, a été un réel plaisir, je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie le service d'Urologie et le service d'Anatomie et cytologie pathologiques du CHRU Bretonneau de Tours, qui ont permis d'enrichir mes travaux avec la recherche clinique.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire N2C pour toutes ces années passées avec vous. Merci Isa pour toute l'aide technique que tu m'as apporté depuis mon stage de Master 1 mais également pour tous nos moments passés chacune sous notre hotte, fidèles au poste ! Nous avons beaucoup de chance de t'avoir parmi nous au laboratoire, tu es d'une aide précieuse. Roseline je te remercie pour ta bonne humeur, et pour tout le travail d'IH que tu as pu faire pour mes travaux et bien évidemment pour les nombreuses coupes de prostate dont toi seule as le secret ! Merci Orl pour avoir participé aux manipes de ma thèse, pour ton aide technique et tes conseils et merci d'avoir participé avec moi à l'organisation des réunions du labo. Merci Maxime de m'avoir apporté ton expérience sur certaines techniques où j'étais novice, pour tes conseils et ton humour bien à toi. Merci Christophe d'avoir partagé ton bureau

avec moi, merci pour tes conseils et discussions scientifiques. Marie, je te remercie de m'avoir fait confiance pour enseigner des TP deux années de suite avec toi, c'était une expérience géniale dont je garde un très bon souvenir. Merci Aude, tu es toujours prête à aider quand on a besoin, et ça fait plaisir ! Catherine, je te remercie pour tout ton travail administratif. Grâce à toi, j'ai toujours pu commander rapidement mes produits et ainsi faire avancer le projet. Je remercie également tous les autres membres du labo qui ont participé de près ou de loin à ce projet : Caro, Günther, Philippe, Pierre, Stéphane, Jean-François, William, Cyrille, Lucie, Dorine, Michelle, Fabio, Violetta et Aurore. Je tiens à remercier les thésards du labo Alison, Olivier et Marion pour nos discussions et moments partagés. Profitez bien de cette expérience pro et je vous souhaite le meilleur pour la suite ! Une pensée particulière pour toi Nastaran qui soutiens ta thèse à quelques semaines d'intervalle avec moi, bon courage c'est la dernière ligne droite !

Je remercie également d'anciennes doctorantes du labo Delphine et Sana, pour vos conseils et votre aide du début de thèse. Sandy, je te remercie particulièrement pour m'avoir formé sur toutes les techniques du labo, pour m'avoir permis de participer à tes travaux de thèse et pour ton aide précieuse.

Je remercie également l'équipe du laboratoire STIM de Tours, notamment la professeure Véronique Maupoil pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour toutes mes expériences au macroscope. Merci à François Gannier et Côme Pasqualin qui ont fourni un gros travail technique pour adapter et faciliter les acquisitions au macrocope. Un grand merci Côme pour ta disponibilité et ta gentillesse.

Je remercie le professeur Paul Buchanan pour nous avoir accueillies avec Delphine au sein de la Dublin City University. C'était très enrichissant de découvrir un autre laboratoire et qui plus est à l'étranger. Debby je te remercie tout particulièrement pour ton accueil, ta bonne humeur et toutes nos discussions.

Je remercie tous les stagiaires que j'ai pu encadrer : Agathe, Flora, Guillaume, Antoine et Leelou. C'était un plaisir de vous faire découvrir le monde de la recherche !

A tous mes amis, un grand merci d'être tout simplement là pour moi.

Merci Céline, tu as toujours été présente pour m'aider quand tu étais au labo avec moi et tu continues à le faire même à distance depuis Poitiers ! Que ce soit un calcul, un produit, un logiciel, une orthographe tu sais toujours me dépanner ! Merci aussi pour tous nos moments partagés ensemble, nos commentaires audiovisuels (ahah) et ton soutien. Je te souhaite vraiment

le meilleur pour ta thèse, beaucoup de réussite, tu le mérites ! J'ai évidemment une pensée pour toi Justine, une super rencontre au labo qui continue en dehors. Merci d'avoir pris régulièrement des nouvelles pour l'avancée de ma thèse etc, maintenant je vais être plus dispo, promis !

Merci Mamour d'être présente pour moi, même de loin depuis toutes ces années. On peut être fières de nos parcours respectifs, c'est pas dégueu !

A ma bande de Croût's. Merci mon Quent d'être là depuis tant d'années et de suivre mon parcours. Ça y est tu vas pouvoir m'appeler « Docteur Bery » pour de vrai, comme tu aimes tant le faire ! Merci Nico, notre Crout bègue, de continuer d'être présent depuis nos années lycée. Merci Adamo, sans qui nos retrouvailles n'auraient aucun charme, tu nous feras éternellement rire, ne change rien !

A notre quatuor légendaire EFMJ. Merci les filles pour votre fidèle amitié depuis plus de 20 ans maintenant. L'intello de la bande a atteint son objectif, ça y est ! Merci pour votre soutien sans faille et pour tous les moments passés ensemble qui m'ont permis de m'évader durant cette thèse. Même si tout ce manuscrit vous paraît être du chinois, vous savez à quel point c'est important pour moi.

A ma famille, sans qui tout ça n'aurait pas été possible.

Merci à ma belle famille d'avoir toujours été présente. Je vous remercie pour tous les bons moments que nous passons ensemble, merci pour votre soutien et votre bienveillance.

Hilou et Gui, merci d'être là pour moi, la fratrie c'est sacré ! Ce manuscrit va vous paraître extrêmement long et incompréhensible mais vous serez fiers de moi pour autant, je le sais. Une pensée à mon Marcussi et ma Cloclo qui illuminent à chaque fois nos retrouvailles !

Merci à vous papa et maman de m'avoir permis de réaliser tout ce chemin. Vous m'avez toujours fait confiance et vous m'avez donné la force d'atteindre mes objectifs. Merci pour tout ce que vous faites pour moi et pour tous les précieux moments que nous passons ensemble. Vous êtes mon socle, vous le savez, la famille c'est le plus important. J'espère que cet accomplissement vous rendra fiers. Maintenant, au suivant ! Promis, c'est bientôt fini.

Enfin merci à toi Guillaume d'être à mes côtés depuis bientôt 10 ans. Merci d'être toujours présent pour moi, de m'encourager dans mes projets et d'être également là dans les moments difficiles. Sans toi (et notre Pand' aha), je n'aurai définitivement pas réussi tout ça. Cet objectif personnel est atteint, maintenant place à nos objectifs à deux !

Avant propos

Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la direction du Pr. Karine Mahéo et du Pr. Gaëlle Fromont au sein du laboratoire INSERM UMR 1069 Nutrition Croissance et Cancer dirigé par le Pr. Christophe Vandier et le Pr. Gaëlle Fromont. Cette thèse a été réalisée en collaboration avec le service d'Anatomie et cytologie pathologiques sous la direction du Pr. Gaëlle Fromont et du service d'Urologie dirigé par le Pr. Franck Bruyère du CHRU de Tours. Ce projet a été financé par l'Université de Tours, la Ligue contre le Cancer et le Cancéropôle Grand-Ouest.

Mes travaux de thèse ont donné lieu à 3 publications :

Bery, F.; Figiel, S.*; Kouba, S.; Fontaine, D.; Guéguinou, M.; Potier-Cartereau, M.; Vandier, C.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Fromont, G*. and Maheo, K*. Hypoxia Promotes Prostate Cancer Aggressiveness by Upregulating EMT-Activator Zeb1 and SK3 Channel Expression. Int J Mol Sci* ***2020****, 21, doi:10.3390/ijms21134786.*

Bery, F.; Cancel, M.; Chantôme, A.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Rozet, F.; Mahéo, K. and Fromont, G*. The Calcium-Sensing Receptor Is A Marker and Potential Driver of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. Cancers (Basel)* ***2020****, 12, doi:10.3390/cancers12040860.*

Bery, F.; Cancel, M.*; Gueguinou, M.; Vandier C.; Potier-Cartereau, M.; Chantome A.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Fromont, G.* and Mahéo, K.* Zeb1 and SK3 channel are up-regulated in castration-resistant prostate cancer and promote neuroendocrine differentiation (En cours de rédaction).*

Mes stages du Master 1 et Master 2 réalisés au laboratoire Nutrition Croissance et Cancer, sous la direction des professeures Karine Mahéo et Gaëlle Fromont, m'ont permis d'être co-auteure de 2 publications :

Figiel, S.; Bery, F.; Chantôme, A.; Fontaine, D.; Pasqualin, C.; Maupoil, V.; Domingo, I.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Potier-Cartereau, M.; Vandier, C.; Fromont, G. and Maheo, K.* A Novel Calcium-Mediated EMT Pathway Controlled by Lipids: An Opportunity for Prostate Cancer Adjuvant Therapy. Cancers (Basel)* ***2019****, 11, doi:10.3390/cancers11111814.*

Figiel, S.; Pasqualin, C.; Bery, F.; Maupoil, V.; Vandier, C.; Potier-Cartereau, M.; Domingo, I.; Guibon, R.; Bruyere, F.; Maheo, K. and Fromont, G.* Functional Organotypic Cultures of Prostate Tissues. The American Journal of Pathology* ***2019****, 189, 1268–1275, doi:10.1016/j.ajpath.2019.02.017.*

Communications orales

Bery, F*.; Figiel, S.; Guibon, R.; Vandier, C.; Fromont, G.* et Mahéo, K.* Cartographie du signal calcique sur des explants prostatiques. Journée recherche Faculté de Pharmacie, Tours, 2019.*

Figiel, S.; ***Bery, F.;*** *Chantôme, A.; Fontaine, D.; Pasqualin, C.; Maupoil, V.; Domingo, I.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Potier-Cartereau, M.; Vandier, C.; Fromont, G.* and Maheo, K.* Novel calcium-mediated EMT pathway controlled by lipids: an opportunity for prostate cancer adjuvant therapy. School of Nursing Psychotherapy and community health, Dublin, 2019.*

Figiel, S.; ***Bery, F.;*** *Chantôme, A.; Fontaine, D.; Pasqualin, C.; Maupoil, V.; Domingo, I.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Potier-Cartereau, M.; Vandier, C.; Fromont, G.* and Maheo, K.* Novel calcium-mediated EMT pathway controlled by lipids: an opportunity for prostate cancer adjuvant therapy. EAU Section of Uropathology (ESUP), Porto, 2019.*

Figiel, S.; ***Bery, F.;*** *Chantôme, A.; Fontaine, D.; Pasqualin, C.; Maupoil, V.; Domingo, I.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Potier-Cartereau, M.; Vandier, C.; Fromont, G.* et Maheo, K.* Nouvelle voie de l'EMT médiée par le calcium et contrôlée par les lipides: une opportunité pour les traitements adjuvants du cancer de la prostate. Journée cancéropôle Lipides et signalisation calcique, Tours, 2019.*

Communications affichées

Bery, F.; *Vandier, C.; Guibon, R.; Fromont, G.* and Maheo, K*. Effet du blocage du récepteur aux androgènes sur l'homéostasie calcique et ses conséquences sur la transition épithélio-mésenchymateuse et la transdifférenciation neuroendocrine dans le cancer de la prostate. Journée Cancéropôle Grand Ouest, Angers, 2020.*

Bery, F.; *Chantôme, A.; Guibon, R.; Vandier, C.; Fromont, G.* and Maheo, K*. Etude de l'homéostasie calcique dans la transdifférenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques. Journée de la Recherche Biomédicale, Tours, 2019.*

Bery, F.; *Figiel, S.; Chantôme A.; GuibonR.; Domingo, I.; Vandier, C.; Fromont, G.* and Maheo, K*. Effet d'une déprivation androgénique sur l'homéostasie calcique et ses conséquences sur la transition épithélio mésenchymateuse et la neurodifférenciation dans le cancer de la prostate. Journée Cancéropôle Grand Ouest, Tours, 2019.*

Encadrement et enseignement :

Durant ces trois années de thèse, j'ai eu l'occasion d'encadrer plusieurs étudiants : Antoine Pétusseau (Stade de recherche 4ème année de Pharmacie), Guillaume David (Stage M1 recherche 4ème année de Pharmacie), Flora Courant (Master 1 Biologie-Santé), Agathe Dubuissert (Stage de recherche 2ème année de pharmacie) et Leelou Coquereau (Stage Master 2 Recherche).

J'ai également eu l'opportunité d'enseigner des travaux pratiques de Physiologie animale aux étudiants en 3ème année de Licence à la Faculté des Sciences et Techniques de Tours.

Résumé

Les possibilités thérapeutiques pour les cancers prostatiques (CaP) métastatiques restent limitées, avec l'émergence de résistances aux traitements. Le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) participe à l'agressivité des cellules tumorales et peut être induit par des facteurs du microenvironnement dont l'hypoxie. L'hypoxie tumorale participe à la sélection de clones cellulaires impliqués dans l'agressivité tumorale et la résistance aux traitements. Nous avons montré que l'hypoxie est capable d'induire l'expression de Zeb1, facteur clé de la TEM impliqué dans la progression tumorale. Cette induction est dépendante d'une entrée calcique impliquant SK3, canal potassique sensible au calcium. L'acide linoléique (AL) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA), deux acides gras (AG) inversement corrélés à l'agressivité du CaP, sont capables d'inhiber cette voie de signalisation en s'incorporant dans les membranes. L'application thérapeutique de ces lipides d'intérêt pourrait réduire l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques.

Face aux traitements anti-androgéniques, les cellules tumorales développent des mécanismes de résistance, conduisant à l'apparition de CaP résistants à la castration (CRPC) dont 10 à 20% vont acquérir un phénotype neuroendocrine (NE), associé à un très mauvais pronostic. Le récepteur sensible au calcium (CaSR) est associé à un risque accru de mortalité du CaP et participerait à l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques. Nous avons montré que l'expression du CaSR augmente selon les stades évolutifs du CaP et est corrélée à l'expression du marqueur NE chromogranine A (CgA). Chez les patients atteints d'un CaP NE, le CaSR et la CgA sont co-exprimés. De plus, le CaSR est associé à une diminution du taux de survie dans les CRPC métastatiques. Nos expérimentations *in vitro* montrent que l'inhibition du CaSR diminue l'expression des marqueurs NE et à l'inverse, son activation favorise l'expression de ces marqueurs. Le CaSR est donc un marqueur et un promoteur de la différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques.

Les thérapies ciblant le récepteur aux androgènes (RA) sont capables d'induire des réponses adaptatives telles que la TEM et la différenciation NE. Nous avons voulu déterminer si une dérégulation de l'homéostasie calcique pouvait être impliquée dans ces phénomènes. Nous avons étudié *in vivo* l'expression de Zeb1 et SK3 dans des cancers cliniquement localisés (CLC) et des CRPC de phénotype adénocarcinome (adéno) et NE. L'expression de Zeb1 et SK3 est augmentée dans les CRPC (adéno et NE) par rapport aux CLC. Nous avons également observé un switch d'expression entre les canaux calciques Orai1 et Orai2 dans les CRPC. Nous

avons ensuite étudié *in vitro* l'effet de l'Enzalutamide (Enza), une hormonothérapie de seconde génération préconisée en clinique pour les CRPC métastatiques. L'Enza augmente considérablement l'expression de Zeb1 et SK3 et favorise la différenciation NE des cellules LNCaP, avec l'apparition de neurites et l'induction des marqueurs NE NSE (neuron specific enolase) et synaptophysine (Syp). Nous avons également montré que l'Ohmline, inhibiteur spécifique du canal SK3, est capable de prévenir l'induction des marqueurs NE (*in vitro*) et de Zeb1 (*in vitro et ex vivo*) par l'Enza. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives pour améliorer l'efficacité des traitements hormonaux du CaP.

Liste des abréviations

Adéno : Adénocarcinome
ADN : Acide désoxyribonucléique
AG : Acide gras
AGPI: Acide gras polyinsaturé
AJCC : Americain Joint Comittee of Cancer
AL : Acide linoléïque
AM : Acétoxyméthyl ester
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARA : Androgen receptor associated protein
ARC : Arachidonate-regulated calcium
ARE : Androgen response element
ATPase : Adénosine triphosphatase
BAC : Blocage androgénique complet
BMP : Bone morphogenetic protein
CAIX : Carbonic anhydrase IX
CAMKII : Kinase calcium/calmoduline dépendante II
CaP : Cancer de la prostate
CaSR : Récepteur sensible au calcium
CgA : Chromogranine A
CHMR3 : Récepteur cholinergique muscarinique 3
CLC : Cancer cliniquement localisé
CRAC : Calcium release-activated calcium channel
CREB : c-AMP Response Element Binding protein
CRH-ACTH : Corticotropin releasing hormone - Adreno cortico tropic hormone
CRPC : Cancer de la prostate résistant à la castration
Ct : Threshold cycle
CYP17 : 17alpha-hydroxylase/C17,20-lyase
DAG : Diacylglycérol
DHA : Acide docosahexaénoïque
DHEA : Déhydroépiandrostérone
DHT : Dihydrotestostérone
EGF : Epithelial growth factor
EPA : Acide écosapentaénoïque
Enza : Enzalutamide
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
ESRP : Epithelial splicing regulatory protein 1
EZH-2 : Enhancer of zeste homologue 2
FSH : Hormone folliculo-stimulante
GTPase : Guanosine triphophatase
HAT: Histone acétyltransférase
HER-2 : Human epidermal growth factor receptor-2
HIF1-α : Hypoxia inducible factor-1α
HRE : Hypoxia response element

HSP : Heat shock protein
IGF : Insulin-like growth factor-1
IGFBP : Insulin-like growth factor-1 binding protein
IL-6 : Interleukine-6
IP3 : Inositol triphosphate
ISUP : International Society of Urological Pathology
JNK : Jun N-terminal kinase
KGF : Keratinocyte growth factor
LH : Hormone lutéinisante
LHRH : Luteinizing hormone releasing hormone
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MARVEL : Mal and related protein for vesicle trafficking and membrane link
MCRPC : Cancer de la prostate résistant à la castration métastatique
MDR1 : Multidrug resistance 1
MEC : Matrice extracellulaire
MMP : Métallo protéinase matricielle
NE : Neuroendocrine
NEPC : Cancer de la prostate neuroendocrine
NFAT : Nuclear factor of activated T-cells
NFkB: Nuclear factor-kappa B
NK : Natural killer
NLS : Nuclear signalisation sequence
NSE : Neuron specific enolase
PBS : Phosphate-buffered saline
PgP : Glycoprotéine P
PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase
PIN : Néoplasies intra-épithéliales prostatiques
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA : Protéine kinase A
PLC : Phospholipase C
PMCA : Plasma membrane calcium ATPase
PSA : Antigène spécifique de la prostate
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTH : Hormone para-thyroïdienne
pVHL : Von Hippel–Lindau protein
qPCR : Quantitative polymerase chain reaction
RA : Récepteur aux androgènes
REST : Repressor element-1 silencing transcription factor
RBP : Retinol binding protein
RISC : RNA-induced silencing complex
RT : Reverse transcription
SERCA : sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase
SHBGR : Sex hormone-binding globulin
SICE : Store independent calcium entry
SNP : Single nucleotide polymorphism
SOAR : STIM1 Orai1-activating region

SOCE : Store operated calcium entry
SPCA2: Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase 2
SPDEF : SAM pointed domain containing ETS transcription factor
SRC-1 : Steroid receptor coactivator-1
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
STIM : Stromal intereraction molecule
Syp : Synaptophysine
TAM : Tumor associated macrophage
TAPP: Tissu adipeux péri-prostatique
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TIF-2 : Transcriptional intermediary factor-2
TGFβ : Tumor growth factor β
TM : Transmembranaire
TMA : Tissue microarray
TNF-α : Tumor necrosis factor-α
TNM : Tumor Node Metastasis
TRP : Transient receptor potential
TRPC : TRP canonique
TRPM : TRP mélastatine
TRPV : TRP vanilloïde
UTR : Untranslated region
VEGF : Vascular endothelial growth factor
Zeb : Zinc finger E-box-binding homeobox

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de l'appareil génital masculin 20
Figure 2 : Structure moléculaire du gène codant pour la protéine du RA (Schreyer et al., 2017). 22
Figure 3 : Schéma des principaux domaines fonctionnels de la protéine du RA (Quigley et al., 2017). 22
Figure 4 : Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN du RA (Tsai et O'Malley, 1994). 23
Figure 5 : Voies de signalisation génomique et non génomique du RA (Liao et al., 2013). 26
Figure 6 : Représentation schématique des différents grades de Gleason en accord avec l'ISUP (Extrait et modifié à partir de Humphrey, 2017 et Epstein et al., 2016). 31
Figure 7 : Stades évolutifs du CaP. 33
Figure 8 : Schématisation du mode d'action de l'enza (Extrait et modifié à partir de Poujol et Sultan, 2000). 36
Figure 9 : Les cellules du microenvironnement prostatique (Extrait et modifié à partir de Hanahan & Weinberg, 2011). 37
Figure 10 : Echanges entre les cellules cancéreuses et les adipocytes du tissu adipeux. (Laurent et al., 2014). 39
Figure 11 : Schéma de biosynthèse des AG. (Brignole et al., 2009). 41
Figure 12 : Mécanismes de résistance dépendants du RA observés dans les CRPC. 48
Figure 13 : Représentation schématique des différents types cellulaires de la glande prostatique. (Adapté à partir de Hannsson et Abrahamsson, 2001). 51
Figure 14 : Voie de biosynthèse de la CgA dans les cellules NE. 53
Figure 15 : Représentation schématique de la structure tertiaire de la Syp (Valtorta et al., 2004). 54
Figure 16 : Représentation schématique du mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse. 60
Figure 17 : Implication de la TEM dans le processus tumoral 61
Figure 18 : Représentation schématique de la structure des facteurs de transcription ZEB1 et ZEB2 (Modifié à partir de Ellis et al., 2010). 63
Figure 19 : Structure des facteurs de transcription SNAIL 1 et SNAIL 2 (Peinado et al., 2007). 65
Figure 20 : Structure des facteurs de transcription TWIST 1 et TWIST 2 (Puisieux et al., 2006). 66
Figure 21 : Représentation schématique du mode d'action des miARN 67
Figure 22 : Voie de signalisation canonique du TGFβ (Massagué et al., 2006). 70
Figure 23 : Dégradation du facteur HIF1-α en normoxie et mécanisme d'action d'HIF-1α sous hypoxie (Vito et al., 2020). 72
Figure 24 : Effet des thérapies de déprivation androgénique sur le phénotype des cellules du CaP. 75
Figure 25 : Rétro-boucle négative entre le RA et le facteur de transcription ZEB1 (Sun et al., 2012). 76
Figure 26 : Représentation schématique de l'influx SOCE 79
Figure 27 : Schéma de l'influx ARC médié par Orai1/Orai3 (Thèse de M. Guéguinou). 80
Figure 28 : Structure des protéines Orai (Frischauf et al., 2008). 82
Figure 29 : Structure des protéines STIM (Williams et al., 2001). 83
Figure 30 : Structure des canaux TRP (Guéguinou et al., 2014). 84
Figure 31 : Structure du CaSR (Liu et al., 2018). 85
Figure 32 : Différentes voies de signalisation médiées par le CaSR. 87
Figure 33 : Rôle du CaSR dans la régulation de la calcémie 88
Figure 34 : Structure du canal SK3 (Girault et al., 2012). 90
Figure 35 : Mécanisme d'action de l'Ohmline (Chantôme et al., 2013). 91
Figure 36 : Voie de signalisation impliquant la rétro boucle positive Zeb1/SK3 dans la migration des cellules cancéreuses prostatiques (Figiel et al., 2019). 92
Figure 37 : Les canaux calciques impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques (Déliot et Constantin, 2015). 94
Figure 38 : Les canaux calciques impliqués dans la régulation de la migration des cellules cancéreuses prostatiques (Déliot et Constantin, 2015). 95
Figure 39 : A : Implication du complexe canalaire Orai1/SK3 dans la migration des cellules cancéreuses mammaires. B : Implication du canal SK3 dans la formation de métastases (Chantôme et al., 2013). 96

Figure 40 : Mécanisme de résistance à l'apoptose calcium dépendants dans les cellules cancéreuses prostatiques (Ardura et al., 2020). 97
Figure 41 : Protocole de mesure de l'entrée SOCE. 148
Figure 42 : Protocole de mesure de l'entrée constitutive de calcium. 149
Figure 43 : Procédure pour la réalisation des cultures organotypiques. 150
Figure 44 : Structure du plasmide (pGL4.17-KCNN3) utilisé pour l'étude du promoteur KCNN3. 153
Figure 45 : Les réactions de bioluminescence catalysées par la luciférase Firefly et la luciférase Renilla (Promega). 154
Figure 46 : Images représentatives du marquage immunohistochimique des protéines Zeb1, SK3, Orai1 et Orai2 dans des tissus prostatiques cancéreux humain. 158
Figure 47 : L'inhibition du RA induit la différenciation NE des LNCaP. 160
Figure 48 : La différenciation NE induite par l'enza dépend du facteur de transcription clé de la TEM, Zeb1. 162
Figure 49 : L'inhibition du RA dérégule la signalisation calcique. 164
Figure 50 : La différenciation NE induite par l'enza dépend du canal SK3 166
Figure 51 : Effet de l'Enza sur l'expression de Zeb1, SK3 et NSE dans les C4-2 et C4-2B. 168
Figure 52 : L'Omhline n'est pas capable d'inhiber l'expression des marqueurs NE lorsque les cellules sont à un stade avancé de la neurodifférenciation. 168
Figure 53 : La surexpression de Zeb1 augmente l'activité du promoteur du gène KCNN3 169
Figure 54 : Effet de l'Enza sur la migration des LNCaP. 169
Figure 55 : Effet de l'Enza sur l'expression du CaSR dans les LNCaP. 170
Figure 56 : Réprésentation schématique de la voie Zeb1/SK3 qui participe à l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques (Extrait et modifié à partir de Figiel et al. 2019). 183
Figure 57 : Schéma hypothétique de régulation de la différenciation NE par la voie Zeb1/SK3. 184

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification TNM (Extrait de Rozet et al., 2020). 30
Tableau 2 : Classification pathologique pTNM (Extrait de Rozet et al., 2020). 30
Tableau 3 : Classification ISUP en fonction du score de Gleason (Extrait de Rozet et al., 2020). 32
Tableau 4 : Séquences nucléotidiques des amorces pour la quantification des transcrits. 146
Tableau 5 : Séquences des siARN utilisés. 147
Tableau 6 : Composition de la solution saline physiologique. 149
Tableau 7 : Caractéristiques des patients et tissus. 152
Tableau 8 : Expression de Zeb1, SK3, Orai1 et Orai2 dans les tissus prostatiques. 159

Table des matières

Remerciements 1
Avant propos 4
Résumé 7
Liste des abréviations 9
Liste des figures 12
Liste des tableaux 14
Table des matières 15
Introduction 19
I. La prostate 20
1. Physiologie de la prostate normale 20
1.1 Anatomie et fonction de la prostate 20
1.2 Mécanismes de régulation hormonale de la prostate 21
a Synthèse des androgènes 21
b Régulation des androgènes 21
c Le récepteur aux androgènes 21
i Structure 21
ii Mécanismes d'action : 23
2. Physiopathologie du CaP 26
2.1 Les facteurs de risque 27
a L'âge 27
b Les antécédents familiaux 27
c L'origine ethno-géographique 27
d L'alimentation 28
2.2 Diagnostic 28
a Le toucher rectal 28
b Le dosage du PSA 29
c La biopsie 29
2.3 Classification 29
a La classification Tumeurs, Ganglions lymphatiques, Métastases (TNM) 29
b Le score ISUP 31
c La classification d'Amico 32
2.4 Histoire naturelle du CaP 32

a Néoplasie intra-épithéliale prostatique (PIN) 32
b Les CaP cliniquement localisés et localement avancés 32
c Les CaP métastatiques 33
d Les CaP résistants à la castration (CRPC) 33
e Les CaP neuroendocrines (NE) 33
2.5 Traitements du CaP 34
a Surveillance active 34
b Prostatectomie radicale 34
c Radiothérapie (RT) 34
d L'hormonothérapie 34
i Hormonothérapie de première génération 35
ii Hormonothérapie de seconde génération 35
e La chimiothérapie 36
II. Rôle du microenvironnement adipeux dans la progression du CaP 37
1. Le tissu adipeux péri-prostatique (TAPP) 38
2. Les acides gras (AG) 39
2.1 Classification des AG 39
2.2 Nomenclature des AG 40
2.3 Biosynthèse des AG 40
2.4 Source alimentaire d'AG 41
3. AG et CaP 42
III. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'échappement hormonal 43
1. Mécanismes liés au RA : ligand dépendant 43
1.1 Mutations du RA 43
1.2 Hypersensibilité du RA 44
1.3 Amplification du RA 44
1.4 Persistance d'une production d'androgènes 44
1.5 Co-régulateurs du RA 45
1.6 Dérégulation des protéines chaperonnes 45
2. Mécanismes liés au RA : ligand indépendant 46
2.1 Variants d'épissage du RA 46
2.2 Facteurs de croissance et cytokines 46
3. Mécanismes indépendants du RA 48
3.1 Dérégulation des voies apoptotiques 48
3.2 Voie de survie 49

4. Rôle du calcium dans l'échappement hormonal 50
5. La transdifférenciation NE du CaP 51
5.1 Caractéristiques des cellules NE dans la prostate saine 51
a Les marqueurs NE 52
i La chromogranine A (CgA) 52
ii La synaptophysine (Syp) 54
iii La Neuron Specific Enolase (NSE) 55
iv La βTubulineIII 55
5.2 Cancers prostatiques NE 56
5.3 Cellules du CaP NE et résistance aux traitements 57
5.4 Epigénétique et CaP NE 58
IV. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) 59
1. Définition et généralités 59
2. La TEM dans le processus tumoral 60
3. Les marqueurs associés à la TEM 61
4. Les facteurs de transcription de la TEM 62
4.1 Les protéines Zeb 62
4.2 Les protéines Snail 64
4.3 Les protéines Twist 66
5. Les régulations post-transcriptionnelles de la TEM 67
5.1 Les miARN 67
5.2 L'épissage alternatif 68
6. Les activateurs de la TEM 69
6.1 Le TGFβ (transforming growth factor-β) 69
6.2 L'hypoxie 71
6.3 Les androgènes 73
6.4 Le calcium 74
7. TEM et différenciation NE 75
V. La signalisation calcique 77
1. Les entrées calciques de la membrane plasmique des cellules non excitables 78
1.1 L'entrée calcique capacitive ou SOCE 78
1.2 L'entrée calcique ARC 79
1.3 L'entrée constitutive 80
2. Acteurs calciques et potassiques impliqués 81
2.1 Les canaux calciques Orai 81

2.2 Les protéines STIM 83
2.3 Les canaux TRP (Transient Receptor Potential) 84
2.4 Le CaSR 85
2.5 Le canal potassique SK3 89
3. Signalisation calcique et CaP 92
3.1 Calcium et prolifération cellulaire 93
3.2 Rôle du calcium dans la migration, l'invasion et la formation de métastases 94
3.3 Calcium et résistance à l'apoptose 96
3.4 Calcium et résistance aux traitements 97
4. Rôle du calcium dans la différenciation NE 98
Objectifs 100
Première partie : **Rôle de l'hypoxie dans l'agressivité du CaP : implication du facteur de transcription clé de la TEM, Zeb1 et du canal potassique sensible au calcium SK3** 101
Deuxième partie : **Identification d'un marqueur et inducteur du CaP neuroendocrine hautement agressif : le récepteur sensible au calcium** 118
Troisième partie : **Le facteur de transcription Zeb1 et le canal SK3, surexprimés chez les patients atteints d'un CRPC, favorisent la différenciation NE** 141
Discussion 171
Conclusions et perspectives 181
Annexes 186
Références bibliographiques 209

Introduction

I. La prostate

1. Physiologie de la prostate normale

1.1 Anatomie et fonction de la prostate

La prostate est située sous la vessie et à l'avant du rectum. Cette glande permet la sécrétion du liquide prostatique qui va transiter dans les canaux éjaculateurs puis dans l'urètre pour être stocké dans les vésicales séminales où il va se mélanger au liquide séminal pour former le sperme. Le liquide prostatique représente environ 20% du volume du sperme. Son pH alcalin contrecarre l'acidité du vagin et protège ainsi les gamètes. Il est enrichi en protéines, calcium, citrate et zinc (1). Sous l'influence des androgènes, les cellules glandulaires prostatiques vont sécréter l'antigène spécifique de la prostate (PSA) qui va participer à la fluidification du sperme nécessaire lors de l'éjaculation. De plus, le PSA participe à la formation de kinines qui augmentent la mobilité des spermatozoïdes (2).

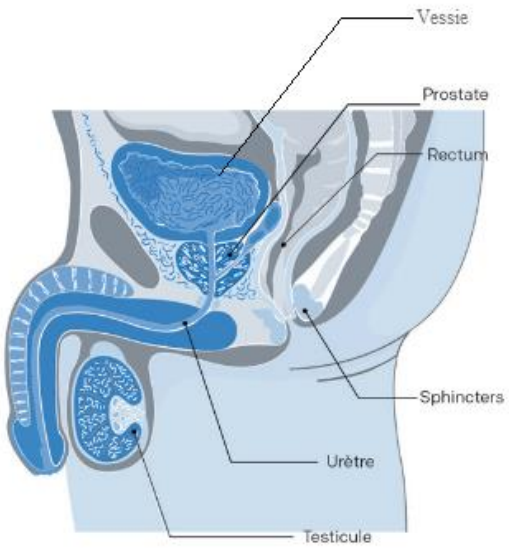


FIGURE 1 : ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL MASCULIN
La prostate est une glande de l'appareil génital masculin situé sous la vessie en avant du rectum. (Schéma extrait du site : http://www.procure.ca/cancer-de-la-prostate/role-de-la-prostate)

1.2 Mécanismes de régulation hormonale de la prostate

La croissance et le développement de la glande prostatique sont dépendants des androgènes et plus particulièrement de la testostérone.

a Synthèse des androgènes

Les androgènes sont des hormones responsables du caractère sexuel mâle, elles sont produites lors de la stéroïdogenèse. En effet, les cellules de Leydig situées dans les testicules, sécrètent le principal androgène circulant, la testostérone, à partir de cholestérol, sous la dépendance de l'hormone lutéinisante (LH) hypophysaire.

b Régulation des androgènes

Les androgènes sont principalement régulés par l'axe hypothalamo-hypophysaire (3). En effet, lorsque le taux d'androgènes diminue, l'hypothalamus sécrète l'hormone de libération de l'hormone lutéinisante (LHRH). Celle-ci va stimuler les cellules gonadotropes hypophysaires en interagissant avec son récepteur pour permettre la synthèse de la LH et de l'hormone folliculostimulante (FSH). La FSH stimule la spermatogénèse et la LH favorise la sécrétion d'androgènes par les cellules de Leydig.

Ce mécanisme de sécrétion hypothalamique est régulé, il existe une boucle complexe de rétrocontrôle négatif de cette voie de synthèse hormonale. En effet, les hormones sexuelles produites exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (4).

c Le récepteur aux androgènes

i Structure

Après leur passage transmembranaire, les stéroïdes libres peuvent atteindre le cytoplasme des cellules et se fixer à leur récepteur : le récepteur aux androgènes (RA). Le RA est exprimé largement dans l'organisme et davantage dans les organes sexuels tels que la prostate.

Le gène du RA, localisé sur le chromosome X en position q11-12, est constitué de 8 exons qui codent pour une protéine d'environ 110-114 KDa (5). Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires comprenant les récepteurs aux glucocorticoïdes, aux minéralocorticoïdes, aux œstrogènes et à la progestérone.

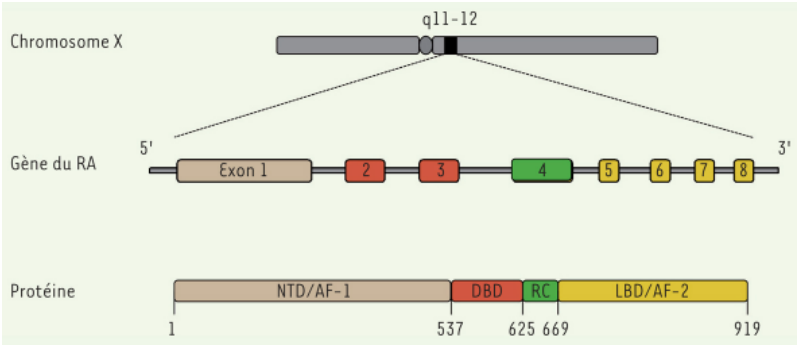


FIGURE 2 : STRUCTURE MOLECULAIRE DU GENE CODANT POUR LA PROTEINE DU RA *(SCHREYER ET AL., 2017).*



FIGURE 3 : SCHEMA DES PRINCIPAUX DOMAINES FONCTIONNELS DE LA PROTEINE DU RA *(QUIGLEY ET AL., 2017).*

Le RA comporte plusieurs domaines (6) :

- un domaine de transactivation NH2 terminal qui intervient dans la régulation de la transcription grâce au motif de transactivation AF1. De plus, son interaction avec le domaine de liaison du ligand stabilise la conformation tri-dimensionnelle du RA.
- un domaine de liaison à l'ADN caractérisé par la présence de deux motifs structuraux appelés « doigts de zinc » jouant un rôle clé dans la fonctionnalité du RA (7). Ces motifs comportent une trentaine d'acides aminés et stabilisent la conformation de la protéine par la présence d'un ou plusieurs ions zinc. Le premier motif est responsable de la reconnaissance de l'ADN cible, en effet il contient la boite-P qui est capable de se lier à la grande hélice de l'ADN. Le second motif contient la boite-D qui est l'interface de dimérisation des récepteurs nucléaires, il stabilise l'interaction ADN/récepteur (8).

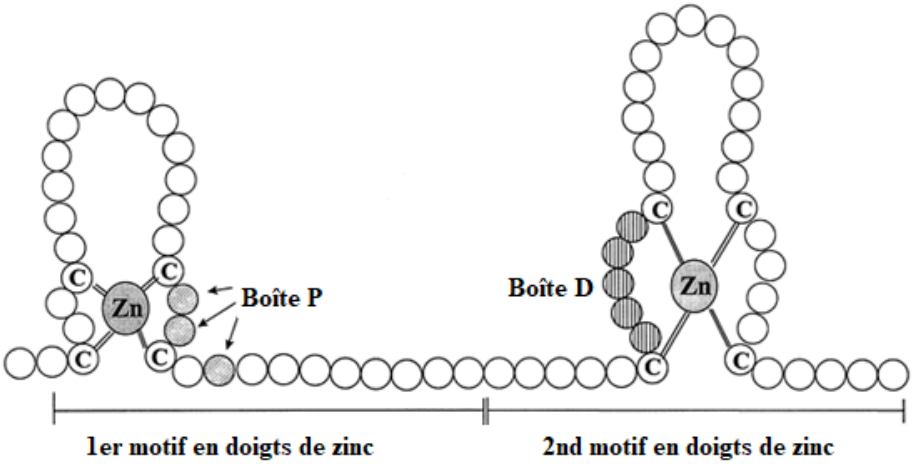


FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DOMAINE DE LIAISON A L'ADN DU RA *(TSAI ET O'MALLEY, 1994).*
Le domaine de liaison à l'ADN du RA contient deux motifs en doigts de zinc (Zn) impliqués dans la reconnaissance de l'ADN cible et la stabilisation du complexe ADN/récepteur.

- un domaine charnière qui comporte une séquence d'acides aminés indispensable pour la translocation nucléaire du RA en présence du ligand, le signal NLS (*Nuclear Localization Signal*) (9).
- un domaine de liaison au ligand COOH terminal participant à l'affinité hautement spécifique des androgènes. De plus, la région conservée de ce domaine permet le recrutement de protéines chaperonnes (telles que les protéines de choc thermique HSP70 et 90) qui maintiennent le RA en conformation inactive en l'absence de ligand. Ces protéines facilitent la fixation des androgènes au RA par la présence du motif de transactivation AF2 (10).

Ces domaines distincts interagissent entre eux. En effet, sans fixation du ligand, le domaine de transactivation est bloqué et il inhibe lui-même la fixation à l'ADN.

ii Mécanismes d'action :

- **Voie génomique :**

En absence d'hormone, le RA inactif se trouve au niveau cytoplasmique et est lié à des HSP. La testostérone libre peut pénétrer dans le cytoplasme des cellules prostatiques où elle est convertie en dihydrotestostérone (DHT) sous l'action d'une enzyme, la 5α réductase. L'affinité du RA pour son ligand dépend du taux d'androgènes circulants (11). A faible concentration d'androgènes circulants, la liaison de la DHT est favorisée.

La DHT se fixe au RA au niveau du domaine de fixation au ligand COOH terminal. Ce complexe ligand/récepteur ainsi formé, stabilise le RA et inhibe sa dégradation. En effet, la liaison du ligand entraîne la dissociation des protéines chaperonnes HSP70, le RA adopte alors une conformation active. Il est transloqué vers le noyau où il est phosphorylé et il se dimérise pour former un homodimère. Il peut alors se fixer sur le promoteur de ses gènes cibles au niveau d'élément de réponse aux androgènes, ce qui va permettre le recrutement de coactivateurs possédant une activité histone acétyltransférase (HAT). L'acétylation des histones permet l'ouverture de la chromatine propice à l'initiation de la transcription (12).

Le RA régule la transcription de gènes connus pour participer à la croissance, à la fonctionnalité et au développement prostatique. Le PSA est notamment un des gènes cibles du RA qui participe à la liquéfaction du sperme par protéolyse de certaines protéines du liquide séminal telles que la séménogéline et la fibronectine. Mais le RA régule également de nombreux gènes impliqués dans l'activation métabolique et la régulation de la communication intracellulaire, de la transduction du signal et du contrôle du cycle cellulaire (13).

- **Voie non génomique :**

Le RA peut également avoir un mode d'action dit « non génomique ». En effet, le RA cytoplasmique peut générer une action pro-prolifération très rapide et indépendante de la liaison du ligand en activant la voie de signalisation MAPK/ERK (Mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase).

Dans le CaP, il existe une corrélation positive entre la phosphorylation du RA et l'activité de la protéine tyrosine kinase Src (14). La Src peut participer à la transactivation du RA et elle peut faciliter la liaison à ses gènes cibles. En s'associant à la Src, le RA peut augmenter la prolifération cellulaire notamment par l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK (15). Il a été démontré dans les cellules cancéreuses prostatiques C4-2, que l'utilisation d'un inhibiteur de la Src inhibe le recrutement du RA sur son gène cible PSA et diminue la croissance, le potentiel invasif et induit même l'apoptose (16).

L'activation de ERK1/2 par les androgènes influence l'activité des facteurs de transcription nucléaires tels que Elk-1 indépendamment de la liaison du RA à l'ADN (17). De plus, la phosphorylation de ERK1/2 favorise la survie cellulaire en activant la protéine CREB (c-AMP Response Element Binding protein) (18). Dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP, la voie Src/MAP/ERK 1/2 / CREB est constitutivement active et seule l'utilisation

d’un inhibiteur des MAPK (PD98059) inhibe leur prolifération. Le bicalutamide, un inhibiteur du RA qui empêche sa translocation nucléaire, ne le permet pas (18).

Le RA peut également médier son action via des voies indépendantes de ERK telles que la voie PI3K/Akt (phosphatidyl-inositol 3-kinase). L’interaction directe du RA avec la PI3K activée dans le cytosol va conduire à la phosphorylation de facteurs de transcription tels que FKHR (Forkhead in rhabdomyosarcoma) et de protéines pro-apoptotiques telles que Bad, afin d’inhiber les voies d'apoptose et favoriser la survie cellulaire (15).

Le RA cytoplasmique peut également se complexer avec la protéine cytosquelettique Filamine A en recrutant l’intégrine β1. Ce complexe RA/filamineA/intégrineβ1 active la migration cellulaire (19).

La signalisation non génomique du RA peut également s’initier au niveau membranaire. En effet, le RA peut être situé dans une région bien spécifique de la membrane plasmique, au niveau de nano domaines enrichis en cholestérol encore appelés radeaux lipidiques. Ces régions sont riches en glycosphingolipides, en protéines d’ancrage avec un groupement glycosylphosphatidylinositol, et sont 4 à 5 fois plus riches en cholestérol que les autres régions de la membrane plasmique (20). Il a été montré que le RA peut directement interagir avec la cavéoline-1, composant majeure des radeaux lipidiques, qui peut alors moduler l’activation du RA (21).

De plus, les androgènes peuvent interagir avec d’autres récepteurs tels que les RCPG (G protein coupled receptors), et le SHBGR (sex hormone binding globulin receptor) pour médier respectivement la concentration calcique intracellulaire et le taux d’AMPc (cyclic adenosine monophosphate) (22). En effet, la liaison de la DHT au SHBGR permet la phosphorylation du RA et/ou de ses co-activateurs améliorant ainsi l’activité transcriptionnelle du RA (23).

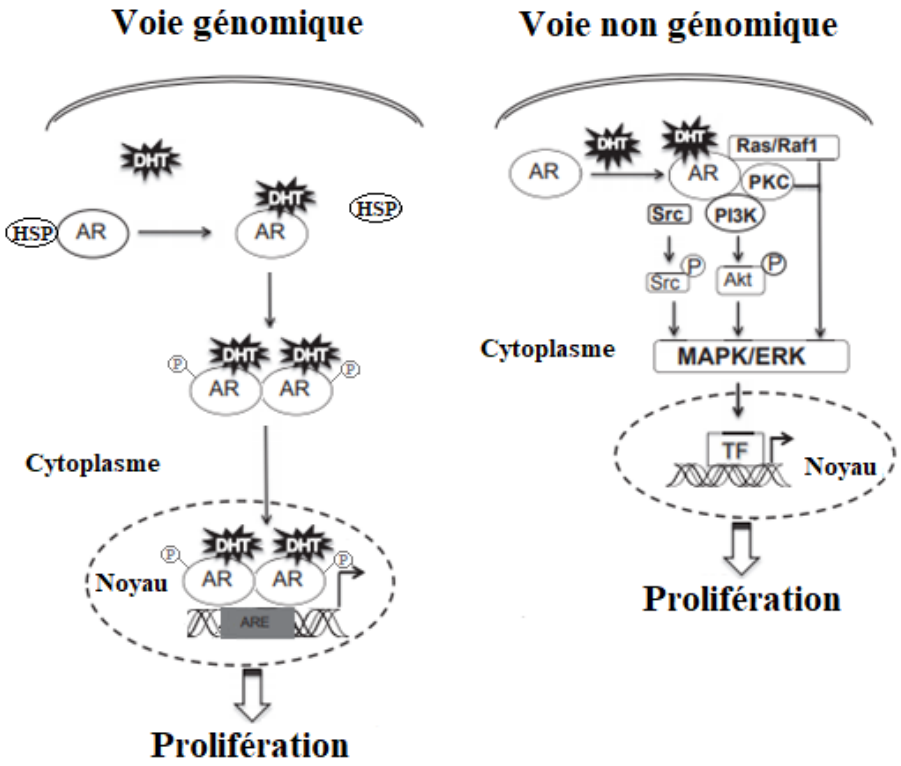


FIGURE 5 : VOIES DE SIGNALISATION GENOMIQUE ET NON GENOMIQUE DU RA *(LIAO ET AL., 2013).*
Voie génomique : la testostérone libre pénètre dans le cytosol des cellules prostatiques où elle est convertie en DHT sous l'action de la 5α-réductase. La liaison de la DHT au RA induit la dissociation des protéines de choc thermique (HSP) et la phosphorylation du récepteur. Le RA se dimérise et est transloqué au niveau nucléaire où il se fixe sur le promoteur de ses gènes cibles au niveau d'éléments de réponse aux androgènes (ARE) présents. L'activation de la transcription des gènes cibles du RA induit des réponses cellulaires telles que l'augmentation du taux de PSA, la prolifération et la survie cellulaire. Voie non génomique : Le RA cytosolique activé peut interagir avec plusieurs molécules de signalisation telles que la PI3K, Src, Raf/Raf, PKC activant la voie de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) / ERK (Extracellular-signal-Regulated Kinase) aboutissant à la prolifération cellulaire.

2. Physiopathologie du CaP

A l'échelle mondiale, le CaP est le second cancer le plus fréquent chez l'homme après le cancer du poumon et le 5ème plus meurtrier (*International Agency for Research on Cancer*).

En France, le CaP est le cancer masculin le plus fréquent, devant les cancers du côlon et du poumon, avec une incidence de 64 955 nouveaux cas en 2020.

Il s'agit du troisième cancer le plus meurtrier chez l'homme après le cancer colorectal et le cancer du poumon, avec 9002 décès en 2020 en France (*International Agency for Research on Cancer*).

2.1 Les facteurs de risque

a L'âge

L'âge est le premier facteur de risque du CaP. En effet, l'incidence du CaP et le taux de mortalité augmente avec l'âge. Rares avant 50 ans, plus de 70% des CaP sont diagnostiqués chez des hommes de 65 ans et plus.

b Les antécédents familiaux

Les formes familiales de CaP représentent environ 20% des cas et 5% sont des formes héréditaires (24). Les hommes ayant un ou plusieurs membres de leur famille du 1er degré (père, frère, fils) atteints d'un CaP ont plus de risque d'en développer un eux-aussi (25).

Plusieurs mutations germinales concernant les gènes réparateurs de l'ADN tels que BRCA1/2, ATM, CHEK2, RAD51D et PALB2 sont associées avec un risque élevé de développer un CaP (26). De plus, une mutation héréditaire rare du gène HOXB13, impliqué dans le développement embryonnaire de la prostate, a été associé à un risque accru de CaP (26).

c L'origine ethno-géographique

L'incidence et l'agressivité du CaP diffèrent selon l'origine ethno-géographique. En effet, l'incidence et le taux de mortalité du CaP dans les population antillaise et afro-américaines sont nettement supérieurs aux populations caucasiennes (27). La population asiatique possède la plus faible incidence, ce qui peut s'expliquer notamment par les facteurs environnementaux, génétiques, et nutritionnels (28).

Ces différences peuvent être expliquées par des prédispositions génétiques. Des variants du chromosome 8q24, contenant des régions activatrices interagissant avec le proto-oncogène MYC, sont associés à un haut risque de développer un CaP et plus fréquents chez les afro-américains (29). Les afro-américains possèdent un taux de variation plus important au niveau des gènes Bcl2 et EphB2 altérant leur fonction de suppresseurs de tumeur (30,31) et du gène du RA (32). Il a également été montré que des Single Nucleotid Polymorphism (SNPs) du gène du récepteur à la vitamine D sont positivement associés au risque de PCa, taux de PSA et score de Gleason chez les hommes afro-américains (33).

Les facteurs environnementaux pourraient jouer également un rôle prépondérant sur l'incidence du CaP. La probabilité d'apparition du CaP dans une population immigrante tend à se rapprocher de l'incidence du pays d'accueil. Il a notamment été montré que les asiatiques résidant aux Etats-Unis ont un risque plus important que ceux vivant en Asie (34).

d L’alimentation

Parmi les facteurs environnementaux, l’alimentation pourrait avoir un rôle dans le développement et la progression du CaP.

En effet, il a été montré qu’un régime alimentaire riche en matières grasses favorise et accélère le développement du CaP (35). Une forte consommation de graisses animales saturées augmenterait le taux d’androgènes qui favorisent la progression du CaP (36). De plus, un profil lipidique à faible teneur en acide linoléique, un acide gras polyinsaturé (AGPI) n-6 et enrichis en acides gras (AG) saturés a été associé à l'agressivité du CaP dans la population Africaine-Caraïbéenne (37).

Quelques études ont montré qu’une très haute consommation de produit laitiers pourrait augmenter le risque de CaP (38) et que l’apport alimentaire en calcium est associé à un risque accru de CaP (39). L’augmentation du taux de calcium intracellulaire favorise la migration, l’invasion et la formation de métastases (40).

Par ailleurs, certaines études montrent un effet délétère d’une trop grande consommation de viande rouge. L’hème contenu dans la viande rouge peut catalyser des réactions oxydatives et ainsi entrainer des dommages biochimiques et cellulaires pouvant participer à la survenue du CaP (41).

L’obésité est corrélée à un risque accru de CaP agressif et le taux de mortalité associé au CaP a également été corrélé à l’obésité (42). Les patients obèses présentent fréquemment des altérations métaboliques avec une dérégulation du taux d’hormones sexuelles et d’adipokines connues pour jouer un rôle dans le développement du CaP (43,44).

2.2 Diagnostic

Le diagnostic du CaP à un stade précoce est primordial pour diminuer le nombre de décès. L’intérêt des outils de diagnostic disponibles à l’heure actuelle est de permettre la détection de CaP localisés et curables.

a Le toucher rectal

Le toucher rectal est une méthode de palpation de la prostate permettant de détecter des anomalies de volume, forme et consistance. Il a été montré qu’un toucher rectal suspect est associé à un risque plus élevé de tumeur indifférenciées indépendamment du taux de PSA (45). Cet outil diagnostic est un complément au dosage de PSA sérique. Un toucher rectal suspect

appuie la prise de décision pour réaliser une biopsie prostatique, même dans le cas d'un taux de PSA normal (46).

b Le dosage du PSA

Le PSA est une sérine protéase appartenant à la famille des kallikréines. Cette glycoprotéine, sécrétée normalement par les cellules épithéliales, est une enzyme protéolytique dont l'activité est régulée par les androgènes. Cette enzyme protéolytique présente dans le liquide séminal, participe à la fluidification du liquide séminal (47).

Le taux de PSA sérique est considéré comme normal lorsque sa valeur est inférieure à 4ng/mL. Celle-ci dépend de l'âge du patient et du volume prostatique. Il existe une étroite corrélation entre le taux de PSA et le volume tumoral (48). Néanmoins, l'élévation du taux de PSA n'est pas spécifique car elle s'observe également dans d'autres pathologies prostatiques telles qu'une prostatite ou une hyperplasie bénigne. Un taux de PSA trop élevé nécessite de réaliser des biopsies prostatiques pour rechercher des foyers cancéreux.

c La biopsie

La biopsie prostatique est réalisée suite à un toucher rectal suspect et/ou une élévation du taux de PSA. Il s'agit d'une méthode de dépistage invasive, qui consiste à réaliser des prélèvements tissulaires prostatiques. Les recommandations actuelles sont de réaliser une IRM avant les biopsies afin de pouvoir cibler ces dernières sur les foyers suspects à l'imagerie. L'examen histopathologique de ces prélèvements permet de confirmer ou non le diagnostic et de recueillir de précieuses informations sur la tumeur : grade, volume et localisation. Les biopsies prostatiques sont effectuées le plus souvent par voie transrectale avec réalisation en plus d'éventuels prélèvements ciblés par l'IRM, de 12 prélèvements en sextant guidés par échographie (49).

2.3 Classification

a La classification Tumeurs, Ganglions lymphatiques, Métastases (TNM)

La classification TNM (Tumor-Node-Metastasis) est internationale, sa 8ème édition a été publiée en 2016 par l'AJCC (Americain Joint Comittee of Cancer). Elle permet de classer les tumeurs malignes en tenant compte de l'extension de la tumeur primitive (T1 à T4), de

l'extension aux ganglions lymphatiques (N0 à N3) et de la présence ou non de métastases (M0 à M1) (50).

La classification TNM est dite clinique lorsque l'évaluation est basée sur des données pré-thérapeutique (Tableau 1), et elle est dite pathologique après analyse de la pièce post-opératoire (Tableau 2).

T Tumeur primitive	**T0** : tumeur primitive non retrouvée	
	T1 : tumeur ni palpable au toucher rectal (TR), ni visible en imagerie	**T1a** : tumeur occupant moins de 5 % du tissu réséqué avec un grade ISUP de 1 ou absence de grade 4 ou 5 **T1b** : tumeur occupant plus de 5 % du tissu réséqué ou un grade ISUP ≥ 2 ou présence de grade 4 ou 5 **T1c** : tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'une élévation de la valeur du PSA
	T2 : tumeur limitée à la prostate	**T2a** : tumeur atteignant la moitié d'un lobe ou moins **T2b** : tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais sans atteindre les deux lobes **T2c** : tumeur atteignant les deux lobes
	T3 : extension au-delà de la prostate	**T3a** : extension extra-prostatique uni ou bilatérale **T3b** : extension aux vésicules séminales uni- ou bilatérale
	T4 : tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscle élévateur de l'anus ou la paroi pelvienne)	
N Ganglions régionaux	**Nx** : ganglions régionaux non évalués	
	N0 : absence de métastase ganglionnaire régionale	
	N1 : atteinte ganglionnaire régionale	
	N1 mi : métastase ganglionnaire ≤ 0,2 cm (optionnel)	
M Métastases distancielles	**Mx** : métastases à distance non évaluées	
	M0 : absence de métastase à distance	
	M1 : métastases à distance	**M1a** : atteinte des ganglions non régionaux
		M1b : atteinte osseuse
		M1c : autres sites avec ou sans atteinte osseuse

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION TNM *(EXTRAIT DE ROZET ET AL., 2020).*

pT	**pT0** : absence de tumeur identifiée après PT	
	pT2 : tumeur limitée à la prostate	
	pT3 : tumeur dépassant les limites de la prostate	**pT3a** : extension extra-prostatique uni- ou bilatérale incluant le col vésical*
		pT3b : envahissement des vésicules séminales uni- ou bilatéral
	pT4 : envahissement d'autres structures que les vésicules séminales (sphincter externe, rectum, muscles releveurs de l'anus ou la paroi pelvienne)	
R Reliquat tumoral postopératoire ou marges d'exérèse chirurgicales	**Rx** : marges d'exérèse non évaluées	
	R0 : marges d'exérèse négatives	
	R1 : atteinte microscopique des marges d'exérèse (focale ou étendue)	

* Invasion des fibres musculaires lisses épaisses

TABLEAU 2 : CLASSIFICATION PATHOLOGIQUE PTNM *(EXTRAIT DE ROZET ET AL., 2020).*

b Le score ISUP

Le score de Gleason, créé en 1966 par DF. Gleason, est un score histopronostique permettant de classer les CaP selon le stade de différenciation des cellules cancéreuses. Il existe 5 grades différents (Figure 6), définis sur des critères architecturaux, allant de la forme la mieux différenciée à la forme la moins différenciée, ainsi plus le grade est élevé, moins la tumeur est différenciée et plus elle est agressive. Le score (allant de 2 à 10) est obtenu en faisant la somme des deux grades de Gleason les plus représentés dans la tumeur permettant ainsi de prendre en compte l'hétérogénéité des CaP (51).

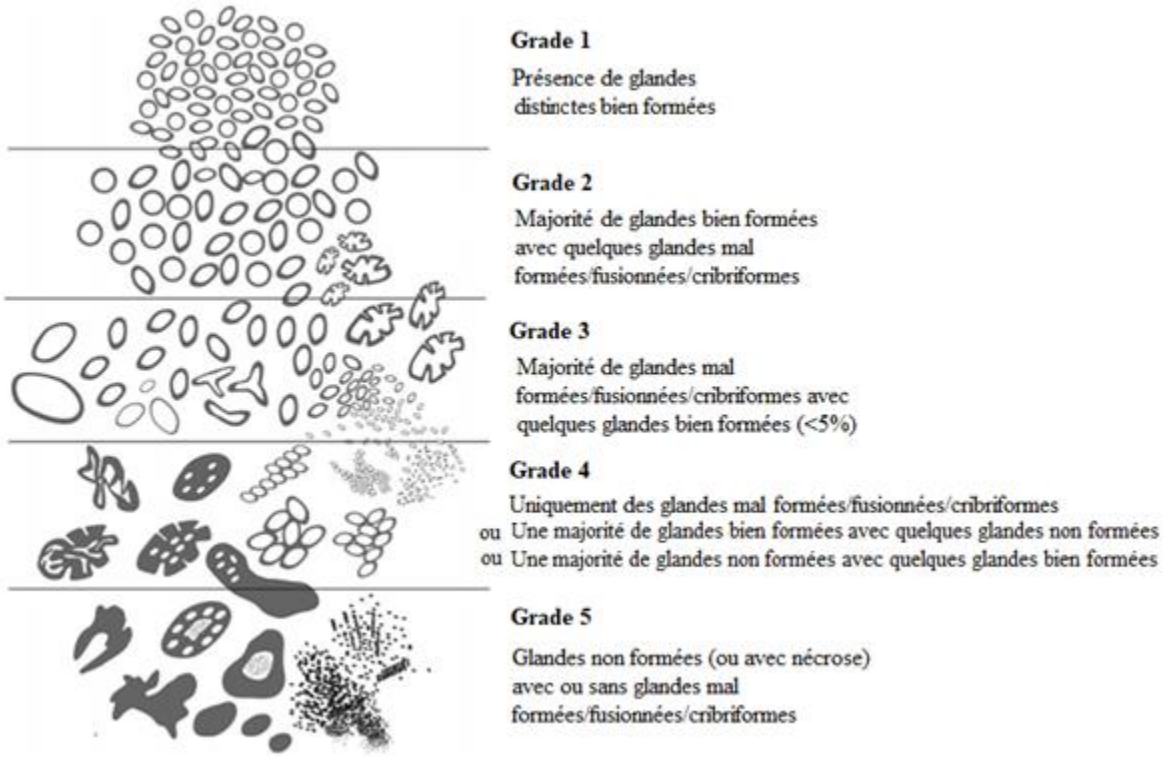


FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS GRADES DE GLEASON EN ACCORD AVEC L'ISUP *(EXTRAIT ET MODIFIE A PARTIR DE HUMPHREY, 2017 ET EPSTEIN ET AL., 2016).*

En 2014, une nouvelle classification est proposée par l'ISUP (International Society of Urological Pathology) apportant des modifications des grades et des précisions pour se rapprocher des données pronostiques actuelles (52).

La classification de l'ISUP définit les 5 groupes suivants en fonction du score de Gleason.

Groupe 1	Anciennement score de Gleason 6 (3 + 3)
Groupe 2	Score de Gleason 7 (3 majoritaire)
Groupe 3	Score de Gleason 7 (4 majoritaire)
Groupe 4	Score de Gleason 8 (4 + 4, 3 + 5, ou 5 + 3)
Groupe 5	Score de Gleason 9 ou 10

***TABLEAU 3 : CLASSIFICATION ISUP EN FONCTION DU SCORE DE GLEASON** (EXTRAIT DE ROZET ET AL., 2020).*

c La classification d'Amico

Il s'agit d'une classification des cancers cliniquement localisés selon trois groupes en fonction du risque de récidive après traitement. Elle prend en compte les critères clinico-pathologiques suivants : le taux de PSA, le score de Gleason et le stade clinique (53).

- Faible risque : Taux de PSA sérique ≤ 10 ng/ml et grade ISUP = 1 et stade clinique T1c ou T2a.
- Risque intermédiaire : Taux de PSA sérique compris entre 10 et 20 ng/ml, ou grade ISUP de 2 ou 3 ou stade clinique T2b.
- Risque élevé : Taux de PSA sérique > 20 ng/ml ou grade ISUP > 3 ou stade clinique T2c.

2.4 Histoire naturelle du CaP

a Néoplasie intra-épithéliale prostatique (PIN)

La PIN de haut grade est une lésion pré-cancéreuse caractérisée par la prolifération de cellules épithéliales au niveau des acini et canaux prostatiques (54).

b Les CaP cliniquement localisés et localement avancés

Au stade localisé, la tumeur reste intraprostatique. On parle de stade localement avancé lorsque les cellules cancéreuses dépassent la capsule prostatique et arrivent au contact direct du tissu adipeux péri-prostatique qui entoure la prostate, et/ou infiltrent les vésicules séminales.

c Les CaP métastatiques

Le CaP est dit métastatique lorsque les cellules cancéreuses envahissent des organes situés à distance de la tumeur primitive par le biais de la circulation sanguine ou lymphatique. Les métastases prostatiques se forment préférentiellement dans les os et les ganglions lymphatiques pelviens.

d Les CaP résistants à la castration (CRPC)

Les CaP métastatiques traités par hormonothérapie régressent le plus souvent dans un premier temps mais développent une résistance aux traitements dans un délai moyen de 18 à 24 mois, néanmoins très variable d'un patient à l'autre. On parle alors de cancers résistants à la castration (CRPC).

e Les CaP neuroendocrines (NE)

L'émergence d'un phénotype NE est fréquente chez des patients dans un contexte de CRPC après hormonothérapie de seconde génération (10 à 20%). Les CaP NE *de novo* sont très rare (0,1 à 0,2%). Leur pronostic est catastrophique, avec une absence de traitement curatif.

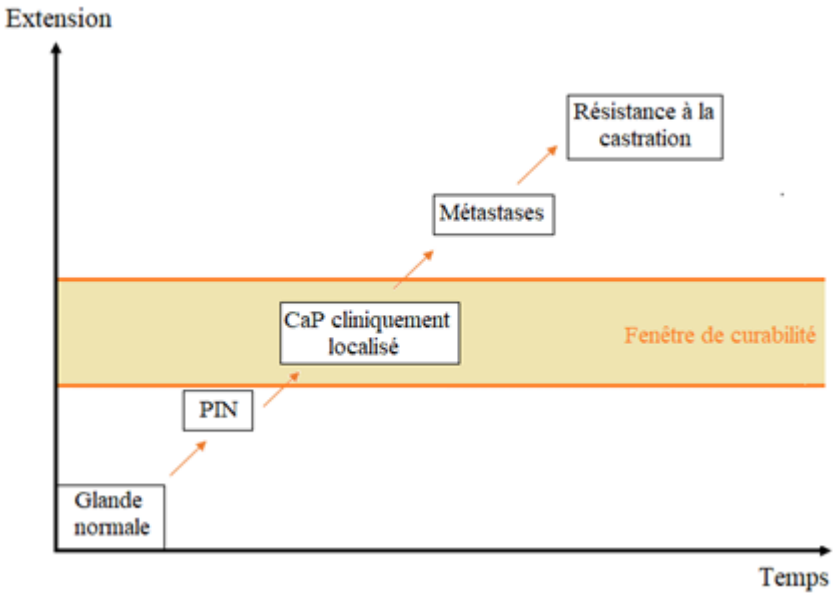


FIGURE 7 : STADES EVOLUTIFS DU CAP.

2.5 Traitements du CaP

Le choix du traitement dépend de plusieurs facteurs, dont le stade évolutif du CaP. Seuls les CaP localisés et localement avancés peuvent bénéficier d'un traitement à visée curative. Pour les cancers localisés, le risque de récidive, établi selon le stade de la tumeur, le taux de PSA et le score ISUP influe le choix du traitement. L'âge et l'espérance de vie du patient sont également pris en compte.

a Surveillance active

La surveillance active permet de retarder le traitement radical et ses potentiels effets indésirables. Les patients éligibles sont ceux présentant un CaP à très faible risque évolutif.

Cette surveillance active assure un suivi régulier incluant des contrôles du taux de PSA sérique avec un toucher rectal et des contrôles histologiques réguliers (49). Si les examens montrent une évolution de la tumeur, un traitement actif sera proposé.

b Prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale est l'un des traitements de première intention les plus couramment utilisés chez les patients ayant un cancer cliniquement localisé ou localement avancé avec une espérance de vie d'au moins 10 ans (55). Cette opération, qui consiste à retirer la glande prostatique dans son ensemble avec les vésicules séminales, peut être réalisée par voie ouverte ou par laparoscopie robot assistée ou non (56).

c Radiothérapie (RT)

La RT externe est une irradiation par rayon X (entre 74 et 80 Gy) réalisée à l'aide d'un accélérateur de particule ciblant la prostate. Ce traitement peut être proposé pour tous les groupes à risque de d'Amico, associé à l'hormonothérapie en cas de haut risque.

La curiethérapie ou brachythérapie est proposée pour les CaP localisés de faible risque, il s'agit d'une RT interne avec introduction dans la prostate de grains radioactifs sous forme d'implants d'iode 125 permanents et d'implants d'iridium 192 temporaires (57).

d L'hormonothérapie

Les androgènes participent à la croissance et le développement de la glande prostatique normale. Sauf exception, le CaP est hormono-dépendant, la signalisation du RA et les androgènes jouent un rôle dans sa progression. En effet, les androgènes favorisent la

prolifération et la migration des cellules cancéreuses prostatiques (58). C'est pourquoi, les traitements visent à bloquer soit directement la synthèse d'androgènes, soit le RA.

i Hormonothérapie de première génération

L'hormonothérapie de première génération est préconisée pour les cancers localisés de très haut risque en association avec un traitement à visée curative et pour les CaP métastatiques. L'utilisation d'agonistes ou antagonistes de la LHRH permet de bloquer la synthèse de testostérone, on parle de « castration chimique ». Les agonistes de la LHRH favorisent dans un premier temps une sécrétion intense de LH et de FSH entraînant un pic de testostérone (effet flare-up). Par la suite, la saturation des récepteurs hypophysaires entraîne une inhibition de la sécrétion de LHRH et par conséquent une inhibition de la sécrétion de LH et FSH. Les cellules de Leydig n'étant plus stimulées, une chute du taux de testostérone est observée (49). La leuproréline, la goséreline, la buséréline et la triptoréline sont les analogues de la LHRH les plus utilisés. Les antagonistes compétitifs du récepteur de la LHRH induisent une inhibition de la synthèse de LH et FSH et par conséquent un arrêt de la stimulation des cellules de Leydig entraînant ainsi une chute du taux de testostérone. Ils ont pour avantage de ne pas être associés à des effets « flare-up ». L'antagoniste le plus utilisé est le dégarelix.

Des anti-androgènes de première génération peuvent être prescrits en complément pour entrer en compétition avec la testostérone au niveau du site de liaison du ligand du RA, on parle de blocage androgénique complet (BAC).

Ce traitement est dans la quasi-totalité des cas efficace initialement mais le plus souvent une récidive apparaît dans un délai variable, se traduisant notamment par une élévation du taux de PSA. On parle alors de cancers de la prostate résistants à la castration (CRPC).

Dans les CaP métastatiques au diagnostic avec une masse métastatique importante et un risque de progression rapide, on peut associer directement (sans attendre la résistance à la castration) l'hormonothérapie de première génération avec une hormonothérapie de nouvelle génération, voire une chimiothérapie à base de taxanes.

ii Hormonothérapie de seconde génération

Pour les CRPC métastatiques, des traitements de seconde ligne sont préconisés avec soit des hormonothérapies de nouvelle génération, soit une chimiothérapie par taxanes. Le schéma de seconde ligne de traitement varie selon les patients (âge, stade de la maladie).

L'acétate d'abiratérone vise à inhiber la biosynthèse des androgènes en bloquant l'enzyme 17alpha-hydroxylase/C17,20-lyase (CYP17). Cette enzyme est exprimée dans les

testicules, les glandes surrénales et les tissus prostatiques cancéreux, elle est nécessaire à la biosynthèse des androgènes. En effet, elle permet la transformation de la prégnénolone et de la progestérone en divers intermédiaires nécessaires pour la synthèse de testostérone. L'inhibition du CYP17 entraîne également une augmentation de la production de minéralocorticoïdes par les glandes surrénales.

Des inhibiteurs du RA non stéroïdiens tels que l'enzalutamide (Enza) peuvent également être utilisés pour inhiber directement le RA. L'Enza (MDV3100) agit à différent niveaux dans la voie de signalisation du RA :

- Il se fixe sur le RA et inhibe ainsi la liaison de la testostérone.
- Il bloque le changement conformationnel activateur du RA suite à la liaison de la testostérone.
- Il inhibe la translocation nucléaire du RA et sa fixation sur l'ADN.

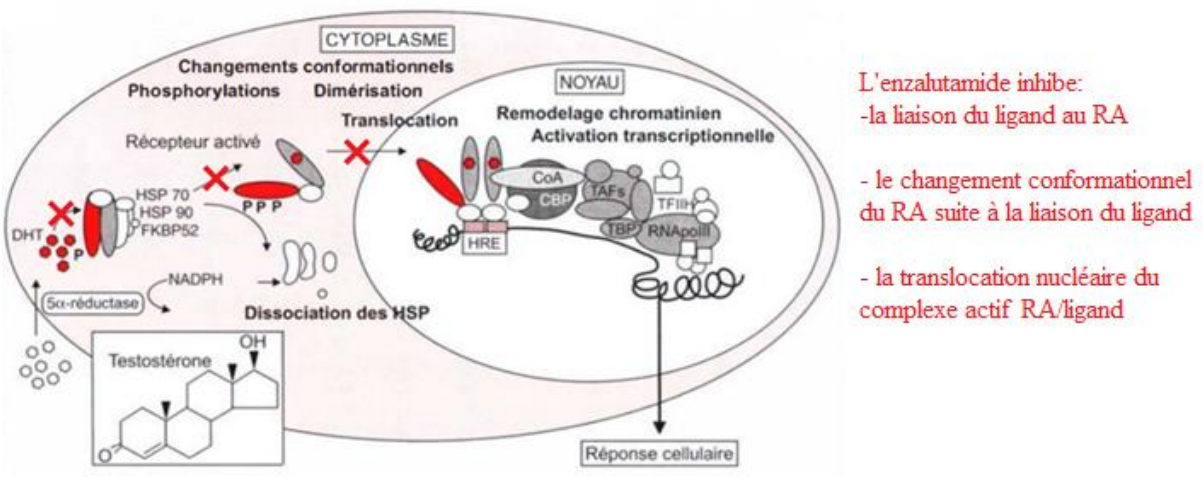


FIGURE 8 : SCHEMATISATION DU MODE D'ACTION DE L'ENZA *(EXTRAIT ET MODIFIE A PARTIR DE POUJOL ET SULTAN, 2000).*
Dans le cytosol, la testostérone est transformée en produit actif, la DHT, sous l'action de la 5-aréductase. La fixation de la DHT sur le RA entraîne la dissociation des protéines HSP stabilisatrices présentes sur le RA. Le RA va alors subir un changement conformationnel et se dimériser, il sera ensuite transloqué dans le noyau où il pourra se fixer sur le promoteur de ses gènes cibles au niveau d'éléments de réponses aux hormones. L'Enza peut agir à différents niveaux dans cette voie de signalisation du RA : il inhibe la fixation de la DHT sur le RA, le changement conformationnel et la translocation nucléaire du RA.

e La chimiothérapie

Un traitement par taxanes est indiqué dans le cas de CRPC métastatiques avant ou après l'hormonothérapie de seconde génération.

De par leur action stabilisatrice des microtubules, les taxanes entraînent des réponses cellulaires diverses notamment un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et par conséquent la

mort cellulaire (59), une activation du gène pro-apoptotique Bcl-2 (60) et un effet inhibiteur de la voie de signalisation du RA en inhibant sa translocation nucléaire (61).

Le docétaxel est l'un des traitements de référence le plus utilisé dans le cas de CRPC. En effet son utilisation a démontré une augmentation de la survie globale des patients (62).

II. Rôle du microenvironnement adipeux dans la progression du CaP

De nombreuses études mettent en évidence le rôle primordial du microenvironnement dans la progression tumorale. Le microenvironnement prostatique normal est constitué d'un ensemble de cellules (cellules immunitaires, fibroblastes, cellules dendritiques, cellules vasculaires) qui baignent dans la matrice extracellulaire (MEC).

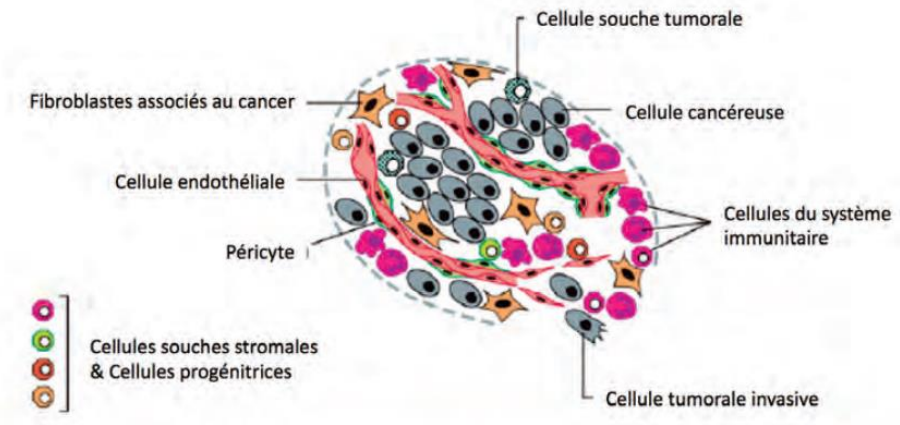


Figure 9 : Les cellules du microenvironnement prostatique *(Extrait et modifie a partir de Hanahan & Weinberg, 2011).*

Lors du processus de carcinogénèse, l'homéostasie de ce microenvironnement est perturbée. Les cellules du microenvironnement vont alors être activées de façon permanente et vont ainsi sécréter des facteurs de croissance, cytokines et chimiokines favorisant la prolifération des cellules tumorales. Les échanges entre les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement sont donc déterminants dans l'évolution du CaP.

1. Le tissu adipeux péri-prostatique (TAPP)

La prostate est entourée de tissu adipeux, appelé tissu adipeux péri-prostatique (TAPP). Au cours de la progression du CaP, les cellules cancéreuses franchissent la capsule prostatique et arrivent au contact direct des adipocytes du TAPP. Sous l'influence des cellules cancéreuses, le phénotype des adipocytes est remanié, prenant la dénomination « d'adipocytes associés au cancer ». Ils sont caractérisés par une délipidation générant des AG libres, une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et des protéines du remodelage de la MEC telles que les métallo protéases (63).

La sécrétion de cytokines (IL-6, adiponectine, leptine), de facteurs de croissance (VEGF), d'hormones (stéroïdes) et d'AG par ces adipocytes favorise la prolifération, la migration et l'invasion tumorale mais également la résistance aux traitements anti-cancéreux (64).

En effet, il a été montré que la leptine et l'IL-6 jouent un rôle majeur dans la résistance des cellules tumorales face à la cytotoxicité des cellules Natural Killer (NK), les rendant moins sensibles (65).

L'obésité, reconnue comme un facteur d'agressivité du CaP, renforce l'effet paracrine des adipocytes du TAPP sur les cellules cancéreuses. En effet, dans le TAPP des patients obèses, la leptine et la MMP-9 sont surexprimés. Une étude comparative de l'expression génique entre les TAPP de patients obèses et de patients de corpulence normale a démontré que

la majorité des gènes surexprimés chez les obèses est pro-inflammatoire, pro-prolifératif et anti-apoptotique (66).

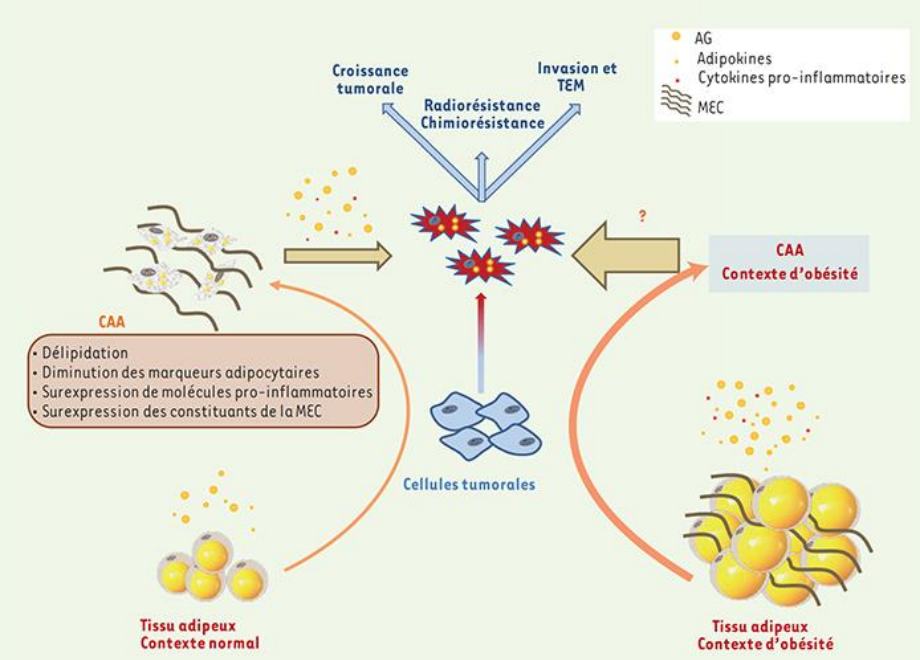


FIGURE 10 : ECHANGES ENTRE LES CELLULES CANCEREUSES ET LES ADIPOCYTES DU TISSU ADIPEUX. *(LAURENT ET AL., 2014).*
Au contact des cellules cancéreuses, les adipocytes du tissu adipeux vont évoluer vers un phénotype appelé « cancer associated adipocytes » (CAA). L'obésité favorise ce changement phénotypique qui augmente la croissance tumorale, l'invasion et la résistance aux traitements anti-cancéreux.

2. Les acides gras (AG)

2.1 Classification des AG

Les AG sont constitués d'une chaîne carbonée hydrophobe de longueur variable comportant une extrémité carboxylique et une extrémité méthylique.

Leur classification est basée sur plusieurs critères :

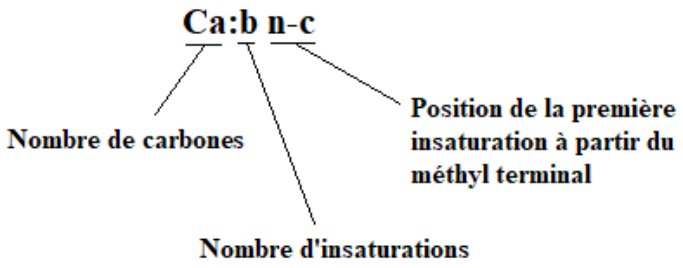
- La longueur de leur chaîne carbonée : elle comporte un nombre pair d'atomes de carbone. En dessous de 10, ils sont qualifiés d'AG à courte chaîne et au-dessus de 16, ils sont qualifiés d'AG à longue chaîne.
- La présence d'une ou plusieurs insaturations (double liaison) entre deux atomes de carbone. Les AG ne possédant pas de double liaison sont dits « saturés », ceux en possédant une seule sont dits « mono insaturés » et ceux en possédant plusieurs sont dits « polyinsaturés ».

- La conformation des doubles liaisons : lorsque les atomes d'hydrogènes sont placés du même côté de la double liaison, elle est dite Cis. Au contraire, lorsque les atomes d'hydrogènes sont de part et d'autre de la double liaison, elle est dite Trans.

2.2 Nomenclature des AG

La nomenclature la plus usuelle tient compte du nombre d'atome de carbone, du nombre d'insaturation et leur position sur la chaîne carbonée à partir de l'extrémité méthylique.

Selon la position de la première double liaison, on parle d'AG n-3 (ω-3), n-6 (ω-6) ou n-9 (ω-9).



2.3 Biosynthèse des AG

La première étape de la biosynthèse des AG est la synthèse de novo des AG saturés, sous le contrôle d'un complexe multienzymatique appelé « fatty acid synthase ». A partir de l'acétate à 2 carbones, ce complexe enzymatique va catalyser plusieurs réactions d'élongation jusqu'à synthétiser des AG saturés comprenant jusqu'à 16 atomes de carbone. La seconde étape est l'élongation de la chaîne carbonée des AG par des enzymes appelées élongases. Ces enzymes présentes au niveau de la membrane du RE vont ajouter deux atomes de carbones au niveau de l'extrémité carboxylique. La dernière étape est la désaturation des AG réalisée par des désaturases. Ces enzymes, situées à la membrane du RE, vont ajouter des doubles liaisons, séparées par trois atomes de carbones, au niveau du carbone dont elles portent le nom. La Δ-9 désaturase ajoute donc une double liaison entre les carbones 9 et 10 de la chaîne carbonée.

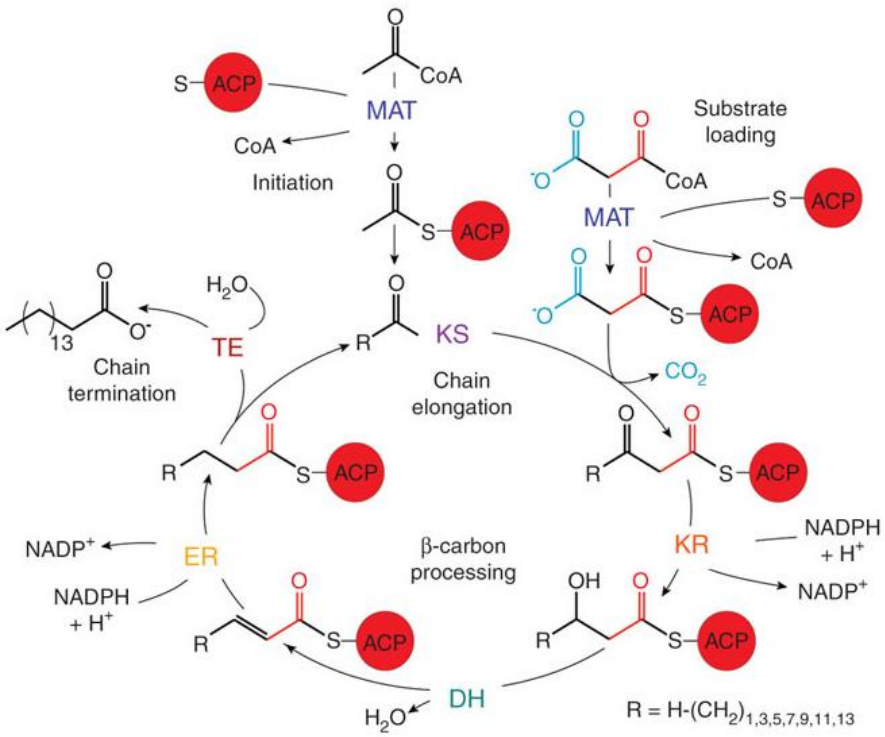


FIGURE 11 : SCHEMA DE BIOSYNTHESE DES AG. *(BRIGNOLE ET AL., 2009).*
Le cycle de réaction de la « fatty acid synthase » est initié par le transfert du groupement acétyl de l'acétyl-CoA vers la protéine porteuse acétylée (ACP, rouge). Sept cycles d'élongation de la chaîne carbonée permettent d'obtenir un substrat d'une longueur de 16 à 18 carbones. Le substrat est ensuite libéré par hydrolyse.

Les familles d'AGPI ω-3 et ω -6 ont pour précurseurs respectifs l'acide alpha-linolénique (18 :3n-3) et l'acide linoléique (18 :2n-6). Ces deux AG polyinsaturés ne peuvent pas être synthétisé par notre organisme car nous n'exprimons pas les désaturases qui le permettent (la Δ12-désaturase et la Δ15-désaturase). Ces deux AG sont dits « essentiels » car ils sont exclusivement apportés par l'alimentation.

2.4 Source alimentaire d'AG

Un grand nombre d'AG sont retrouvés dans notre alimentation sous forme de triglycérides permettant le stockage énergétique, de phospholipides et d'esters de cholestérol intervenant dans la structure des membranes cellulaires. Selon les besoins de l'organisme, les AG peuvent être absorbés au niveau de l'intestin et ensuite redistribués pour une utilisation immédiate. Mais ils peuvent être également stockés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux pour une utilisation plus tardive.

- Les AG **saturés** sont présents dans les laitages, les graisses animales, les matières grasses de cuisson, l'huile de palme et l'huile de noix de coco.

- Les AG **monoinsaturés** sont présents majoritairement dans les huiles végétales (olive, colza, noix, arachides)
- Les **AGPI ω-3** sont présents dans les produits d'origine marine notamment les poissons gras ainsi que dans les huiles végétales (noix, colza, soja, lin).
- Les **AGPI ω-6** sont présents dans les huiles végétales (tournesol, maïs, blé, sésame, noix, soja).

3. AG et CaP

De par leur activité métabolique et sécrétoire, les adipocytes peuvent en libérant des adipokines et des AG libres influer sur la progression tumorale.

Sous l'action des cellules cancéreuses, un phénomène de lipolyse peut se produire induisant un relargage d'AG libres qui vont agir sur les cellules tumorales soit directement soit par le biais de la circulation sanguine (63).

Les adipocytes sont capables de transférer des lipides aux cellules tumorales prostatiques qui les utilisent directement ou les stockent dans des gouttelettes lipidiques (67).

Le tissu adipeux se renouvelle très lentement, il constitue ainsi un bon marqueur de l'alimentation. La composition du TAPP va donc être le reflet de l'apport alimentaire passé en AG. De plus, les AG constituent et structurent les membranes cellulaires qui sont dynamiques et en constant renouvellement (68). Ainsi, une alimentation riche en tel type d'AG sera reflétée sur la composition du TAPP et sur la composition des membranes des cellules tumorales au contact de ce TAPP.

Plusieurs études ont démontré que les AG peuvent jouer un rôle dans la progression du CaP. Il a été montré qu'un rapport ω-6/ω-3 élevé est associé au risque de CaP de haut grade (69).

Parmi les AGPI ω-6, l'acide arachidonique a été associé à l'agressivité du CaP. En effet, en activant la production de stéroïdes au sein de la tumeur, il contribue à l'évolution du CaP vers le stade de CRPC (70).

A l'inverse, certains AGPI exerceraient un effet « protecteur ». Le traitement par l'acide docosahexanoïque (DHA), un AGPI ω-3, sensibilise les cellules PC3 et DU145 à l'apoptose (71). De plus, une étude menée au sein du laboratoire, a montré que l'acide linoléique (AL) et l'acide écosapentaénoïque (EPA) sont inversement corrélés à l'agressivité du CaP (37). Ces deux AGPI sont capables d'inhiber la voie de signalisation Zeb1/SK3 induite par le TGFβ (72).

Par ailleurs, une étude in vivo récente, menée chez le modèle murin, a montré qu'un régime alimentaire enrichi en AG ω-3 (notamment en AL, DHA et EPA) permet de réduire la croissance tumorale indépendamment du niveau d'androgènes (73).

III. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'échappement hormonal

L'échappement hormonal est multi-causal, la cellule tumorale pouvant modifier des mécanismes biologiques impliqués dans la signalisation du RA, les voies de résistance à l'apoptose et les voies de survie (74). Ces modifications sont complexes et diffèrent selon l'exposition à certains traitements. La compréhension de ces voies moléculaires associées à la résistance aux traitements est primordiale pour essayer de contrer ces phénomènes d'échappement hormonal.

1. Mécanismes liés au RA : ligand dépendant

1.1 Mutations du RA

Le RA est l'un des facteurs de transcription le plus sujet aux mutations avec plus de 300 mutations connues (75). La majorité de ces mutations est localisée au niveau du domaine d'interaction avec le ligand, et est retrouvée dans les CRPC métastatiques (76). Certains traitements anti-androgéniques ont été associés avec des mutations spécifiques du RA. Une mutation non-sens (Q784), au niveau du domaine de liaison du ligand, a été identifiée chez les patients atteints d'un CRPC ayant développés une résistance aux inhibiteurs de CYP17. Ce mutant Q784 est constitutivement exprimé dans le noyau et peut se lier à l'ADN en absence d'androgène (77). Une autre étude a montré que le traitement par le flutamide (inhibiteur du RA) pouvait induire une mutation de l'acide aminé en position 877, avec un effet agoniste paradoxal du flutamide sur ce RA muté (78).

Certaines mutations peuvent induire un changement de conformation du RA et modifier sa spécificité (79). Ainsi, le RA peut être activé par la liaison d'autres hormones tels que les estrogènes et la progestérone ou bien paradoxalement par des anti-androgènes (80,81).

1.2 Hypersensibilité du RA

Suite à la déprivation androgénique, les cellules du CaP peuvent augmenter leur sensibilité aux androgènes et ainsi permettre l'activation du RA malgré une faible concentration d'androgènes. Les cellules deviennent alors hypersensibles aux androgènes.

Il a été démontré que la sensibilité et la stabilité du RA sont augmentées dans des lignées cellulaires dérivant de tumeurs hormono-indépendantes par rapport à celles dérivant de tumeurs hormono-sensibles. En effet la durée de demi-vie de la protéine du RA est deux à quatre fois plus longue dans un contexte d'échappement hormonal (82). De plus, dans ces cellules, le RA est localisé au niveau nucléaire malgré l'absence de DHT, suggérant sa potentielle activation transcriptionnelle (82).

1.3 Amplification du RA

Il a été montré que 30% des CRPC présentent une amplification du *RA* qui n'est pas présente avant le traitement hormonal.

Le RA est en moyenne deux fois plus exprimé dans les cas présentant une amplification génique par rapport aux CRPC sans amplification du *RA* (83), ce qui permet d'abaisser le seuil de réponse des cellules au ligand.

1.4 Persistance d'une production d'androgènes

Si la majorité des androgènes est produite dans les testicules, une quantité moindre (10%) est produite par les glandes surrénales et les tissus périphériques. La voie sécrétoire de l'axe corticotrope CRH-ACTH (corticotropin-releasing hormone-adrenocorticotropic hormone) étant toujours active sous déprivation androgénique, les glandes surrénales continuent de produire des hormones stéroïdiennes intermédiaires dans la voie biochimique de production de la testostérone (l'androstènedione et la DHEA) (84).

Les cellules cancéreuses, soumises à un traitement hormonal, peuvent augmenter leur production locale d'androgènes, en convertissant les androgènes issus des glandes surrénales en DHT (85).

De plus il a été montré que les CRPC expriment les enzymes nécessaires pour la synthèse *de novo* de DHT avec une activité élevée de la 5-α-réductase (86). L'association d'une

déprivation androgénique avec des inhibiteurs de co-enzymes pourrait réduire la synthèse androgénique persistante et ainsi améliorer la réponse thérapeutique.

1.5 Co-régulateurs du RA

Les protéines co-régulatrices interagissent avec les récepteurs nucléaires pour moduler leur transactivation. En effet elles peuvent l'activer ou le réprimer, on parlera respectivement de protéines coactivatrices et corépresseurs.

Il a été montré que l'expression du RA et de deux co-activateurs TIF-2 (Transcriptional Intermediary Factor-2) et SRC1 (Steroid Receptor Coactivator-1) est augmentée dans les CRPC (87).

Les protéines ARA (Androgen Receptor-Associated protein) incluant ARA54, ARA55 et ARA70, constituent une autre famille de coactivateurs du RA qui altèrent la spécificité du ligand (88).

Une étude a montré que l'utilisation de molécules anti-androgéniques peut favoriser l'interaction entre la protéine ARA70 et le RA, augmentant ainsi son activité transcriptionnelle (89). La protéine ARA54 peut agir conjointement avec le mutant T877A du RA pour augmenter son activité en présence de molécules anti-androgéniques (90). Ainsi la combinaison de plusieurs mécanismes tels que la surexpression de coactivateurs et les mutations du RA peut participer à la résistance à la castration.

1.6 Dérégulation des protéines chaperonnes

Certaines protéines chaperonnes interviennent dans la signalisation du RA, elles jouent un rôle notamment dans la fixation du ligand et la translocation nucléaire du récepteur.

Une surexpression des protéines HSP90 et HSP27 est retrouvée dans un grand nombre de CRPC, et participe à l'acquisition de la résistance aux traitements (91,92). Le niveau d'expression de la protéine HSP27 a été corrélé à une mauvaise réponse thérapeutique aux traitements anti-androgéniques (93). En effet, sa surexpression confère au CaP une résistance à la castration (94). C'est pourquoi plusieurs études ont pour stratégie de cibler ces protéines chaperonnes pour améliorer la réponse aux traitements (91).

2. Mécanismes liés au RA : ligand indépendant

La majorité des récepteurs stéroïdiens, dont le RA, peuvent être activés indépendamment du ligand (95). Les mécanismes à l'origine de cette activation sont peu connus. Néanmoins, des modifications de phosphorylation du récepteur et/ou des protéines associées pourraient être la clé d'une activation indépendante (95).

2.1 Variants d'épissage du RA

Durant l'épissage alternatif du gène du RA, l'inclusion alternative d'exons va générer des ARNm matures codant pour différentes isoformes protéiques structurellement et fonctionnellement distinctes, ce sont des variants du RA. Plusieurs variants du RA, constitutivement actifs et délétés du domaine de liaison au ligand, ont été identifiés (AR-V1 à 7) (96). Ces protéines tronquées peuvent alors se lier à l'ADN et interagir avec des corécepteurs indépendamment des androgènes. La signalisation du RA peut donc se produire en l'absence totale de liaison du ligand (97).

Plusieurs études ont montré l'existence de variants d'épissage du RA dans un contexte de CRPC (98). Le variant le plus décrit est l'ARV7, sa surexpression dans les cellules tumorales circulantes de patients atteints d'un CRPC est associée à la résistance aux traitements hormonaux tels que l'Enza et l'acétate d'abiratérone (98,99). L'ARV7 peut être utilisé pour prédire la réponse aux traitements hormonaux (97). De plus, la surexpression de l'ARV7 dans les CRPC métastatiques est associée à une diminution du taux de survie (100).

2.2 Facteurs de croissance et cytokines

Plusieurs facteurs de croissance et cytokines tels que l'IGF (Insulin-like Growth Factor-1), l'EGF (Epidermal Growth Factor), le KGF (Keratinocyte Growth Factor) et l'IL-6 sont capables d'interagir avec des récepteurs membranaires et déclencher des cascades de signalisation aboutissant à l'activation du RA (101–104). En effet, il a été montré que l'expression du facteur d'échange de nucléotides guanine Vav3, activé par des facteurs de croissance, augmente durant l'échappement hormonal des CaP. La voie de signalisation Vav3/Rac1 favorise l'activation du RA par des facteurs de croissance en absence d'androgène (105).

Dans un contexte de déprivation androgénique, la voie de signalisation de l'IGF assure le transport nucléaire du RA, malgré l'absence de ligand. En se liant à son récepteur, l'IGF active la voie de signalisation intracellulaire PI3K/Akt, permettant la translocation du RA (106). La voie IGF1 / insuline-PI3K-Akt augmente le taux de PSA en levant l'effet répresseur de Fox1 (*Forkhead box protein O1*) sur le RA (106).

De plus, les protéines qui se lient spécifiquement à l'IGF, les IGFBPs (*Insulin-like Growth Factor Binding Proteins*), jouent également un rôle dans l'activation du RA en absence d'androgène. En effet, les IGFBPs sont capables d'augmenter la concentration plasmatique d'IGF et d'augmenter leur activité. Chez les patients métastatiques sous déprivation androgénique, la protéine IGFBP-1 est surexprimée et est associée à une acquisition de la résistance à la castration plus rapide et à une diminution du taux de survie (107).

Les récepteurs tyrosine kinase sont également impliqués dans la régulation du RA. Le récepteur HER-2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*) est capable d'interagir avec la voie du RA et participer à la progression vers le stade d'échappement hormonal. La surexpression de HER-2 dans les cellules androgéno-dépendantes LNCaP induit leur progression vers l'androgéno-indépendance. En effet, HER-2 module la voie de transduction du signal du RA et active la transcription du PSA, gène cible du RA (108).

L'IL-6 est capable d'activer le RA au niveau de son domaine N-terminal en absence d'androgènes et ainsi d'augmenter l'expression du PSA, gène cible du RA. Cette activation du RA, indépendamment du ligand, est stimulée par la phosphorylation des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et celle du facteur de transcription STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) (109). De plus, la phosphorylation de la protéine SRC-1 (*Steroid receptor coactivator-1*) par des MAPK est nécessaire pour une activation du RA par l'IL-6 (110).

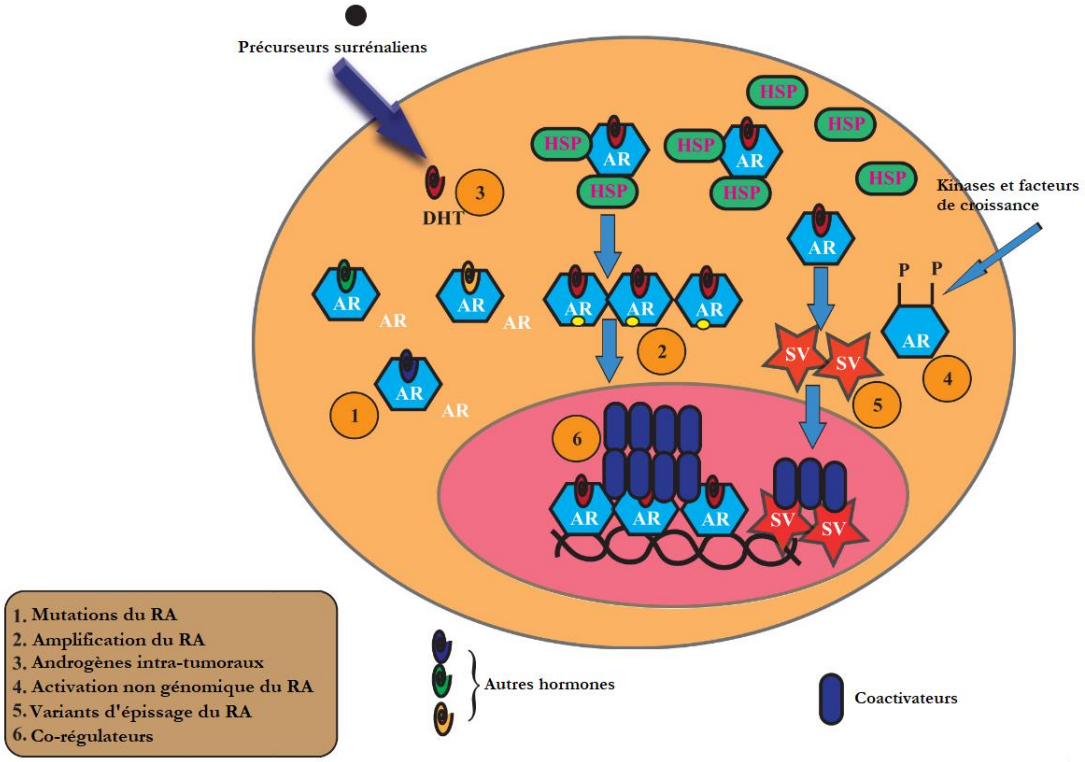


FIGURE 12 : MECANISMES DE RESISTANCE DEPENDANTS DU RA OBSERVES DANS LES CRPC.
1 : Le RA muté peut être activé par d'autres hormones que les androgènes (progestérone, oestradiol…). 2 : L'amplification du RA entraîne sa surexpression et son hypersensibilité. Ainsi le RA peut être activé par de faibles concentrations d'androgènes. 3 : La cellules tumorale peut convertir les précurseurs stéroïdiens (DHEA, androsténèdione…) sécrétés par les glandes surrénaliennes en produit actif :la DHT. 4 : Le RA peut être activé par des facteurs de croissance et des cytokines. 5 : Les variants d'épissage du RA sont constitutivement actifs malgré l'absence de ligand. 6 : L'activité du RA peut être favorisé par la fixation de coactivateurs (Extrait et modifié à partir de Ulm et al., 2019).

3. Mécanismes indépendants du RA

3.1 Dérégulation des voies apoptotiques

La famille protéique Bcl-2 joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose induite par divers stimuli. On y retrouve des protéines pro-apoptotiques telles que Bak et Bax et des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xl et Bcl-2 (111,112). Cette oncoprotéine Bcl-2, située au niveau de la membrane mitochondriale, confère aux cellules qui l'expriment une résistance à l'apoptose (113).

Il a été montré, dans un modèle de xénogreffe de cellules LNCaP hormono-sensibles chez la souris castrée, que la surexpression de Bcl-2 permettait aux cellules LNCaP de former des tumeurs dans un environnement dépourvu en androgènes (114). En effet, l'expression de Bcl-2 augmente suite à une déprivation androgénique et elle est corrélée à l'évolution du CaP vers l'hormono-indépendance (115). L'expression accrue de Bcl-2 dans les tumeurs hormono

résistantes a été associée à l'accumulation de la protéine suppresseur de tumeur p53 au niveau du noyau (116).

3.2 Voie de survie

La voie de signalisation Wnt/β-Caténine joue un rôle dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. Des dérégulations de cette voie de signalisation ont été associées à certains cancers dont le CaP. La voie Wnt/β-Caténine est activée dans les stades avancés du CaP et participe à l'acquisition de la résistance à la castration. Cette voie de signalisation peut interagir avec la signalisation du RA. Dans les CRPC, le RA et la β-caténine sont colocalisés au niveau nucléaire. La surexpression du RA, fréquemment observée dans les CRPC, augmente l'activité de la voie Wnt/β-Caténine, et favorise la prolifération androgéno-indépendante des cellules cancéreuses prostatiques (117). L'utilisation d'un inhibiteur de la voie Wnt/β-Caténine, le CWP232291, bloque la croissance des cellules cancéreuses prostatiques en induisant un stress du RE qui active le facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (118).

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR peut interagir avec celle du RA de manière dynamique (119). Les cellules cancéreuses prostatiques utilisent la voie PI3K/Akt/mTOR pour adapter leur réponse au stress généré par les traitements hormonaux ciblant le RA (120). La voie PI3K/Akt/mTOR est dérégulée dans 100% des CaP à un stade avancé, suggérant l'implication de cette voie dans la résistance à la castration (121). Le gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) régule négativement la voie PI3K/Akt/mTOR. L'inhibition de ce gène suppresseur de tumeur a été corrélée avec la progression vers l'hormono indépendance et un développement métastatique plus rapide (122,123). Dans un modèle cellulaire androgénodépendant, l'inhibition de la PI3K inhibe la prolifération cellulaire et bloque la progression vers un stade hormono indépendant (124). Les interactions de la voie PI3K/Akt/mTOR avec le RA permettent au CaP de continuer de progresser avec un taux d'androgènes réduit.

4. Rôle du calcium dans l'échappement hormonal

De récentes études montrent que le calcium joue un rôle dans la résistance aux traitements des cellules cancéreuses prostatiques. La région N terminale du gène du RA possède des sites de liaison à la calmoduline, calciprotéine capable de lier 4 atomes de calcium via ses motifs EF (125). La fixation du calcium entraîne son changement de conformation lui permettant d'activer des protéines calmoduline-dépendantes. En présence de fortes concentrations de calcium intracellulaire, les calpaïnes, cystéines dépendantes du calcium, deviennent actives et changent de conformation. Elles sont alors capables de cliver le RA au niveau des sites de liaison de la calmoduline (125). Ceci suggère une implication potentielle de la calmoduline liée au RA dans le clivage calcium-dépendant du RA par les calpaïnes.

Il a été montré que la liaison de la calmoduline au RA, lorsque les deux protéines sont colocalisées dans le noyau, protègerait celui-ci d'une dégradation induite par les calpaïnes (126).

Les calpaïnes clivent le domaine COOH de liaison du ligand ce qui génère des formes tronquées du RA de faibles poids moléculaires et constitutivement actives (127). La protéolyse du RA médiée par les calpaïnes participerait à la résistance aux traitements. De plus, la surexpression de la protéine kinase Ca^{2+}/calmoduline dépendante II (CAMK II) favorise la croissance cellulaire sous déprivation androgénique (128). Il pourrait être intéressant de cibler la calmoduline et d'utiliser des agents activateurs de calpaïnes pour contrecarrer cette voie d'échappement hormonal.

D'autres calciprotéines peuvent jouer un rôle dans la progression et la réponse aux traitements du CaP. La protéine de liaison au calcium S100P, associée à la progression tumorale, a été retrouvée surexprimée dans un modèle de xénogreffe CWR22 hormono indépendant (129).

Par ailleurs, le traitement anti-androgénique par l'Enza altère la composition protéique des vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules cancéreuses prostatiques. Les vésicules sont enrichies en ATPase 1, qui assure le transport des ions Ca^{2+} au niveau de la membrane plasmique (130). Les vésicules extracellulaires peuvent donc participer à la progression du CaP vers l'échappement hormonal en dérégulant l'homéostasie calcique cellulaire.

5. La transdifférenciation NE du CaP

5.1 Caractéristiques des cellules NE dans la prostate saine

Au sein de l'épithélium prostatique, constitué d'une couche de cellules basales et d'une couche de cellules luminales sécrétoires (exprimant le RA), on retrouve quelques cellules NE minoritaires. Les cellules NE possèdent des dendrites leur permettant de s'étendre entre les cellules épithéliales adjacentes (131).

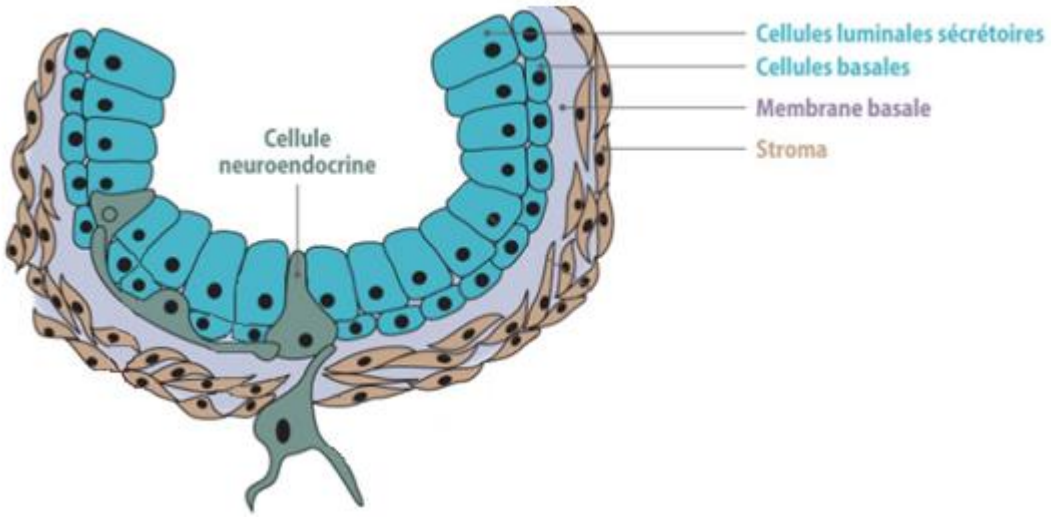


FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES DE LA GLANDE PROSTATIQUE. *(ADAPTE A PARTIR DE HANNSSON ET ABRAHAMSSON, 2001).*
L'épithélium prostatique est composé de cellules basales, tapissant la membrane basale, de cellules luminales sécrétoires et de rares cellules NE. Le compartiment stromal est composé de fibroblastes, d'adipocytes, de cellules musculaires lisses et de composants neuronaux et vasculaires.

Le cytoplasme des cellules NE est enrichi en granules de sécrétion contenant des neuropeptides (sérotonine, calcitonine, bombésine…) (132,133) et des facteurs de croissance tel que le VEGF (134). Ceci suggère une grande diversité de sous types et de fonctions des cellules NE. La sécrétion de ces granules permet aux cellules NE d'exercer un effet paracrine sur les cellules avoisinantes, et ainsi participer à la croissance, la différenciation et l'homéostasie de la prostate normale (135).

Les cellules NE sont caractérisées par l'expression de marqueurs neuronaux tels que la Neuron Specific Enolase (NSE) et la βtubulineIII ainsi que des marqueurs NE comme la chromogranine A (CgA) et la synaptophysine (Syp) retrouvés dans les granules de sécrétion. Toutes les cellules NE n'expriment pas l'ensemble de ces marqueurs, elles peuvent avoir un phénotype plutôt neuronal ou plutôt NE selon leur stade d'évolution dans la transdifférenciation

NE. De plus, selon les pratiques actuelles, une cellule est dite NE lorsque le marquage immunohistochimique pour la CgA ou la Syp est positif (136,137).

Les cellules NE n'expriment pas le RA, elles sont donc androgéno-insensibles, elles sont bloquées en phase G0 du cycle cellulaire et ne prolifèrent pas (138).

a Les marqueurs NE

Les granules de sécrétion des cellules NE stockent des hormones, des peptides et des neurotransmetteurs. Plusieurs protéines contenues dans ces granules sont utilisées en tant que marqueurs des cellules NE.

i La chromogranine A (CgA)

Les chromogranines sont des protéines ubiquitaires de la famille des granines présentes dans les granules de sécrétion à corps dense des cellules endocrines et NE ainsi que dans les neurones. Il existe trois isoformes : la CgA, la CgB et la CgC aussi appelée sécrétogranine II. La CgA est codée par le gène CHGA localisé sur le chromosome humain 14q32.12 et constitué de 8 exons et 7 introns. Il s'agit d'une protéine de 48kDa possédant une boucle disulfure à proximité de son extrêmité N-terminale. La CgA possède plusieurs sites de clivage permettant de générer de petits peptides ayant leur propre fonction biologique tels que la vasostatine, la pancréastatine, la catéstatine et la serpipine (139). Les chromogranines seraient donc des précurseurs de peptides bioactifs.

La chromogranine est synthétisée transitoirement dans le réticulum endoplasmique rugueux puis elle transite à travers l'appareil de Golgi où elle sera modifiée et empaquetée avec d'autres protéines sécrétrices (hormones et peptides) dans des granules immatures. Ces organites subissent des processus de maturation durant lesquels la CgA peut être clivée par des enzymes spécifiques générant ainsi de petits peptides. Le contenu du granule mature est ensuite libéré par exocytose en réponse à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

En effet, les granules de sécrétion utilisent une voie de sécrétion régulée dépendante d'un signal externe tel que l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire (140).

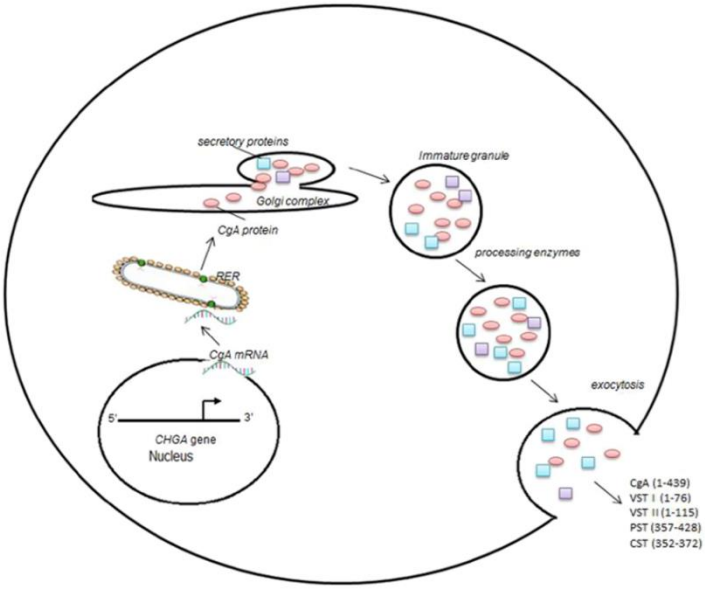


FIGURE 14 : VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA CGA DANS LES CELLULES NE.
La protéine CgA est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) puis modifiée et empaquetée dans le Golgi dans un granule de sécrétion immature qui va subir plusieurs processus de maturation. Le contenu du granule mature contenant la CgA et des peptides dérivés de la CgA (VST = Vasostatine, PST = Pancréastatine, CST = Catéstatine) est libéré par exocytose sous l'influence de l'élévation de la concentration calcique intracellulaire (Marotta et al., 2018).

La CgA est capable de lier de grande quantité de calcium, et sa capacité d'auto-agrégation dépend du calcium et du pH (141).

La CgA est un marqueur de sécrétion des cellules NE couramment utilisé en clinique. Dans le cas du CaP, le dosage sanguin de la CgA permet de détecter la présence ou non d'une composante NE (142).

Les patients atteints d'un CRPC métastatique présentant un taux sérique élevé de CgA développent plus rapidement une résistance aux traitements anticancéreux (143) et ont un taux de survie plus bas (144).

ii La synaptophysine (Syp)

La Syp est une protéine présente dans les petites vésicules claires des cellules NE et dans les petites vésicules synaptiques des neurones. Cette protéine de 38kDa fait partie de la famille des MARVEL (Mal and Related protein for Vesicle trafficking and membrane Link) qui sont des protéines membranaires impliquées dans la juxtaposition des membranes. Sa structure comporte 4 régions transmembranaires en hélice α, deux boucles intra-vésiculaires et deux domaines N et C terminaux cytosoliques. Le long domaine COOH terminal cytoplasmique, contient un motif de fixation au calcium qui peut être phosphorylé par la protéine kinase II calcium dépendante et ainsi amorcer l'interaction avec les phospholipides membranaires pour permettre l'exocytose (145).

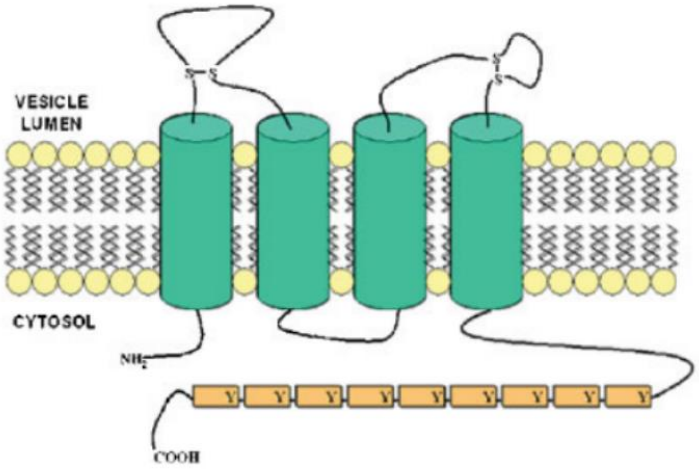


FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE TERTIAIRE DE LA SYP *(VALTORTA ET AL., 2004).*

La Syp est constituée d'un complexe hexamérique qui une fois incorporé dans la membrane forme un pore-canal. Cet hexamère a une conformation fermée dans la partie cytosolique de la membrane et une conformation ouverte dans la partie luminale de la vésicule (146). Ce canal, apparenté aux connexines, permet le pompage des ions Ca^{2+} à l'intérieur des vésicules. La concentration calcique intra-cytoplasmique déclenche le cycle des vésicules synaptiques.

La Syp peut jouer un rôle dans plusieurs événements du cycle des vésicules synaptiques. En effet, la Syp pourrait réguler la disponibilité de la protéine VAMP2 constitutive du complexe SNARE nécessaire lors de la fusion de la vésicule synaptique. La Syp jouerait également un rôle dans la libération des neurotransmetteurs par exocytose (147).

Une étude menée sur des cellules tumorales circulantes issues de patients atteints d'un CRPC et sous hormonothérapie de seconde ligne (Enza ou acétate d'abiratérone) a montré que l'expression de la Syp est associée à l'émergence de la résistance aux traitements (148).

CgA et Syp, sont des marqueurs fiables des cellules NE, leur expression est recherchée en immunohistochimie pour confirmer la différenciation NE d'un CaP.

iii La Neuron Specific Enolase (NSE)

La NSE est une enzyme exprimée dans le cytoplasme des neurones et des cellules NE.

Le dosage sanguin de la NSE pour détecter une différenciation NE est uniquement utilisé en complément du dosage d'autres marqueurs plus spécifiques comme la CgA.

Un niveau élevé de NSE sérique est associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un CRPC (143). Le rôle de la NSE dans le diagnostic, le pronostic et le suivi de la maladie n'est pas établi.

iv La βTubulineIII

La βTubulineIII est une protéine codée par le gène TUBB3 situé sur le chromosome 16q24.3. Elle se distingue des autres isoformes par son domaine GTPase nécessaire pour la régulation de la dynamique des microtubules. Elle est exprimée préférentiellement dans les tissus nerveux et cellules NE.

La βTubulineIII est utilisée dans des études in vitro comme marqueur des cellules NE en complément d'autres marqueurs plus spécifiques tels que la CgA et la Syp.

Une étude in vitro, menée sur la lignée cellulaire LNCaP, a montré que l'inhibition du RA par siARN mais également l'utilisation d'un milieu dépourvu en androgène induit l'expression de la βTubulineIII (149). Il a été montré que la surexpression de la βTubulineIII diminue la sensibilité des cellules cancéreuses prostatiques au docétaxel. La βTubulineIII diminuerait la polymérisation de la tubuline, ce qui participerait à la résistance aux taxanes. L'expression de la βTubulineIII dans le tissu prostatique a une valeur prédictive sur la survie globale des patients ayant un CRPC traités au docétaxel (150).

5.2 Cancers prostatiques NE

Le CaP NE dit à « petites cellules » représente 1 à 5% des tumeurs prostatiques. Le cas le plus fréquent est l'émergence d'un phénotype NE-like dûe au phénomène de transdifférenciation NE après manipulation hormonale, dans un contexte de CRPC, chez des patients le plus souvent métastatiques. L'utilisation des hormonothérapies de nouvelle génération induit l'émergence d'une différenciation NE dans 10 à 20% des CRPC. La transdifférenciation peut être complète, avec alors une absence d'expression du RA, ou incomplète, avec des cellules qui co-expriment le RA et les marqueurs NE. Il est beaucoup plus rare d'observer une différenciation NE d'emblée (*de novo*) dans un CaP au moment du diagnostic.

Le CaP NE à « petites cellules » peut être pur ou mixte, qu'il survienne *de novo* ou après traitement. Le carcinome mixte « adénocarcinome acinaire – carcinome NE » est une tumeur biphasique, avec deux contingents distincts, le contingent adénocarcinomateux classique étant le plus souvent de haut grade. Dans les formes pures, un traitement par chimiothérapie doit être envisagé d'emblée, car les cellules NE se sont pas ou peu sensibles à la déprivation hormonale.

Il est important de préciser que le terme de CaP à différenciation NE recouvre d'autres entités faisant l'objet d'une classification incluse dans l'OMS 2016 des tumeurs prostatiques. La présence de quelques cellules NE dispersées au sein d'un CaP acinaire classique, n'a pas de particularités morphologiques ni d'impact pronostique. L'adénocarcinome prostatique de type « Paneth-like » est caractérisé par la présence, au sein d'un adénocarcinome standard, de cellules NE à granules éosinophiles intracytoplasmiques, qui n'ont également aucun impact pronostique sur la tumeur. Les autres tumeurs NE de la prostate sont exceptionnelles, qu'il s'agisse de la tumeur carcinoïde prostatique ou de métastase prostatique d'un carcinome NE d'autre origine, notamment pulmonaire.

L'origine des tumeurs NE est très controversée, néanmoins l'hypothèse la plus approuvée est la transdifférenciation à partir de cellules épithéliales. En effet, les cellules tumorales prostatiques de phénotype épithélial seraient capables, sous l'influence de facteurs encore mal connus, d'acquérir des caractéristiques de cellules NE (151). De plus, il a été observé que les cellules tumorales prostatiques peuvent acquérir un phénotype NE réversible, soulignant une plasticité de ces cellules pour s'adapter à leur environnement (152). Il a été montré qu'il existe un état de différenciation intermédiaire lors de la progression d'un adénocarcinome prostatique non NE exprimant le RA (RA+) au stade de CaP NE n'exprimant

pas le RA (RA-). L'existence de ce phénotype intermédiaire comprenant des cellules RA+ et RA- confirme la possibilité d'une interconversion entre les deux types cellulaires (153). Cependant, les mécanismes gouvernant une telle transdifférenciation NE restent très mal connus.

5.3 Cellules du CaP NE et résistance aux traitements

Les traitements hormonaux favorisent l'apparition d'un phénotype NE associé à une expression négative ou faible du RA dans un contexte de CRPC métastatique. En effet, depuis l'apparition des hormonothérapies de nouvelle génération, le nombre de CRPC métastatiques n'exprimant pas le RA a augmenté de 11 à 36% (154). C'est pourquoi il est capital de comprendre par quels mécanismes les traitements hormonaux favorisent la survenue du phénotype NE.

La dérégulation de facteurs de transcription et l'apparition d'anomalies génétiques participant à la différenciation NE sont associés aux traitements (155). Le facteur de transcription BRN2, surexprimé dans les CaP NE, module l'activité de SOX2, un activateur de la plasticité cellulaire (156). Le facteur de transcription TCF4, impliqué dans la voie de signalisation WNT, est capable d'induire la neurodifférenciation des cellules cancéreuses prostatiques résistantes à l'Enza (157). De plus, l'expression des facteurs de transcription OCT4 et Onecut2 est augmentée dans les CaP NE et participe à la régulation négative du RA (158,159). Onecut2 peut être directement réprimé par le facteur REST, qui est inhibé lors de la différenciation NE (160).

Plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur ont été associés à la perte d'expression du RA. La co-mutation des gènes suppresseurs de tumeur TP53 et PTEN fréquemment observée dans les CRPC, est associée à la résistance à l'acétate d'abiratérone et à la progression du cancer vers le phénotype NE (161). La surexpression de l'oncogène NMYC est associée à l'induction des marqueurs NE et de la protéine EZH2 qui régule négativement le RA (162). NMYC est capable de coopérer avec la kinase AURKA, leur surexpression induit l'expression des marqueurs NE et inhibe le RA (163).

Les cellules NE peuvent s'adapter face à la déprivation androgénique et échapper à la mort cellulaire programmée (164). Elles surexpriment certaines protéines anti-apoptotiques telles que la survivine (165) et Bcl-2 (166). Il a été montré que la surexpression de Bcl-2 favorise l'androgéno-indépendance des cellules LNCaP (114). De plus, la sphingosine

phosphate kinase 1 (SphK1), protéine anti-apoptotique, diminue la sensibilité des cellules du CaP face aux traitements anti-androgéniques. De plus, dans les LNCaP et C4-2B, la SphK1 est impliquée dans la transdifférenciation NE induite par déprivation androgénique (167).

Les capacités d'adaptation des cellules cancéreuses face aux thérapies anti-androgéniques contribuent à la survenue des CaP NE. Des thérapies adjuvantes ciblant ces adaptations cellulaires pourraient être judicieuses afin de limiter les phénomènes de résistances associés à la différenciation NE.

5.4 Epigénétique et CaP NE

La dérégulation des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN ou la modification post-traductionnelle des histones impacte la différenciation cellulaire et participe à l'initiation et la progression tumorale. Des études récentes montrent que des dérégulations épigénétiques sont associées au stade de CaP NE. Ces modifications réversibles influencent l'activité transcriptionnelle des gènes sans affecter leur séquence ADN et sont transmissibles lors des divisions cellulaires. Des marques épigénétiques caractéristiques des tumeurs NE ont été identifiées grâce à des études de séquençage du génome.

L'enzyme EZH2 (enhancer of zeste homologue 2), est une protéine du groupe Polycomb 2 (PRC2) qui joue un rôle majeur dans la répression transcriptionnelle via son activité d'histone méthyltransférase. Cette enzyme, associée à l'agressivité du CaP, est surexprimée dans les CRPC NE où elle agit comme un oncogène en utilisant une activité méthyltransférase indépendante du PRC2. EZH2 est alors capable d'interagir avec le RA pour activer ses gènes cibles malgré un contexte d'androgéno-indépendance (168). Plusieurs mécanismes d'activation de la différenciation NE par EHZ2 ont été mis en évidence. L'enzyme EZH2 peut être activée par le facteur de transcription TCF4, acteur majeur de la voie de signalisation Wnt/β-caténine qui est suractivée dans les CaP NE (169). De plus, EZH2 est capable d'interagir avec le facteur de transcription N-Myc pour activer des programmes neuronaux (162). L'activité enzymatique de EHZ2 serait couplée à l'expression accrue de la protéine CREB et cette association permettrait la répression transcriptionnelle du facteur anti-angiogénique TSP1 conduisant à une angiogenèse renforcée et l'apparition de caractéristiques NE (170). Enfin, la voie MEK/ERK favorise l'expression de la protéine EZH2 et son recrutement au niveau du promoteur du gène codant pour l'E-cadhérine, facilitant ainsi la plasticité épithélio-mésenchymateuse (171). De plus, une hyperméthylation et sous-expression du gène suppresseur de tumeur SPDEF, inhibiteur de la TEM, a été observée dans les cellules NE, NCI-H660 (172).

Plusieurs études ont mis en évidence le lien entre les modifications épigénétiques et la fonction du RA dans les CaP NE. Le RA serait capable de recruter des modificateurs d'histones responsables du changement de l'architecture chromatidienne et ainsi modifier la transcription de certains gènes impliqués dans l'apparition du phénotype NE (173).

Les cellules du CaP NE possèdent une structure chromatidienne particulière propice à l'activation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la différenciation NE. L'inactivation des protéines RB1 et TP53 est nécessaire pour la transition du phénotype épithélial vers le phénotype NE (174).

L'ensemble de ces données souligne la complexité et la dynamique du paysage épigénétique dans les CaP NE. L'utilisation d'inhibiteurs épigénétiques pourrait être un outil de choix pour reverser ou inhiber l'initiation des CaP NE. Il a notamment été démontré que l'inhibition de EHZ2, dans un modèle d'organoïde humain CRPC-NE n'exprimant pas le RA, diminue significativement l'expression du marqueur NE Syp (175).

IV. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

1. Définition et généralités

La TEM est un mécanisme dynamique et réversible finement régulé permettant aux cellules épithéliales d'acquérir des caractéristiques de cellules mésenchymateuses, par le biais de modifications architecturales et fonctionnelles. En effet, les cellules vont perdre leurs contacts intercellulaires ainsi que leur polarité, et leur cytosquelette va subir un réarrangement. Les cellules seront alors isolées les unes des autres et adopteront une morphologie fibroblastoïde. L'expression des marqueurs épithéliaux est alors réprimée au profit des marqueurs mésenchymateux. Ces nouvelles caractéristiques mésenchymateuses vont permettre aux cellules d'acquérir des propriétés migratoires et invasives. De plus, il a été montré que le processus de TEM permet aux cellules d'acquérir des propriétés de cellules souches telles que la capacité d'auto-renouvellement et de pluripotence (176).

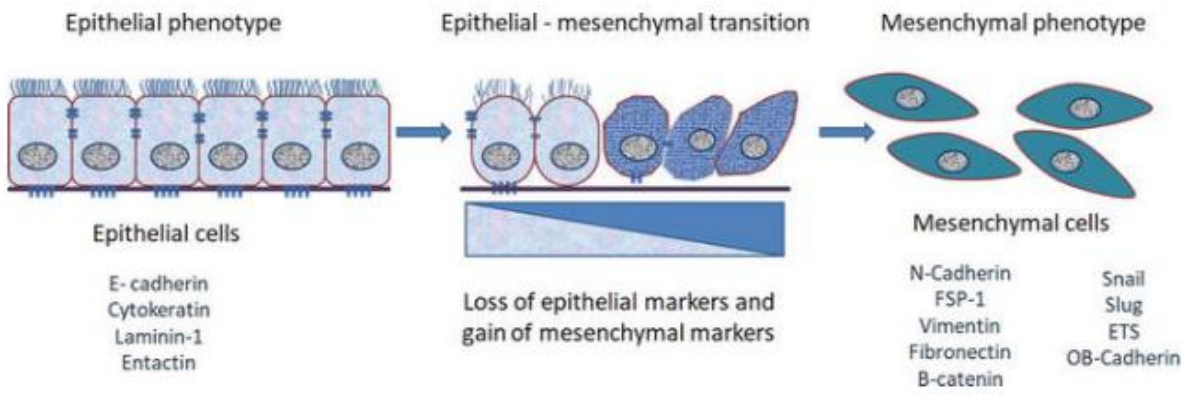


FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MECANISME DE TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.
Le processus de TEM se caractérise par la perte des jonctions intercellulaires, de la polarité cellulaire et une réorganisation du cytosquelette. L'expression des marqueurs épithéliaux, tels que la E-Cadhérine, est réprimée au profit des marqueurs mésenchymateux tels que la N-Cadhérine et la vimentine. Ces changements vont permettre aux cellules d'augmenter leur capacité de migration et d'invasion (Extrait de Eskiizmir and Özgür, 2018).

2. La TEM dans le processus tumoral

Le processus de TEM joue un rôle clé dans la progression tumorale, la dissémination et le développement métastatique. En effet, la TEM va permettre aux cellules cancéreuses de perdre leurs contacts intercellulaires et de sécréter des protéases telles que les MMP-2 et MMP-9, capables de dégrader la matrice extra-cellulaire, renforçant ainsi leurs capacités migratoires et invasives (177). Les cellules mésenchymateuses peuvent migrer individuellement, mais plusieurs études ont montré qu'elles ont tendance à migrer de manière collective afin d'envahir les tissus adjacents à la tumeur primaire (178). Les cellules mésenchymateuses peuvent également utiliser le système vasculaire pour envahir des sites dits secondaires, situés à distance de la tumeur primitive. Dans les sites métastatiques, les cellules subiront alors la transition inverse mésenchymateuse-épithéliale, elles adopteront alors un phénotype épithélial propice à la colonisation et la formation de métastases (177).

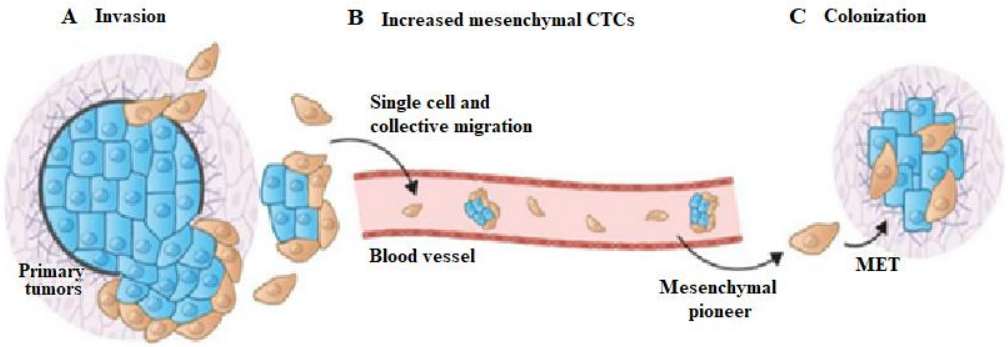


FIGURE 17 : IMPLICATION DE LA TEM DANS LE PROCESSUS TUMORAL
A : Sous l'action de la TEM, les cellules tumorales se désolidarisent de la tumeur primaire. B : Les cellules tumorales mésenchymateuses migrent de manière individuelle ou collective en utilisant la circulation sanguine. C : Les cellules tumorales mésenchymateuses colonisent un site distant de la tumeur primaire et subissent une transition mésenchymateuse-épithéliale propice à la formation de métastases (Zhang et al., 2018).

3. Les marqueurs associés à la TEM

Durant les premiers évènements de la TEM, les contacts intercellulaires vont être détruits. En effet, les protéines de type claudine et occludine, participant à la formation des jonctions serrées, vont être réprimées. La E-Cadhérine et les connexines, impliquées respectivement dans la formation des jonctions adhérentes et communicantes, sont elles aussi dégradées. A l'inverse, l'expression de la N-cadhérine, caractéristique des cellules mésenchymateuses, est augmentée.

La régulation négative de la E-cadhérine lors du processus de TEM est associée à l'agressivité tumorale. En effet, la perte d'expression de la E-cadhérine induit le facteur de transcription Snail qui participe à l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques PC3 (179). De plus, il a été montré que la diminution de l'expression de la E-cadhérine favorise la chimiorésistance des cellules cancéreuses prostatiques PC3 et DU145 en activant la voie de signalisation Notch (180). En clinique, la perte d'expression de la E-cadhérine est corrélée à l'augmentation du score de Gleason et à la diminution du taux de survie des patients (181).

De plus, il été montré que le facteur de transcription Zeb1 réprime l'expression de la laminine 332 qui assure notamment l'ancrage des cellules épithéliales à la membrane basale et de son récepteur, l'intégrine β4, dans les cellules PC3 (182). Ainsi les molécules d'adhérence telle que la laminine ne peuvent plus se fixer à leurs récepteurs cellulaires spécifiques, augmentant ainsi la migration et l'invasion des cellules cancéreuses.

La destruction des contacts cellulaires et la diminution de l'expression des protéines

impliquées dans la formation des compartiments apicaux et basolatéraux entraîne la perte de la polarité apico-basale (183).

De plus, le cytosquelette cellulaire va subir une réorganisation. L'expression des cytokératines, constituants des filaments intermédiaires, est réprimée alors que la vimentine est augmentée. En effet, de par sa structure dynamique, la vimentine apporte une certaine plasticité aux cellules mésenchymateuses (184). La formation de fibres de stress d'actine va induire l'apparition de protubérances membranaires tels que les lamellipodes et filopodes propices à la motilité cellulaire. En clinique, l'expression accrue de la vimentine par les cellules du CaP est associée à un score de Gleason élevé (181).

L'expression d'enzymes protéolytiques est fortement augmentée, notamment les métalloprotéases MMP2 et MMP9. Elles digèrent les protéines membranaires telles que le collagène et la laminine afin de dégrader la membrane basale et la MEC. Leurs actions renforcent ainsi les propriétés pro-invasives des cellules mésenchymateuses (185). La surexpression des métalloprotéases lors de la TEM est favorisée par le facteur de transcription Snail, participant ainsi à la progression tumorale (186). Il a été montré que les MMPs sont surexprimées dans les tumeurs de CaP présentant un score de Gleason élevé (187).

4. Les facteurs de transcription de la TEM

La transition d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription : les protéines Snail, Twist et Zeb. Ces facteurs peuvent coopérer entre eux afin de réprimer la transcription des gènes épithéliaux et/ou activer la transcription des gènes mésenchymateux.

4.1 Les protéines Zeb

La famille protéique des Zinc-Finger E-box-Binding compte parmi elle deux membres : Zeb1 (ou δEF1) et Zeb2 (ou SIP1). Ces protéines sont caractérisées par la présence de deux structures en doigts de zinc situées au niveau des extrémités N et C terminales et d'un homéo-domaine central. Le domaine N terminal est constitué de quatre doigts de zinc alors que le domaine C terminal n'en compte que trois (188).

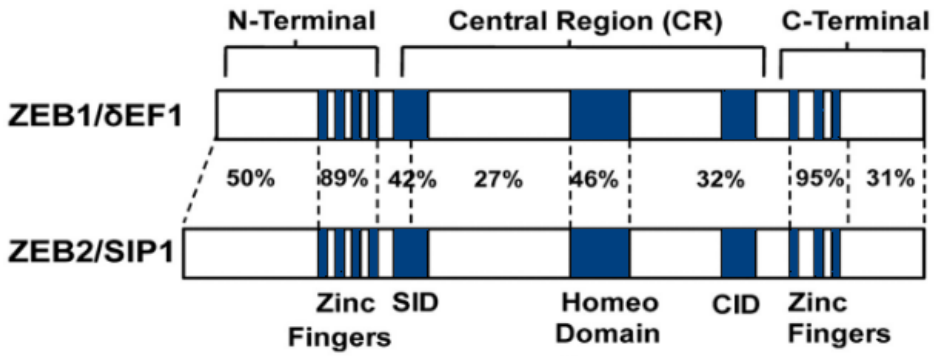


FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ZEB1 ET ZEB2 *(MODIFIE A PARTIR DE ELLIS ET AL., 2010).*

Ces protéines peuvent réguler la transcription des gènes de la TEM en se fixant directement sur leur ADN. En effet, leurs structures en doigts de zinc vont interagir avec des sites de liaison à haute affinité situés sur le promoteur de leurs gènes cibles, ces sites étant composés de boîtes E bipartites (CACCT et CACCTG) (188,189).

Zeb1 et Zeb2 possèdent un site d'interaction avec les protéines Smads, médiatrices de la voie de signalisation du TGFβ. Zeb1 active leur transcription en recrutant le co-activateur p300, alors que Zeb2 réprime leur transcription en recrutant le co-répresseur CtBP (190).

L'expression de Zeb1 peut être régulée par les androgènes qui participent à la progression du CaP. En effet, le gène *tcf8* codant pour la protéine Zeb1 possède deux éléments de réponse aux androgènes (ARE) sur son promoteur (191). Des expériences de délétion du promoteur du gène tcf8 ont montré que seule la région contenant l'ARE distal est régulée par le RA (222). Une rétro boucle négative a été identifiée entre le RA et Zeb1 dans le CaP et le cancer mammaire triple négatif (192,193). De manière intéressante, il a été montré que le RA agit comme un régulateur positif de Zeb2 dans les cellules androgéno-dépendantes LNCaP, alors que dans les cellules androgéno-indépendantes PC3 et DU145, il agit comme un régulateur négatif (194). La DHT est connue pour induire l'expression de nombreux microARN dont la famille des miR200 qui régulent négativement l'expression de Zeb1 et Zeb2 (195). En absence de RA, c'est la région de l'ARE proximal qui permet la régulation de Zeb1. (196). Zeb1 peut donc être régulé à la hausse dans les cellules du CaP n'exprimant pas ou plus le RA après traitement anti-androgénique. Dans un contexte de CRPC, il existe une émergence de variants du RA constitutivement actifs. Il a été montré qu'en présence de certains variants du RA

(ARQ640X et ARV7), les marqueurs de la TEM, dont Zeb1, sont surexprimés (197). De plus, il a été montré que la surexpression de Zeb1 favorise la résistance des cellules du CaP face à la déprivation androgénique via l'acquisition de caractéristiques des cellules souches (198). L'inhibition de Zeb1 pourrait donc être une stratégie pour le traitement des CRPC.

Les protéines Zeb1 et Zeb2 sont surexprimées dans un certain nombre de cancers notamment le CaP (199). Il a été montré que Zeb2 favorise la migration et l'invasion des cellules du CaP (PC3 et DU145) et participe également à l'acquisition des propriétés de cellules souches (200). La surexpression de Zeb1 a été corrélée aux capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses (201). Il a été montré dans une étude clinique menée au laboratoire que l'expression du facteur de transcription Zeb1 augmente selon les stades évolutifs du CaP (202), il a notamment été identifié comme étant un biomarqueur métastatique (203). De plus, chez les patients atteints d'un CRPC, l'expression de Zeb1 est associée à une diminution du taux de survie (202). Zeb1 est donc un marqueur d'agressivité et de mauvais pronostic du CaP.

Lors de la TEM, les protéines Zeb1 et Zeb2 participent à la régulation de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. En effet, Zeb1 réprime l'expression du marqueur épithélial, E-Cadhérine, et favorise l'acquisition de propriétés des cellules souches (auto-renouvellement, pluripotence), ce qui favorise la résistance des cellules cancéreuses prostatiques au docétaxel (204). Dans le modèle du cancer du sein, Zeb1 a été également associé à la résistance aux agents de chimiothérapie (205).

4.2 Les protéines Snail

Trois protéines de la famille Snail ont été identifiées chez les vertébrés : Snail1, Snail2 (Slug) et Snail3 (Smuc). Ces protéines ont une organisation commune avec un domaine C terminal hautement conservé comportant quatre à six doigts de zinc. Ces structures permettent la liaison des protéines Snail sur l'ADN de leurs gènes cibles au niveau d'éléments appelés boîtes E. Leur domaine N terminal contient un domaine SNAG conservé qui médie leur rôle de répresseur transcriptionnel (188). Enfin, leur domaine central moins conservé est riche en proline et sérine.

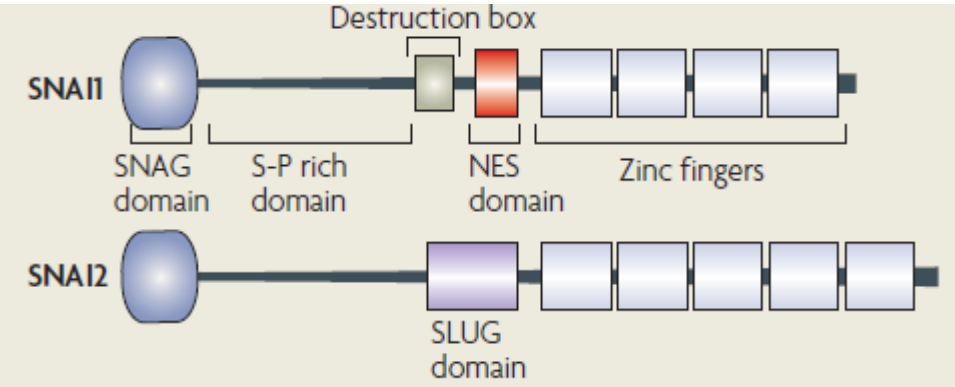


FIGURE 19 : STRUCTURE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SNAIL 1 ET SNAIL 2 *(PEINADO ET AL., 2007). Les facteurs de transcription Snail1 et Snail2 possèdent une région à 4 ou 5 doigts de zinc, une région riche en sérine/proline et un domaine de transactivation SNAG. (NES = Nuclear export sequence).*

Snail participe activement au processus de TEM en exerçant notamment un rôle de suppresseur transcriptionnel. Snail est capable d'interagir avec l'histone désacétylase HDAC1/2, entrainant une modification de la structure de la chromatine et bloquant l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine (206). Snail est également connu pour activer la transcription de plusieurs gènes mésenchymateux notamment la vimentine et les MMP-2 et MMP-9, favorisant ainsi la motilité cellulaire (207). De plus, Snail favorise la survie et inhibe la sénescence des cellules cancéreuses prostatiques PC3 et LNCaP (208).

L'expression des protéines Snail peut être régulée par de nombreuses molécules de signalisation du microenvironnement tumoral telles que les récepteurs à tyrosine kinase et le TGFβ. Des modifications post-traductionnelles telles la phosphorylation ou l'ubiquitination peuvent également réguler l'expression des protéines Snail (209). De plus, le RA peut réprimer l'expression de Snail en se fixant directement sur son élément de réponse au niveau du promoteur. Il a été montré que l'inhibition du RA par l'Enza lève cette répression et active le processus de TEM dans les cellules PC3 et C4-2 (210).

Les protéines Snail sont associées à un risque de CaP agressifs (grade ISUP 5) et sont surexprimées dans les stades métastatiques par rapport aux CaP localisés (211). Une étude clinique a identifié le facteur de transcription Snail comme étant un marqueur prédictif de la récidive du CaP chez les patients au stade T2 après prostatectomie radicale (212).

Snail a été associé à la formation de métastases. En effet, une étude a montré que le ciblage de la protéine SPOCK1 associée au facteur Snail lors du processus de TEM permet de diminuer le nombre de métastases dans un modèle murin de xénogreffe de cellules PC3 (213). De plus, Snail participe à la progression du CaP en favorisant la migration des cellules cancéreuses prostatiques 22RV1 via la voie de signalisation PIP3/Akt (214).

4.3 Les protéines Twist

Les protéines Twist possèdent un domaine conservé dit « hélice-boucle-hélice » (bHLH – basic helix-loop-helix) qui est organisé en deux hélices α séparées par une boucle inter-hélicoïdale. De par leur structure, les protéines Twist peuvent agir en tant que facteur de transcription en se liant à l'ADN au niveau des boîtes E. Chez les vertébrés, il existe deux formes de protéines Twist : Twist 1 et Twist 2 présentant 90% d'homologie. Leur domaine C terminal possède une « TWIST box ». Contrairement à Twist 2, la région N terminale de la protéine Twist 1 est enrichie en glycine (215).

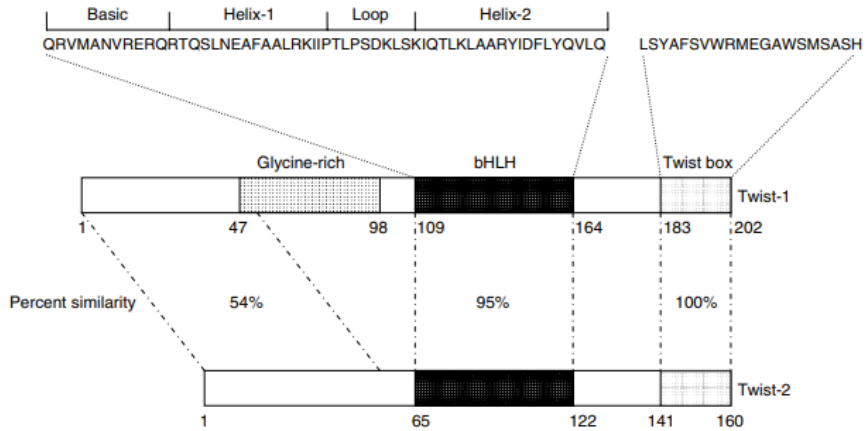


FIGURE 20 : STRUCTURE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION TWIST 1 ET TWIST 2 *(PUISIEUX ET AL., 2006). La partie N-terminale des protéines Twist possède une région riche en glycine qui est spécifique aux protéines Twist-1. La partie C-terminale possèdent un domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix) indispensable pour la dimérisation des protéines Twist et leur fixation à l'ADN au niveau des boites E, ainsi que la boite Twist qui permet notamment la fixation des protéines Twist sur le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Runx2 inductrice de la différenciation des ostéoblastes.*

Les protéines Twist jouent un rôle clé lors du processus TEM. En effet, il a été montré que Twist inhibe l'expression du marqueur épithélial E-Cadhérine et au contraire favorise l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-Cadhérine et la fibronectine (216,217).

Les protéines Twist sont surexprimées dans un grand nombre de cancers notamment les CaP, du sein, des ovaires et du côlon. Ces protéines sont décrites pour participer à l'agressivité tumorale. En effet, Twist favorise l'invasion et le développement de métastases dans un modèle préclinique du cancer du sein (218) et la chimiorésistance dans le carcinome épithélial de l'ovaire (219,220). Dans le CaP, l'expression accrue de Twist est associée à des critères d'agressivité dans les cancers localisés (221) et est augmentée dans les CRPC.

Ces trois grandes familles de protéines régulatrices de la transcription des gènes de la TEM peuvent agir en coopération. En effet, suite à l'induction de Zeb1, l'expression de Snail peut être augmentée. Les deux facteurs de transcription Twist et Snail coopèrent alors pour induire Zeb1 (222).

5. Les régulations post-transcriptionnelles de la TEM

Les modifications post-transcriptionnelles peuvent participer au processus de TEM.

5.1 Les miARN

Les miARN sont de courtes séquences ARN (18 à 25 nucléotides) simples brins non codants qui agissent comme des régulateurs post-transcriptionnels. Les miARN s'associent à un complexe protéique pour former le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) possédant des activités enzymatiques hélicase et endoribonucléasique. Ce complexe est capable de se fixer sur l'ARNm du gène cible afin d'induire sa dégradation complète ou l'altération de sa traduction.

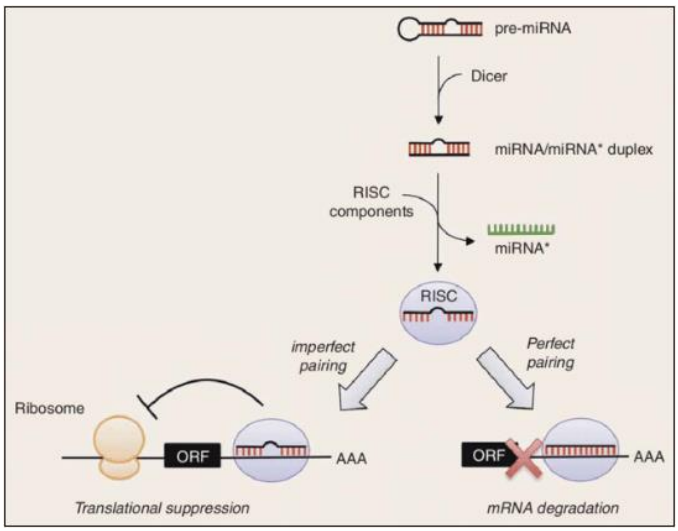


FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODE D'ACTION DES MIARN
Le pré-miARN libéré dans le cytosol de la cellule possède une structure en « tige-boucle ». L'endonucléase Dicer va hydrolyser la structure en boucle du pré-miARN pour libérer un duplex miARN/miARN correspondant à l'hybridation d'un miARN mature à un fragment de taille similaire provenant du bras opposé du pré-miARN. Le brin mature s'associe à un complexe protéique pour former le complexe RISC. La protéine Argonaute du complexe RISC permet au miARN mature de cibler d'autres transcrits par hybridation complémentaire afin d'induire sa dégradation complète ou l'altération de sa traduction (Gori et al., 2015).*

Les miARN peuvent réguler la TEM en réprimant l'expression des facteurs de transcription et des marqueurs de la TEM. Les miARN ciblant les marqueurs épithéliaux vont donc favoriser la TEM alors que ceux ciblant les marqueurs mésenchymateux auront plutôt un effet inhibiteur de la TEM.

Le facteur de transcription Snail est la cible de plusieurs miARN tels que les miR-34 et miR-203 (223,224). Snail peut également réprimer l'expression de ces miARN, il existe en effet une rétro boucle négative.

Les miARN de la famille des miR-200 sont connus pour inhiber les facteurs Zeb1 et 2. Il existe également une double rétroaction négative régulant l'expression de Zeb et des miR-200 (225). Durant le processus de TEM, l'inhibition des miR-200 augmente l'expression de Zeb1 et 2.

Dans le cas du CaP, de nombreux miARN ont été identifiés comme des régulateurs de l'apoptose, du cycle cellulaire, de la TEM, ils participent ainsi à la progression tumorale et notamment au développement métastatique (226).

5.2 L'épissage alternatif

L'épissage alternatif peut être altéré dans les cellules cancéreuses. Les isoformes protéiques de différents gènes comme par exemple le VEGF, la Cycline D1, la fibronectine ou encore Bcl-2, stimulent la prolifération, la migration et favorisent la résistance à l'apoptose et aux traitements anticancéreux (227).

Des modifications dynamiques de l'épissage alternatif de gènes impliqués notamment dans l'adhésion (CTNND1), la motilité (CD44) et la différenciation (FGFR) sont associées au processus de TEM. Ainsi, les protéines de liaison à l'ADN, RBPs (RNA Binding Proteins) régulent les évènements post-transcriptionnels des gènes impliqués dans la TEM. De plus, les protéines régulatrices de l'épissage ESRP1 et 2 (epithelial splicing regulatory protein) régulent l'épissage de nombreux gènes impliqués dans la TEM tels que la p120-caténine, CD44 et TCF4 (228). De plus, l'expression du facteur d'épissage RBFOX2 est augmentée durant la TEM et favorise l'invasion cellulaire (229).

6. Les activateurs de la TEM

6.1 Le TGFβ (transforming growth factor-β)

La superfamille des facteurs de croissance TGFβ compte trois isoformes, le TGFβ 1, 2 et 3, présentant 70% d'homologie. Cette superfamille comprend une quarantaine de protéines telles que les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), les activines et les inhibines (230). Ce facteur de croissance sécrété par les cellules du microenvironnement tumoral, telles que les macrophages et les adipocytes, est impliqué dans la carcinogenèse (231). Il a notamment été montré que les cellules cancéreuses elles-mêmes peuvent sécréter le TGFβ (232). Selon le stade de développement de la tumeur, le TGFβ peut exercer à la fois un rôle suppresseur de tumeur et pro-oncogénique (233).

La réponse cellulaire au TGFβ est initiée par sa fixation à un récepteur membranaire de type sérine/thréonine kinase TβRII. Le complexe hétérodimérique ainsi formé est capable d'activer le récepteur TβRI par phosphorylation au niveau de son domaine GS (domaine riche en guanine/sérine). La transduction du signal jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation de protéines cytoplasmiques conservées au cours de l'évolution, les protéines Smad. En réponse au TGFβ, le récepteur TβR1 phosphoryle les protéines Smad2 et Smad3 qui vont s'associer avec Smad4. Ce complexe pSmad2/3-Smad4 va agir au niveau nucléaire en tant que facteur de transcription. Le TGFβ peut également phosphoryler les protéines Smad1, 5 et 8, qui peuvent elles aussi s'associer à Smad4 pour former un complexe activateur de la transcription (234).

Cette voie canonique initiée par le TGFβ peut être réprimée afin de contrôler l'intensité et la durée de l'activation transcriptionnelle. En effet, les protéines Smad6 et 7 vont recruter l'ubiquitine ligase Smurf, qui va induire la poly-ubiquitination et la dégradation des récepteurs TβRI activés, au niveau du protéasome (235).

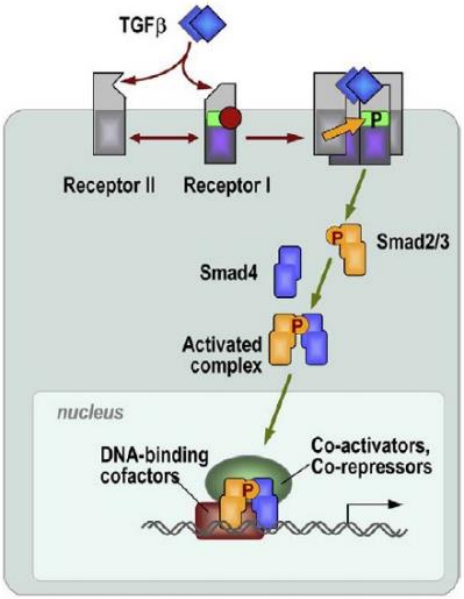


FIGURE 22 : VOIE DE SIGNALISATION CANONIQUE DU TGFB *(MASSAGUE ET AL., 2006).*
Le TGFβ se lie à son récepteur de type II (TβRII) qui possède une activité kinase intrinsèque grâce à laquelle il va phosphoryler le récepteur de type I (TβRI), formant ainsi un complexe hétérodimérique actif. La transduction du signal sera assurée par une série de phosphorylation des protéines Smad2 et Smad3 qui vont s'associer à Smad4 afin de former un complexe transcriptionnel actif au niveau nucléaire.

Par l'intermédiaire de cette voie dite canonique, faisant intervenir les protéines Smad, le TGFβ peut activer le processus de TEM (236). Il a été montré que les protéines Smad3 et 4 interagissent avec le facteur de transcription Snail pour former un complexe ciblant la E-cadhérine et la protéine CAR impliquée dans la formation des jonctions serrées (237). De plus, une étude a montré que le TGFβ est capable d'induire la TEM en activant le facteur de transcription Twist via la voie TGFβ/Smad3 (238). Dans une précédente étude menée au laboratoire, nous avons mis en évidence une nouvelle voie de signalisation, initiée par le TGFβ, qui participe à l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques PC3 et DU145. En effet, le TGFβ est capable d'induire l'expression du facteur de transcription Zeb1 par un mécanisme calcium-dépendant impliquant le canal potassique SK3 (72).

Par ailleurs, le TGFβ peut activer des voies de signalisation indépendantes des Smad. La protéine adaptatrice Smad7 favorise l'activation des voies de signalisation des MAPKinases avec ERK, p38 et JNK (Jun N-terminal kinase) qui activent les protéines activatrices c-Jun et c-Fos, la voie PI3K/AKT et la voie des guanosines triphosphatases (GTPases) (239). L'induction de la TEM par le TGFβ peut être médiée par l'ensemble de voies de signalisation qui sont interconnectées.

6.2 L'hypoxie

L'hypoxie est une caractéristique majeure du microenvironnement des tumeurs solides. En effet, le centre de la tumeur est mal vascularisé, réduisant ainsi les apports en oxygène entre 5 et 10 mmHg. Les traitements anticancéreux, les nutriments ainsi que l'oxygène qui utilisent la circulation sanguine ne peuvent plus atteindre le coeur de la tumeur, on parle de niche hypoxique. Les cellules cancéreuses développent alors des mécanismes d'adaptation au stress hypoxique renforçant la dissémination métastatique et la résistance aux traitements. L'hypoxie agit sur l'expression de nombreux gènes tels que le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1α) composé de la sous unité HIF-1α sensible à l'oxygène et la sous unité constitutive HIF-1β. Ce facteur permet aux cellules de s'adapter dans un environnement déprivé en oxygène en régulant de nombreux gènes impliqués notamment dans la motilité, la prolifération, la survie cellulaire ou encore l'angiogenèse. L'anhydrase carbonique IX (CAIX), induite par le facteur de transcription HIF, est un marqueur de l'hypoxie dans les tumeurs solides. En condition de normoxie, HIF-1α va être hydrolysé par l'enzyme prolyl-hydroxylase. La protéine suppresseur de tumeur pVHL (Von Hippel–Lindau protein) va ensuite médier l'ubiquitinylation du facteur HIF-1α hydroxylé en exerçant une activité ubiquitine ligase E3. Le facteur HIF-α sera ensuite dégradé par le protéasome. En condition hypoxique, l'ubiquitinylation de HIF-1 est inhibée, permettant ainsi sa stabilisation et sa translocation nucléaire, où il se dimérisera avec le facteur HIF-1β. L'hétérodimère HIF-1α/β s'associe avec des co-activateurs transcriptionnels p300/CBP afin d'activer la transcription des gènes cibles en se fixant sur des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) dans la région promotrice (240).

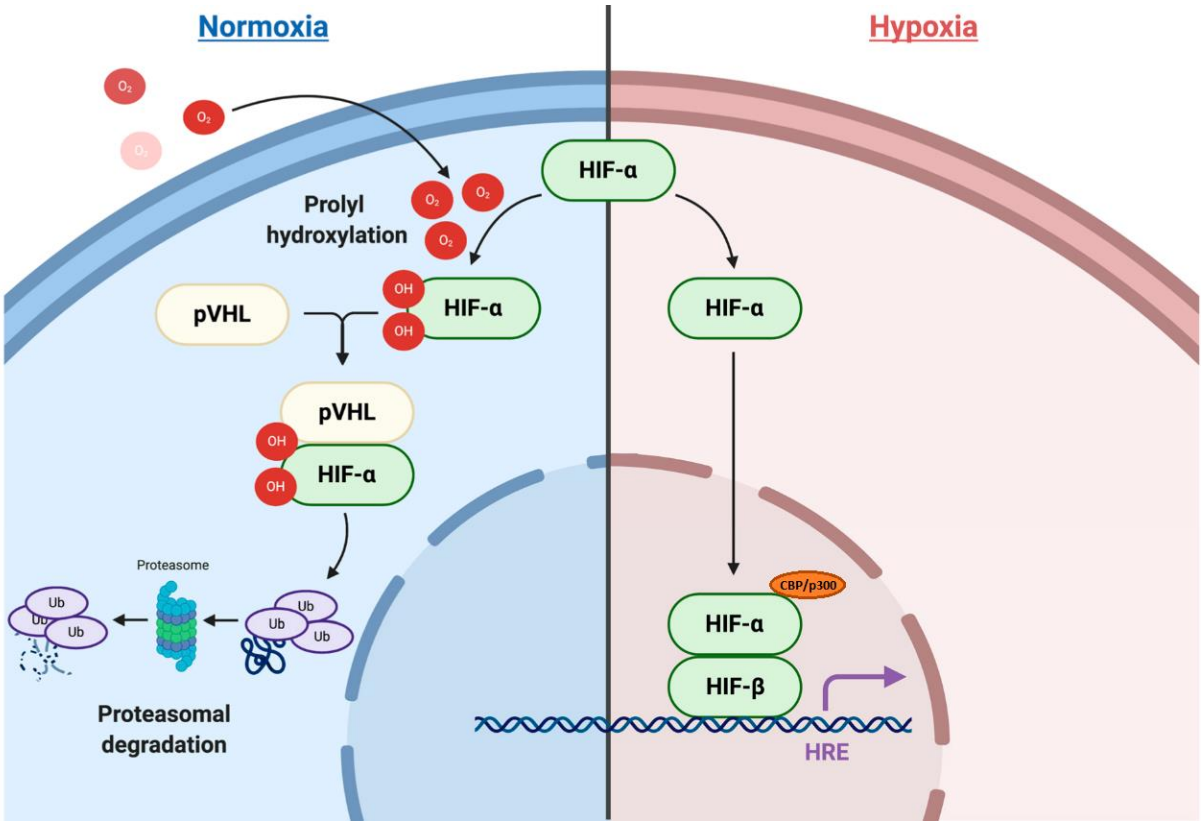


FIGURE 23 : DEGRADATION DU FACTEUR HIF1-A EN NORMOXIE ET MECANISME D'ACTION D'HIF-1A SOUS HYPOXIE *(VITO ET AL., 2020).*
En condition de normoxie, le facteur HIF-1α est dans un premier temps hydroxylé par la prolyl-hydroxylase, puis ubiquitinylé par la protéine pVHL qui possède une activité ubiquitine ligase. HIF-1α sera alors acheminé au protéasome pour être dégradé. En condition d'hypoxie, le facteur HIF-1α n'est pas ubiquitinylé, il est transloqué dans le noyau où il se dimérise pour former un hétérodimère HIF-1α/ HIF-1β. En s'associant à des coactivateurs, cet hétérodimère actif peut se fixer que le promoteur des gènes cibles au niveau des HRE.

L'hypoxie joue un rôle dans le processus de tumorigenèse. En effet, l'expression de HIF-1α et HIF-1β est augmentée dans différents cancers tels que les cancers mammaires, ovariens, colorectaux et prostatiques. Dans le modèle du CaP, une étude clinique a montré que HIF-1α participerait aux évènements précoces du CaP (241). De plus, une méta-analyse récente a démontré que l'expression de HIF-1α est supérieure dans les stades T3/T4 comparée aux stades T1/T2 de la maladie et est corrélée à la présence de métastases osseuses et ganglionnaires (242). Le facteur HIF-1α joue donc un rôle dans les évènements précoces du CaP mais également dans sa progression vers le stade d'androgéno-indépendance.

L'hypoxie renforce l'agressivité des cellules cancéreuses notamment en favorisant l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui active le processus d'angiogenèse. Les cellules tumorales acquièrent une résistance aux conditions hypoxiques notamment à l'apoptose hypoxique (243). Dans les cellules cancéreuses prostatiques PC3 cultivées en condition hypoxique, l'induction du VEGF favorise la migration cellulaire (244).

De plus, l'hypoxie favorise la résistance des cellules cancéreuses aux traitements, en induisant une diminution du pH dans le microenvironnement tumoral (240). L'acidité favorise l'expression du gène MDR1 (MultiDrug Resistance 1) codant pour la glycoprotéine P-gp (multidrug transporter p-glycoprotein) qui participe à l'efflux des molécules thérapeutiques (245). Il a été montré que dans les cellules cancéreuses prostatiques, l'hypoxie induit une résistance au docétaxel (246).

Plusieurs études ont mis en évidence des liens entre les voies de signalisation activant l'hypoxie et le processus de TEM (247). L'hypoxie peut favoriser la TEM en régulant les facteurs de transcription impliqués. Parmi les médiateurs de l'hypoxie, il a été montré que HIF-1α augmente l'expression de facteurs de transcription clé de la TEM tels que Twist et Snail. (248). HIF-1α peut également réguler Zeb1 qui possède quatre HRE au niveau de sa région promotrice (249). Une voie de signalisation HIF-1α/Zeb1 initiée par l'hypoxie a notamment été décrite dans plusieurs types de cancer (250,251).

Le TGFβ1 peut également intervenir dans l'induction de la TEM par l'hypoxie. En effet, en condition hypoxique le TGFβ1 inhibe la prolyl hydroxylase, responsable de l'hydroxylation de HIF-1α, par l'intermédiaire de la voie de signalisation dépendante des protéines Smad (252). Ainsi, la dégradation du facteur HIF-1α est inhibée, il favorise alors l'expression des facteurs clé de la TEM.

Les voies de signalisation Notch et PI3K/Akt sont également impliquées dans l'induction de la TEM sous hypoxie (253,254).

6.3 Les androgènes

Les androgènes participent à l'agressivité tumorale notamment en favorisant le processus de TEM. En effet, lorsque les cellules cancéreuses prostatiques PC3 sont cultivées en présence de DHT, l'expression du facteur de transcription Snail est augmentée et associée à une migration cellulaire accrue (255). Par ailleurs, l'interaction entre la voie de signalisation du TGFβ et les androgènes pourrait être déterminante dans l'induction du processus de TEM (256). En effet, il a été montré que les protéines Smad 3 et 4 peuvent interagir avec le RA au niveau de son domaine de liaison au ligand et ainsi moduler sa transactivation (257). Une autre étude a montré que le gène tcf8 codant pour la protéine Zeb1 est régulé par les androgènes, deux ARE (Androgen Response Element) étant présents au niveau de son promoteur (191).

Une boucle de rétroaction négative a été mise en évidence entre le RA et Zeb1 (192), l'expression du RA étant inversement corrélée à l'induction de la TEM. Il a été montré que la

déprivation androgénique induit la TEM dans les cellules cancéreuses prostatiques (192,210). L'induction de Zeb1 observée lors du blocage androgénique pourrait être expliquée par une forte inhibition des miR-200 connus pour réguler négativement Zeb1 (258). Une étude a démontré que l'expression de Zeb1 est inversement corrélée à celle de miR200 (191). De plus, dans la région 3'UTR (untranslated region) du gène codant pour la protéine Zeb1, il existe 8 sites de reconnaissance des miR200 (259). Enfin, la déprivation androgénique a été associée à l'augmentation du marqueur mésenchymateux N-cadhérine dans un modèle de xénogreffe de cellule LNCaP chez la souris. Ainsi, la faible expression du RA sous déprivation androgénique est favorable à l'induction de la TEM par les androgènes et participe à l'agressivité et la progression tumorale.(260).

6.4 Le calcium

De récentes études montrent que la signalisation calcique pourrait être impliquée dans les évènements précoces de la TEM (261). Ainsi, les inducteurs de la TEM, tels que le TGFβ et l'hypoxie, induisent une augmentation transitoire de la concentration de calcium cytosolique (262,263). Dans les cellules cancéreuses, l'homéostasie calcique est dérégulée. Ainsi, des complexes canalaires composés de canaux calciques (transient receptor potential (TRP), Orai) et du canal potassique SK3 (small conductance calcium-activated potassium channel 3) sensible au calcium, permettent une entrée massive de calcium favorisant la migration, l'invasion et la formation des métastases (40,264).

Des variations d'expression des canaux calciques et potassiques sensibles au calcium ont été montrées dans plusieurs types de cancers en association avec le processus de TEM. Ainsi, le canal potassique sensible au calcium SK4 régule la TEM dans les cellules cancéreuses mammaires triple négatives (265). Le canal calcique TRPM7 (Transient receptor potential channel mélastatine 7) a été identifié comme un régulateur positif de l'expression de la Vimentine, favorisant ainsi la motilité cellulaire (266). Dans les cellules MDA-MB-231, l'expression des canaux calciques Orai1 et TRPC1 est altérée lors du processus de TEM (267). Le canal calcique TRPM8 a été identifié comme étant promoteur de la dissémination métastatique en régulant la TEM via la voie de signalisation AKT/GSK-3β (268). Le canal TRPM8, dont l'expression augmente selon les stades évolutifs du CaP, est régulé par les androgènes. En effet, la testostérone serait un agoniste de ce canal (269).

Au laboratoire, nous avons récemment mis en évidence que l'entrée calcique induite par le TGFβ entraîne une augmentation de l'expression de Zeb1 dans différentes lignées

cancéreuses prostatiques (PC3 et DU145). Ce facteur de transcription est capable d'activer l'expression du canal SK3, qui, une fois adressé à la membrane, amplifie l'entrée de calcium impliquée dans la migration des cellules cancéreuses (72).

De plus, l'inhibition du canal calcique TRPM4 dans les cellules PC3 diminue leur pouvoir migratoire et l'expression des marqueurs Snail, MMP9, N-cadhérine. A l'inverse, la surexpression de ce canal dans les cellules LNCaP augmente l'expression de Snail, des marqueurs mésenchymateux ainsi que la migration cellulaire (270).

Dans les cellules cancéreuses, le processus de TEM est donc associé à un remodelage de l'influx calcique et notamment de l'activité et/ou de l'expression des canaux ioniques perméables au calcium. La signalisation calcique joue donc un rôle important dans l'agressivité et la progression des cellules tumorales.

7. TEM et différenciation NE

L'inhibition de la signalisation du RA, qui peut induire un processus de différenciation NE, est également connue pour réactiver des programmes embryonnaires associés à la TEM et l'acquisition de propriétés de cellules souches (271–273). Les liens entre les processus de différenciation NE et de TEM ont été assez peu étudiés.

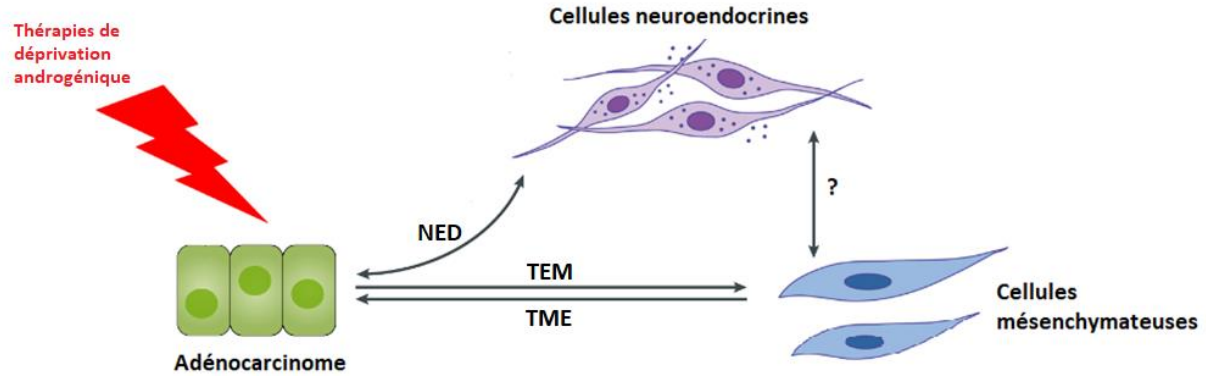


FIGURE 24 : EFFET DES THERAPIES DE DEPRIVATION ANDROGENIQUE SUR LE PHENOTYPE DES CELLULES DU CAP.
Les thérapies de déprivation androgénique peuvent induire la TEM mais également la transdifférenciation NE des cellules du CaP.

La signalisation du RA participe à la régulation de la TEM. En effet, l'inhibition du RA par l'Enza, augmente significativement l'expression de Zeb1 (Zinc-Finger E-box-Binding), facteur de transcription clé de la TEM (210). A contrario, l'activation du RA par les androgènes,

inhibe l'expression de Zeb1, ainsi il existe une rétro-boucle négative impliquant le RA et Zeb1 (192).

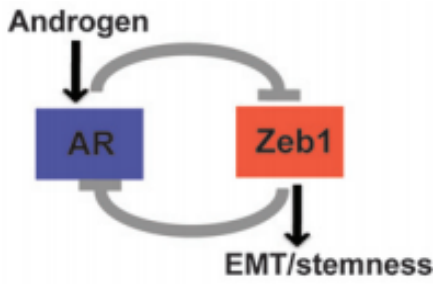


FIGURE 25 : RETRO-BOUCLE NEGATIVE ENTRE LE RA ET LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION ZEB1 *(SUN ET AL., 2012).*

Certains facteurs de transcription favorisant la TEM agissent comme des promoteurs de la différenciation NE. Le facteur Snail, connu pour réguler la TEM, est impliqué dans l'acquisition du caractère NE. Son inhibition dans des cellules LNCaP neurodifférenciées diminue l'expression des marqueurs NE NSE et CgA (274). De plus, une analyse *in silico* d'échantillons tumoraux humains a montré une forte corrélation entre le facteur de transcription Brachyury, qui joue un rôle clé dans les processus de la TEM, et les marqueurs NE CgA et Syp (275).

La TEM est également régulée par le facteur de transcription REST (repressor element-1 silencing transcription factor) qui inhibe Twist, facteur inducteur de la TEM et agit donc comme un répresseur. Par ailleurs, la dérégulation de REST est associée à la prévalence des CaP NE (160). En effet, REST joue un rôle dans la neurogénèse et agit comme un répresseur de la transcription des gènes neuronaux. L'inhibition de l'expression de REST favorise la différenciation NE et le processus de TEM (276). Cette inhibition est retrouvée dans 50% des CaP NE.

L'ensemble de ces données suggèrent que sous certaines conditions ces processus de TEM et de différenciation NE peuvent dépendre l'un de l'autre. Néanmoins, les liens entre ces deux mécanismes extrêmement régulés demeurent encore peu élucidés.

V. La signalisation calcique

Le calcium est le cation le plus abondant du corps humain qui agit en tant que second messager permettant la transduction intracellulaire d'un stimulus extracellulaire. Ainsi, le calcium participe à de nombreux processus cellulaires tels que la contraction musculaire, la différenciation, la prolifération et la migration cellulaire, le contrôle de l'apoptose ou encore la transcription des gènes.

Au niveau cellulaire, la signalisation calcique est finement régulée. Une concentration calcique cytosolique élevée et prolongée devient cytotoxique pour la cellule. C'est pourquoi, en absence de stimulation, une faible concentration calcique cytosolique est maintenue (100nM). Les concentrations calciques extracellulaires sont, quant à elles, beaucoup plus élevées (>1mM). Afin de réguler cette homéostasie calcique, les cellules possèdent des canaux ioniques, des pompes ainsi que des échangeurs présents au niveau de la membrane plasmique et également sur la membrane des organites (277). La compartimentalisation des ions calciques engendre l'apparition de gradients calciques entre les différents organites ainsi qu'entre les milieux intra et extracellulaire.

La signalisation calcique s'organise en 4 grands axes : suite à un stimulus, des signaux mobilisateurs de calcium seront recrutés pour permettre l'augmentation de la $[Ca^{2+}]i$, on parle de mécanisme ON. Cette augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ stimule diverses voies de signalisation cellulaires. La réponse se termine par un mécanisme OFF qui restaure la $[Ca^{2+}]i$ à son niveau basal (278). Les sources de calcium utilisées par les cellules proviennent du milieu extracellulaire mais également des organites de la cellule notamment le RE et la mitochondrie. La libération des sources de calcium implique des canaux, pompes ou échangeurs (279). Le signal calcique peut se propager de différentes manières en fonction de l'intensité du stimulus et dans un contexte spatio-temporel précis. Il existe des signaux calciques en oscillation, en bouffée (puff), en étincelle (spark), en pic (spike) ou encore en vague (wave) (278).

Des dérégulations de la signalisation calcique ont été identifiées dans plusieurs pathologies telles que la dystrophie musculaire, le diabète de type 2, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la leucémie myéloïde chronique (280) et dans un certain nombre de cancers (281).

1. Les entrées calciques de la membrane plasmique des cellules non excitables

Il existe 2 types d'entrées calciques au niveau de la membrane des cellules non excitables. Une entrée calcique dépendante des réserves calciques des organites et plus particulièrement le RE, il s'agit de l'influx SOCE (Store Operated Calcium Entry). Et une entrée indépendante des réserves calciques de la cellule, l'influx SICE (Store Independent Calcium Entry).

1.1 L'entrée calcique capacitive ou SOCE

L'influx SOCE est l'entrée calcique majoritaire dans les cellules non excitables. Cette entrée SOCE du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire est déclenchée suite à la vidange des stocks calciques du RE (282). En effet, suite à la fixation d'un agoniste d'un récepteur couplé à la phospholipase C (PLC), le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) va être hydrolysé en inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) et 1,2-diacylglycérol (DAG) sous l'action de la PLC. La fixation de l'IP3 sur son récepteur présent sur la membrane du RE va induire la sortie de calcium du RE. Cette diminution de la [Ca^{2+}] réticulaire va être détectée par les protéines STIM (Stromal Intereraction Molecule) présentes au niveau de la membrane du RE, ce qui va induire leur activation et multimérisation (283). En effet, les motifs EF-hand N-terminaux des protéines STIM leur confèrent leur sensibilité au calcium. Ce changement conformationnel permet le rapprochement des protéines STIM vers la membrane plasmique, où

elles vont interagir avec les canaux calciques membranaires Orai et TRP et induire leur activation pour permettre l'entrée de calcium dans la cellule.

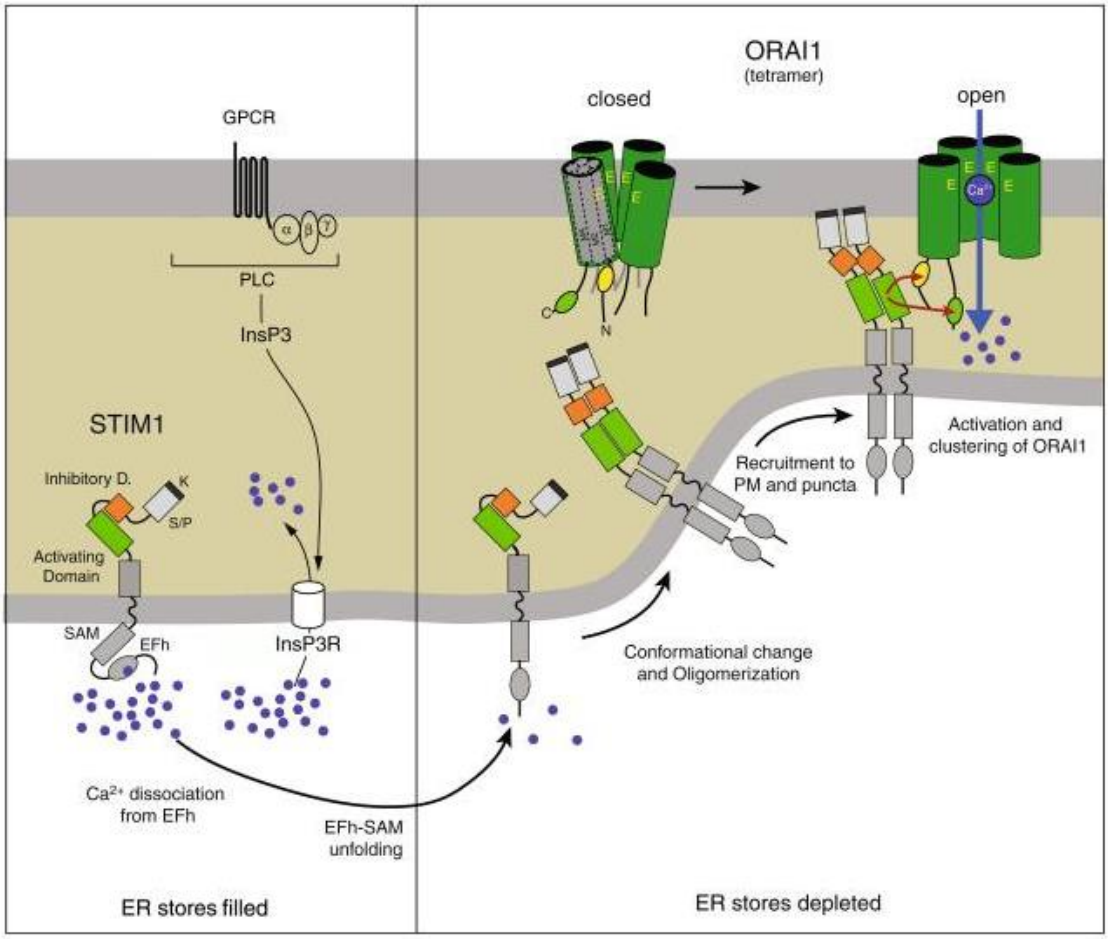


FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INFLUX SOCE
L'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) active la phospholipase C qui hydrolyse le PIP2 en IP3 et DAG. L'IP3 se fixe sur son récepteur présent sur la membrane du RE et permet la libération des réserves calciques du RE. Ceci induit un changement de conformation de la protéine STIM1, son domaine de liaison au calcium (EFh). Les protéines STIM1 déplient leur domaine C terminal dans le cytosol et s'oligomérisent entre-elles. Cette oligomérisation permet l'interaction avec le canal Orai1 au niveau de la membrane plasmique, formant ainsi des puncta : cette interaction entraine un changement de conformation du canal Orai1 et une entrée de calcium dans la cellule (Extrait et modifié à partir de Feske et al. 2007).

1.2 L'entrée calcique ARC

Parmi les entrées SICE, on retrouve l'entrée calcique médiée par les canaux ARC (Arachidonate-Regulated Calcium) hautement sélectifs pour le calcium et activés par de faibles concentrations en acide arachidonique (AA) (2-8µM) (284). Cet influx ARC est complètement indépendant des réserves calciques intracellulaires. Le pore du canal est un hétéropentamère composé de trois sous-unités Orai1 et deux sous-unités Orai3 (285). Le domaine N terminal des sous-unités de Orai3 est responsable de la sélectivité pour l'AA (286). Il a été montré que les protéines STIM1 constitutivement présentes au niveau de la membrane plasmique, régulent

l'activité des canaux ARC et cette régulation est dépendante de la présence d'acide arachidonique (287). L'inhibition des protéines STIM1 membranaires, diminue considérablement l'entrée calcique médiée par les canaux ARC sans impacter l'influx SOCE (287).

L'influx calcique ARC est induit par la phosphorylation des protéines STIM1 au niveau de la membrane plasmique par la protéine kinase A (PKA) sous l'action de la protéine AKAP79 (288).

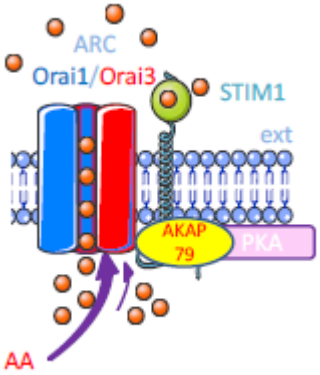


FIGURE 27 : SCHEMA DE L'INFLUX ARC MEDIE PAR ORAI1/ORAI3 *(THESE DE M. GUEGUINOU).*

1.3 L'entrée constitutive

L'entrée calcique constitutive est définie par une entrée de calcium permanente dans le cytoplasme de la cellule en absence de tout stimulus, médiée par des canaux calciques de type Orai et/ou TRP constitutivement ouverts (289).

Il a été montré que l'association du canal calcique Orai1 avec la protéine SPCA2 (Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase 2), une ATPase responsable de la séquestration du calcium dans l'appareil de Golgi, induit un influx calcique indépendamment des réserves calciques du RE (290).

Les protéines STIM jouent également un rôle dans l'entrée constitutive de calcium. Il a été montré que les protéines STIM2 présentes au niveau de la membrane plasmique sont capables d'interagir avec les canaux calciques Orai1 afin de médier l'entrée constitutive de calcium (291). De plus, dans le modèle de la leucémie lymphoïde chronique, les protéines STIM1 présentes à la membrane plasmique sont associées aux canaux Orai1 et TRPC1, induisant une entrée constitutive de calcium (292).

Par ailleurs, l'entrée constitutive peut également être médiée par un complexe canalaire impliquant des canaux calciques et le canal potassique SK3. En effet, le canal calcique Orai1 peut être associé au canal potassique à petite conductance SK3, à la membrane plasmique au niveau de nanodomaines enrichis en cholestérol. L'activité du canal SK3 va permettre l'efflux d'ions potassiques responsables d'une hyperpolarisation de la membrane plasmique, renforçant ainsi la force électromotrice pour le calcium et entrainant ainsi une entrée massive de calcium par le canal Orai1. L'augmentation de la [Ca^{2+}] cytosolique induit alors l'efflux de potassium. Cette boucle ainsi formée, favorise la migration, l'invasion et la formation de métastases (40).

De plus, une étude a montré que l'influx constitutif peut également être médié par le canal Orai1 associé au canal potassique Eag1 (Human ether à-gogo), favorisant la migration des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (293).

2. Acteurs calciques et potassiques impliqués

2.1 Les canaux calciques Orai

Les canaux Orai font partis des canaux CRAC (calcium release-activated calcium channel) responsables de l'entrée SOCE. Ils sont constitués de quatre domaines transmembranaires avec des domaines N et C-terminaux intracellulaires. Le domaine N-terminal contient un site de liaison à la calmoduline, et le domaine C terminal contient une superhélice. Il existe trois isoformes Orai1, Orai2 et Orai3, capables de s'assembler pour former des homo ou hétéro-tétramères (294). Les protéines Orai1 se distinguent par la présence d'une région riche en proline/arginine au niveau de leur domaine N-terminal. Les protéines STIM vont interagir avec les canaux Orai majoritairement au niveau de leur domaine C-terminal mais également au niveau du domaine N-terminal.

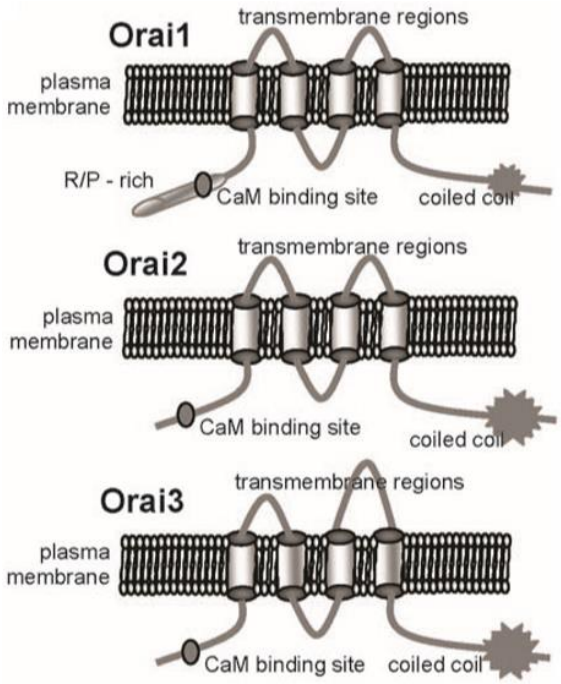


FIGURE 28 : STRUCTURE DES PROTEINES ORAI (FRISCHAUF ET AL., 2008).

L'expression de la protéine Orai1 augmente dans les CaP cliniquement localisés par rapport aux tissus sains. Par contre, lors de la transition du CaP vers la résistance à la castration, l'expression du canal Orai1 est diminuée (295), par conséquent, l'influx SOCE est alors réduit. Cette régulation négative préserve les cellules cancéreuses prostatiques des stimuli pro-apoptotiques tels que le TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α), la cisplatine ou encore la thapsigargine (296). Ainsi, le canal Orai1 a un rôle dans l'établissement d'un phénotype résistant à l'apoptose dans le CaP.

Le canal Orai3 est également surexprimé dans le CaP comparé aux tissus sains. Cette surexpression favorise la formation d'hétéromères Orai3/Orai1. Ces canaux ainsi formés permettent l'influx SOCE participant à la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques (297). Ainsi, dans le CaP, les protéines Orai ont un rôle déterminant dans l'agressivité des cellules cancéreuses.

Le rôle du canal Orai2 dans le CaP n'est actuellement pas connu.

2.2 Les protéines STIM

Les protéines transmembranaires STIM sont des senseurs au calcium capables de réguler les canaux CRAC. Il existe deux isoformes : STIM1 et STIM2. Le gène STIM1 est localisé sur le chromosome humain 11p15.5 alors que le gène STIM2 est situé sur le chromosome humain 4p15.2.

Au niveau de leur extrémité N-terminale, les deux isoformes possèdent un domaine SAM (stérile α motif) et un motif EF Hand situé à la lumière du RE, permettant leur rôle de senseur calcique. Elles possèdent un domaine transmembranaire ainsi que deux domaines en superhélice « coiled-coil » et un domaine SOAR (STIM1 Orai1-activating region) responsable de l'interaction avec les protéines Orai (298).

La protéine STIM1 est présente sur la membrane du RE et la membrane plasmique tandis que STIM2 n'est présente qu'au niveau de la membrane réticulaire (299).

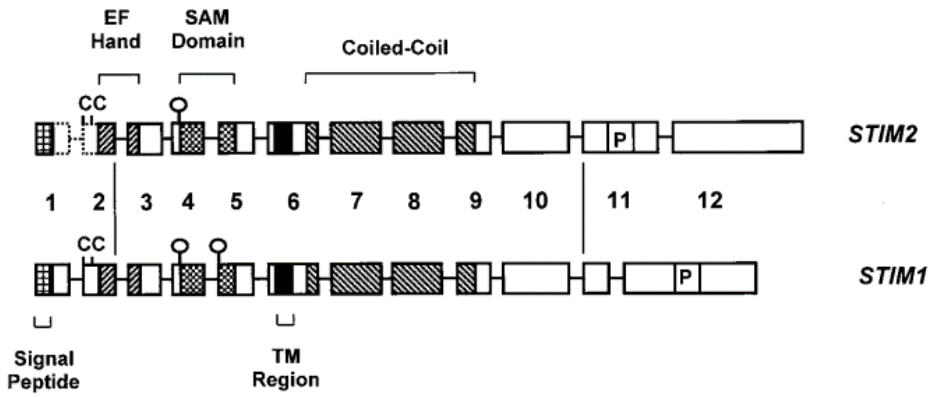


FIGURE 29 : STRUCTURE DES PROTEINES STIM *(WILLIAMS ET AL., 2001).*

L'expression de la protéine STIM1 est augmentée dans les CaP cliniquement localisés par rapport aux tissus sains, est diminuée dans les CRPC, et elle est de plus corrélée à celle du RA (295). Comme il existe un site de liaison du RA sur le promoteur de STIM, les androgènes sont susceptibles de réguler l'expression de STIM1 (300).

Une étude a montré que STIM peut inhiber la croissance cellulaire en bloquant le cycle cellulaire en phase G0/G1, favorisant ainsi la sénescence des cellules du CaP. De plus, par son effet inducteur du TGFβ, STIM1 a également un rôle dans la migration des cellules du CaP (301).

2.3 Les canaux TRP (Transient Receptor Potential)

La superfamille des canaux TRP est regroupée en 7 groupes : les TRPC1-7 Canonique, les TRPV1-6 Vanilloïde, les TRPM1-8 Mélastatine, les TRPP1-3 Polycystine, les TRPML Mucolipine, les TRPA Ankyrine et les TRPN (nompC). Chaque sous-unité des TRP est constituée de 6 segments TM et deux domaines N et C-terminaux intracellulaires. Un petit segment hydrophobe présent entre les segments TM 5 et 6 participe à la formation du pore du canal. Les TRP s'assemblent en homo ou hétéro-tétramères.

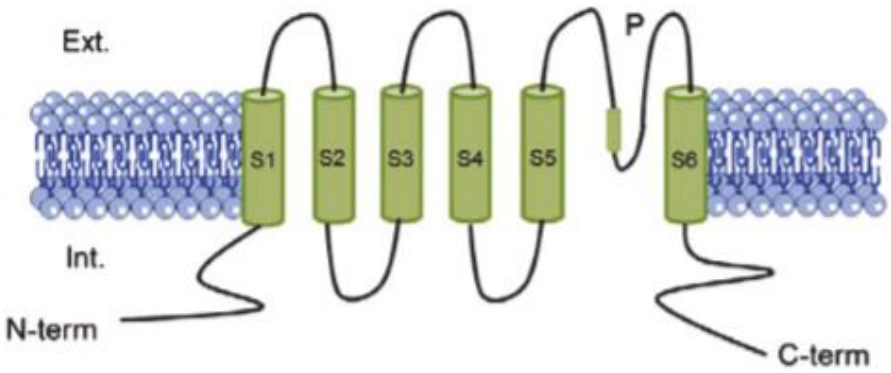


FIGURE 30 : STRUCTURE DES CANAUX TRP *(GUEGUINOU ET AL., 2014).*

Les TRP sont perméables aux cations et notamment au calcium hormis les TRPM4 et TRPM5.

Le rôle du canal TRPM8 a été beaucoup étudié dans le CaP. Ce canal peut être activé par le froid, le menthol mais également par les androgènes, car il possède un élément de réponse aux androgènes au niveau de son promoteur. Certaines études décrivent un rôle plutôt « protecteur » du TRPM8 dans le CaP. En effet, sa surexpression dans les cellules PC3 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et facilite l'entrée en apoptose des cellules (302). De plus, son activation par le PSA induit son accumulation au niveau de la membrane plasmique ce qui diminue la motilité cellulaire (303).

D'autres canaux TRP ont plutôt un effet « inducteur » du CaP. Le canal TRPV6 a été décrit comme un marqueur pronostic du CaP, car il est corrélé au grade ISUP et au stade de progression (304). Des études *in vitro* ont montré que l'inhibition du canal TRPV6 par siARN diminue la prolifération des cellules LNCaP (305).

Par ailleurs, l'expression du canal TRPV2 augmente selon les stades de progression du CaP. *In vitro*, la surexpression de TRPV2 favorise la migration cellulaire des cellules LNCaP, tandis que son inhibition diminue la croissance des PC3 et l'expression des marqueurs de l'invasion tels que la MMP-9 (306).

2.4 Le CaSR

Le CaSR est un récepteur appartenant à la classe III des RCPG. Il est exprimé dans plusieurs organes tels que les reins, les os, l'intestin, le foie ou encore le cerveau. Sa structure, conservée entre les espèces, est répartie en 4 domaines :

- un long domaine N-terminal extracellulaire organisé en motif Venus-flytrap contenant la majorité des sites de liaison au ligand. Ce domaine serait composé de deux lobes qui se fermeraient après fixation du ligand, permettant ainsi la transmission du signal via les domaines transmembranaires (307).

- une région riche en cystéine connectant le domaine N-terminal au premier segment transmembranaire (TM) et jouant un rôle dans la dimérisation du récepteur

- sept segments TM

- un domaine C-terminal intracellulaire permettant l'interaction avec les effecteurs tels que les protéines G mais également son adressage à la membrane plasmique (308).

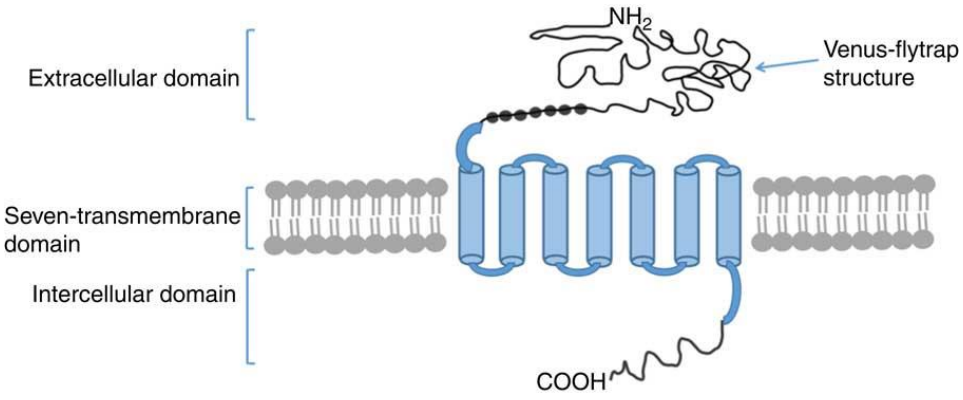


FIGURE 31 : STRUCTURE DU CASR *(LIU ET AL., 2018).*
Le CaSR possède un domaine N terminal extracellulaire constitué d'un motif Venus-flytrap qui contient la majorité des sites de liaison au ligand, 7 domaines transmembranaires et un domaine C terminal intracellulaire.

Le CaSR est fonctionnel lorsqu'il se dimérise au niveau de la membrane plasmique. Dans la majorité des cas, il est présent sous forme d'homodimère mais il peut former un hétérodimère avec d'autres RCPG tels que les récepteurs métabotropiques du glutamate qui ont une structure proche de celle du CaSR.

Le calcium est un agoniste naturel et endogène présentant la plus forte affinité pour le CaSR. Il existe d'autres ligands du CaSR qui se fixent sur le même site de liaison que le calcium avec une plus faible affinité, on parle d'agonistes orthostériques. C'est le cas de certains cations divalents et trivalents (Mg^{2+}, $Al3^{+}$, $Sr2^{+}$, $Mn2^{+}$, $Ni2^{+}$, $Gd3^{+}$, and Ba^{2+}), de certains antibiotiques tels que la néomycine ou de polyamines telles que la spermine. Il existe également des modulateurs allostériques positifs ou négatifs du CaSR qui ne se fixent pas sur le site de liaison du calcium mais sur des sites allostériques au niveau du domaine N-terminal ou sur les boucles extracellulaires des domaines transmembranaires. Ces modulateurs allostériques potentialisent l'effet des agonistes orthostériques et ne peuvent pas induire une réponse cellulaire en absence de calcium. Les modulateurs positifs tels que le NPS R-568 sont des calcimimétiques qui augmentent la sensibilité du CaSR au calcium alors que les modulateurs négatifs tels que le NPS-2143 sont des calcilytiques qui diminuent cette sensibilité (309).

Le CaSR active différentes voies de signalisation en interagissant avec plusieurs protéines G effectrices : les protéines Gαi/0, Gαq/11 et G12/13 (310). L'activation de la protéine Gαq/11 active la phospholipase Cβ qui va hydrolyser le PIP2 en IP3 et DAG. L'IP3 peut alors interagir avec son récepteur au niveau de la membrane du RE pour induire la vidange des stocks calciques du RE. L'augmentation de la concentration calcique cytosolique active la cascade de signalisation PKC-MAPK- ERK1/2. L'activation de la protéine Gαi/0 médiée par le CaSR inhibe l'adénylate cyclase diminuant ainsi la conversion d'ATP en AMPc et l'activité de la PKA. De plus, les sous-unités β et γ de la protéine Gαi/0 activent les protéines Ras conduisant à l'activation de la cascade de phosphorylation MAPK-ERK1/2. L'activation de la protéine G12/13 active les protéines Rho-GEF qui activent à leur tour les protéines RhoA en catalysant l'échange de GDP en GTP. Les protéines RhoA contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine impliqué dans les processus de prolifération et de motilité cellulaire.

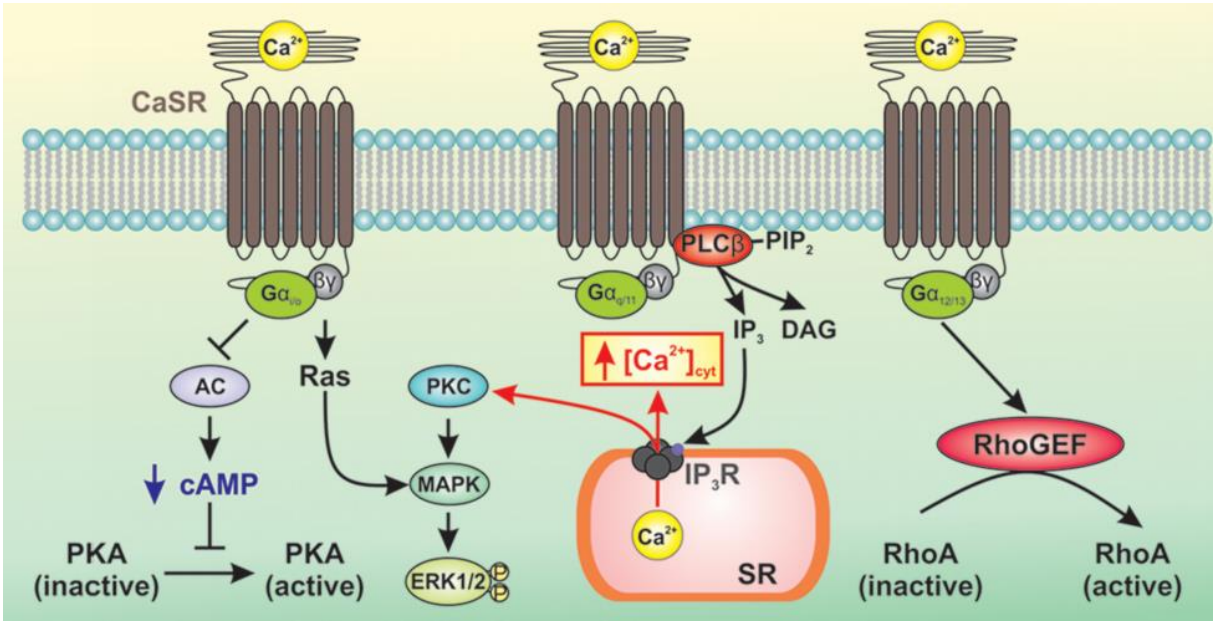


FIGURE 32 : DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION MEDIEES PAR LE CASR.
Le CaSR peut interagir avec différentes protéines G : Gαi/0, Gαq/11 et G12/13. L'activation de la protéine Gαi/0 inhibe la production d'AMPc via le blocage de l'adénylate cyclase et active la voie des MAPK-ERK1/2 via l'activation de la protéine Ras. L'activation de la protéine Gαq/11 active la PLCβ qui hydrolyse le PIP2 en IP3 et DAG. L'IP3 se fixe sur son récepteur au niveau du RE pour induire la vidange des stocks calciques réticulaires. Cette augmentation de la concentration calcique cytosolique active la cascade de phosphorylation PKC-MAPK-ERK1/2. L'activation de la protéine G12/13 active la protéine RhoGEF qui maintient la protéine RhoA en configuration active (Smith et al., 2016).

Le rôle physiologique majeur du CaSR est le maintien de la calcémie notamment en régulant la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne (PTH) hypercalcémiante. En effet, le CaSR est associé à une ou plusieurs protéines G régulatrices capables de détecter les variations de la $[Ca^{2+}]$ extracellulaire et de modifier par conséquent la sécrétion de PTH afin de maintenir une $[Ca^{2+}]$ extracellulaire entre 1,1 et 1,3 mM (311). L'élévation de la $[Ca^{2+}]$ extracellulaire est captée par l'extrêmité N terminale extracellulaire du CaSR qui transmet alors le signal aux protéines Gαq effectrices en intracellulaire. L'activation des protéines Gαq favorise *in fine* l'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ intracellulaire qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de PTH. A l'inverse, lorsque la $[Ca^{2+}]$ extracellulaire est diminuée, l'activité du CaSR est diminué et le rétro-contrôle négatif sur la PTH est levé. La sécrétion de PTH entraine alors la libération osseuse du calcium, la rétention du calcium par les reins et l'absorption du calcium au niveau intestinal, ce qui contribue à la normalisation de la calcémie (312).

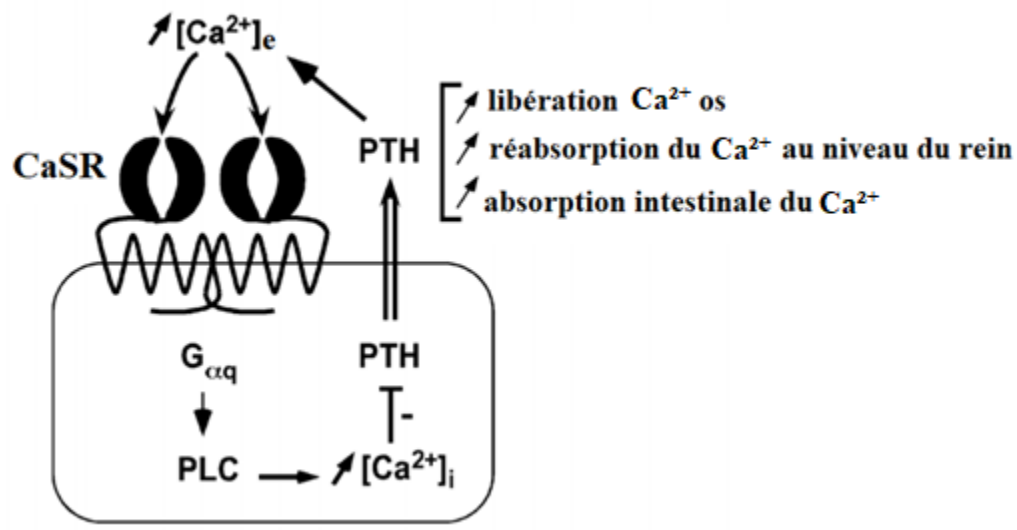


FIGURE 33 : ROLE DU CASR DANS LA REGULATION DE LA CALCEMIE
Lors de l'élévation de la concentration calcique extracellulaire ([Ca²⁺]e), le CaSR transmet le signal en intracellulaire via les protéines effectrices Gαq. L'activation des protéines Gαq induit in fine l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire ([Ca²⁺]i) ce qui induit un rétro-contrôle négatif sur la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne (PTH) hypercalcémiante responsable de la libération du calcium osseux, de la réabsorption du calcium au niveau des reins et de l'absorption intestinale du calcium (Bouschet at Henlet, 2012).

Les implications physiologiques du CaSR sont très nombreuses et ne seront pas toutes exposées. Il est notamment impliqué dans la prolifération cellulaire, il favorise la prolifération des cellules HEK-CaSR via l'activation de la voie MAPK-ERK1/2 (312). Il participe au remodelage osseux, il est impliqué dans la différenciation des cellules progénitrices de la moelle osseuse (313). Le CaSR serait impliqué dans l'inflammation, il a été montré *in vivo* chez la souris et *in vitro* dans des cellules humaines parathyroïdiennes que l'IL-6, cytokine proinflammatoire, favorise l'expression du CaSR (314). Il jouerait également un rôle dans l'apoptose, il a été montré dans les cellules carcinomateuses prostatiques AT-3 que l'élévation de la $[Ca^{2+}]$ extracellulaire protège les cellules de l'apoptose et le CaSR jouerait un rôle dans cet effet protecteur (315).

Des dérégulations de l'expression et/ou de l'activité du CaSR induisent des altérations de la calcémie impliquées dans un certain nombre de pathologies telles que l'hypercalcémie, l'hypocalcémie ou encore l'hyperparathyroïdie (316).

Il existe de nombreux polymorphismes du CaSR notamment des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Certains SNPs du CaSR ont un effet pro-oncogénique associés à un risque de cancer mammaire et prostatique (317,318).

Plusieurs études, ont mis en évidence l'implication du CaSR dans le processus tumoral. Il a été montré que le CaSR est exprimé dans les tumeurs neuroblastiques différenciées mais il est inhibé dans les tumeurs neuroblastiques avancées avec un mauvais pronostic. L'activation du CaSR dans ces tumeurs avancées inhibe la prolifération cellulaire ainsi le CaSR pourrait avoir un rôle de suppresseur de tumeur (319).

A l'inverse, certaines études décrivent un rôle pro-tumoral du CaSR. Dans les cellules cancéreuses mammaires qui surexpriment le CaSR, en réponse à une élévation de la [Ca^{2+}] extracellulaire, la production et libération de la PTH est favorisée alors que dans les cellules épithéliales normales le CaSR induit une diminution de la PTH (320). De plus, il a été montré que le CaSR est surexprimé dans les cellules cancéreuses du sein métastasant dans l'os (308).

Dans le CaP, l'expression du CaSR est associée à un risque accru de mortalité (321). Son extinction dans les cellules PC3 par sh-ARN diminue la prolifération cellulaire et l'inoculation de ces cellules PC3sh-CaSR chez la souris diminue la progression tumorale comparé aux souris ayant reçu des PC3 exprimant le CaSR (322). De plus, il a été montré que l'activation du CaSR via l'élévation de la [Ca^{2+}] extracellulaire favorise la migration dépendante des calpaïnes dans les PC3 (323). Lorsque les cellules PC3 sont exposées à une [Ca^{2+}] extracellulaire élevée, la prolifération cellulaire et l'entrée SOCE sont augmentées et associées à l'induction de l'expression de l'ARNm du CaSR et du canal calcique TRPC6 (324). L'utilisation du calcilytiques NPS-2143 permet d'inhiber la prolifération et la migration des cellules PC3 (325). De plus, une étude a montré que le CaSR est plus exprimé dans les tissus tumoraux prostatiques métastatiques issus de l'os comparé à la tumeur prostatique primaire (326). Le CaSR pourrait donc jouer un rôle dans la formation de métastases osseuses du CaP.

2.5 Le canal potassique SK3

Le canal SK3, codé par le gène *KCNN3*, fait partie de la famille des canaux potassiques de petite conductance sensibles à de faibles concentrations de calcium (SKCa). Trois SKCa sont décrits : SK1, SK2 et SK3.

Les canaux SKCa sont des tétramères constitués de 4 sous-unités α, possédant chacune 6 domaines transmembranaires avec des extrémités N et C terminales intracellulaires. Il peut exister des homo ou hétérotétramères. Le pore du canal, sélectif aux ions K^+, est formé par une boucle extracellulaire entre les domaines transmembranaires 5 et 6. La haute sensibilité au calcium du canal SK3 est médiée par un site de liaison à la calmoduline, une protéine de séquestration du calcium, sur la région C-terminale du domaine intracytoplasmique. En effet,

la fixation d'ions Ca^{2+} au niveau des motifs EF-Hand de la calmoduline va entraîner un changement de conformation et l'ouverture du canal (327).

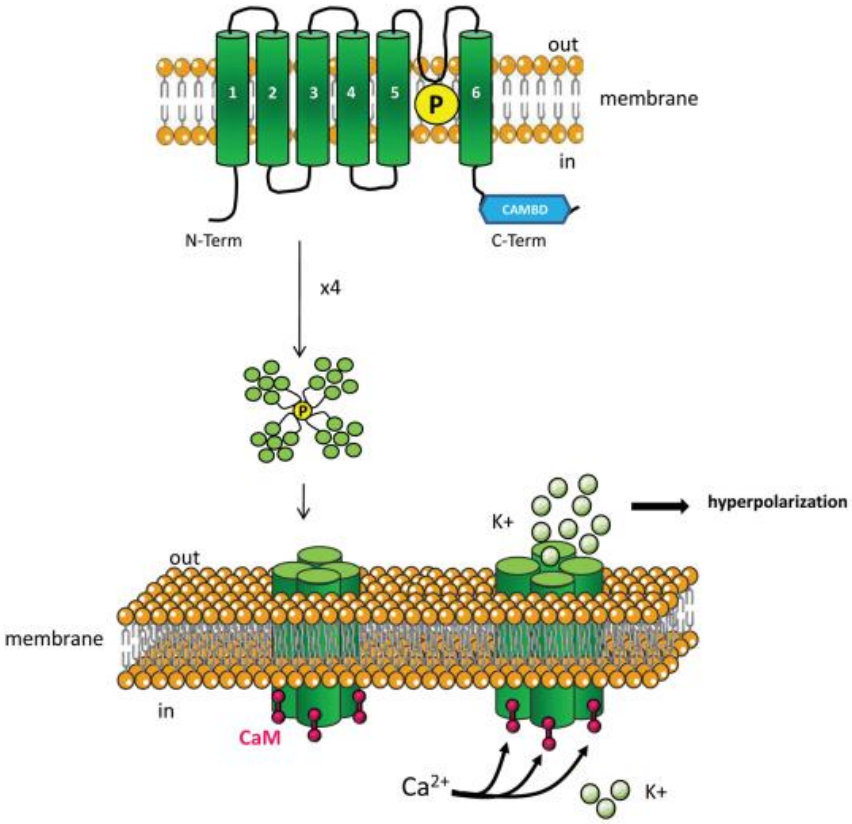


FIGURE 34 : STRUCTURE DU CANAL SK3 *(GIRAULT ET AL., 2012).*
Le canal SK3 est un tétramère dont chaque sous-unité possède 6 domaines transmembranaires avec des extrémités N et C terminales intracellulaires. Ce canal possède des sites de liaison à la calmoduline en intracellulaire qui lui confère une sensibilité au calcium. La fixation du calcium sur la calmoduline induit l'ouverture du canal et l'efflux d'ions potassium.

L'activité du canal SK3 peut être médiée par plusieurs molécules chimiques en interagissant avec le pore du canal ou bien en modifiant sa sensibilité au calcium. L'apamine est un peptide neurotoxique issu du venin d'abeille. Sa structure comportant deux ponts disulfure lui permet d'inhiber l'activité des canaux SKCa (327). L'Ohmline est un alkyl lipide de synthèse dérivant de l'edelfosine, un inhibiteur des SKCa. Il s'incorpore dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique et délocalise le complexe canalaire Orai1/SK3 hors des nanodomaines enrichis en cholestérol, altérant l'entrée calcique dépendante de SK3, la migration et la formation de métastases (40).

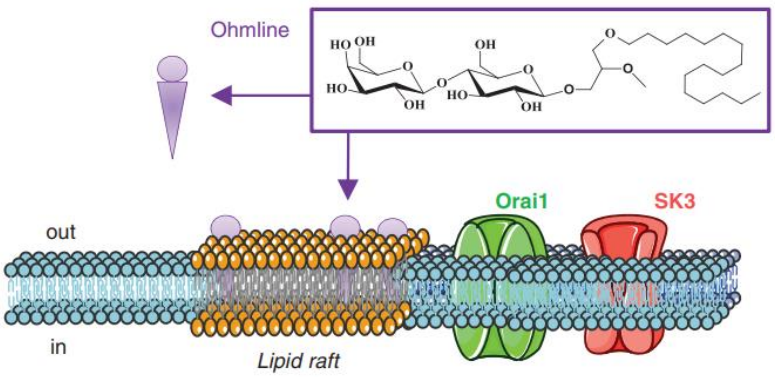


FIGURE 35 : MECANISME D'ACTION DE L'OHMLINE *(CHANTOME ET AL., 2013).*
L'Ohmline est capable de s'incorporer dans la membrane plasmique au niveau de nanodomaines enrichis en cholestérol appelés rafts lipidiques. Cette incorporation délocalise les canaux ioniques initialement présents conduisant à la perte de leur activité.

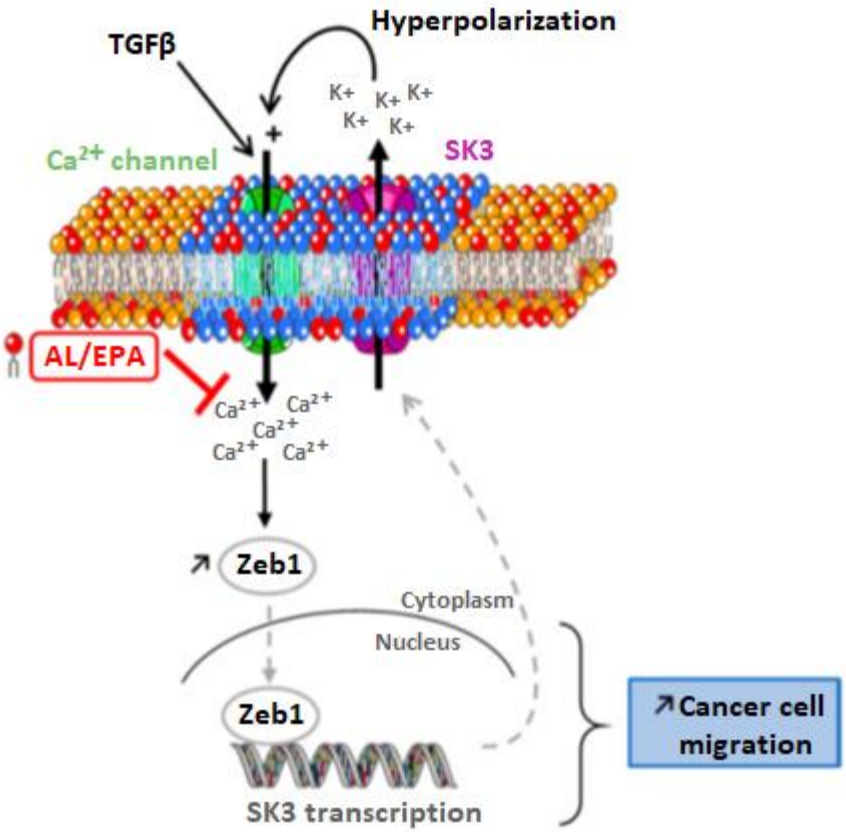
Le canal SK3 joue un rôle dans l'agressivité des cellules cancéreuses. En effet, des études menées au laboratoire ont permis de mettre en évidence son implication dans la migration cellulaire et la formation de métastases. L'inhibition du canal SK3 par un siARN diminue la migration des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-435s. Des expériences *in vivo* ont montré que les souris greffées avec des cellules MDA-MB-435s n'exprimant plus le canal SK3 développent moins de métastases osseuses comparées aux souris greffées avec des MDA-MB-435s exprimant SK3. Dans cette même lignée, il a été montré que le canal SK3 est capable de s'associer avec le canal calcique Orai1 dans la MP, au niveau de nanodomaines enrichis en cholestérol. Ce complexe canalaire va permettre l'efflux d'ions K^+ par le canal SK3, ce qui va induire une hyperpolarisation de la membrane plasmique et renforcer ainsi la force électromotrice pour le calcium, aboutissant à une entrée massive de calcium dans la cellule via le canal Orai1 (40).

Dans le cancer colorectal, l'Ohmline déstabilise le complexe canalaire Orai1/TRPC1/SK3 au niveau de la MP, inhibant ainsi l'entrée SOCE et la migration cellulaire (264).

Une étude récente menée au sein du laboratoire a associé le canal SK3 au processus de TEM qui favorise l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques. En effet, le TGFβ est capable d'augmenter l'entrée calcique SOCE dans les cellules PC3 et DU145, ce qui favorise l'expression de Zeb1. Le canal SK3 est un gène cible de Zeb1 qui est capable de se fixer sur le promoteur de SK3 pour favoriser son expression. Une rétro-boucle positive existe entre ces deux acteurs puisque l'inhibition de SK3 par siARN diminue l'expression de Zeb1. Une fois adressé à la membrane, SK3 participe à l'entrée calcique médiée par le TGFβ favorisant la

migration cellulaire. De manière intéressante, deux AG, l'AL et l'EPA, ont été identifiés comme étant capables d'inhiber cette voie de signalisation (72).

FIGURE 36 : VOIE DE SIGNALISATION IMPLIQUANT LA RETRO BOUCLE POSITIVE ZEB1/SK3 DANS LA MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES *(FIGIEL ET AL., 2019).*



Le TGFβ favorise l'entrée de calcium SOCE dans les cellules PC3 et DU145, qui régule positivement le facteur de transcription clé de la TEM Zeb1. Zeb1 a pour gène cible le canal potassique SK3 qui une fois adressé à la membrane plasmique permet l'efflux d'ions K^+ ce qui hyperpolarise la membrane et renforce la force électromotrice pour le calcium.

3. Signalisation calcique et CaP

Le calcium joue un rôle dans les voies pro-oncogéniques et les voies suppresseurs de tumeur. Des dérégulations de la signalisation calcique et des altérations de l'expression des protéines impliquées peuvent favoriser la survenue du CaP mais également participer à l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques.

3.1 Calcium et prolifération cellulaire

Durant le cycle cellulaire, la concentration calcique cytosolique des cellules varie. Plusieurs étapes du cycle sont calcium dépendantes notamment l'initiation du la phase G1 et les transitions G1/S et G2/M (328). Ces étapes clés du cycle font notamment intervenir des calmodulines et des kinases dépendantes des calmodulines ainsi que des facteurs de transcription tels que FOS/JUN, CREB (C-AMP Response Element-binding protein), NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) ou NF-kB (nuclear factor-kappa B).

Dans les cellules prostatiques cancéreuses, l'expression de certains canaux calciques est modifiée. Les canaux de la famille des TRP, hautement sélectifs au calcium, sont surexprimés dans le CaP, notamment le TRPV6 et le TPRC6 qui participent au contrôle de la prolifération cellulaire via la voie NFAT (329). Il a été montré que le canal TRPV6 n'est pas ou peu exprimé dans les cellules saines alors qu'il est surexprimé dans les cellules du CaP de haut grade (330). Le canal TRPM7 influe également la prolifération par les voies AKT et ERK. La surexpression de TRPM7 dans les cellules du CaP facilite l'entrée calcique dépendante du cholestérol ce qui favorise la prolifération (331). Le canal TRPM8 est également surexprimé dans le CaP et son inhibition par siARN dans les cellules PC3 a un effet antiprolifératif (332). De plus, la famille des canaux calciques Orai joue également un rôle dans la prolifération des cellules du CaP. Le canal Orai3 est surexprimé dans le CaP comparé au tissu sain. Dans les cellules du CaP, les deux isoformes Orai1 et Orai3 sont capables de s'associer pour former un hétéromère médiant l'entrée de calcium et favorisant la prolifération cellulaire. L'inhibition des isoformes Orai 1 et 3 dans les cellules LNCaP induit une diminution de la prolifération, par inhibition de la cycline D1 (297).

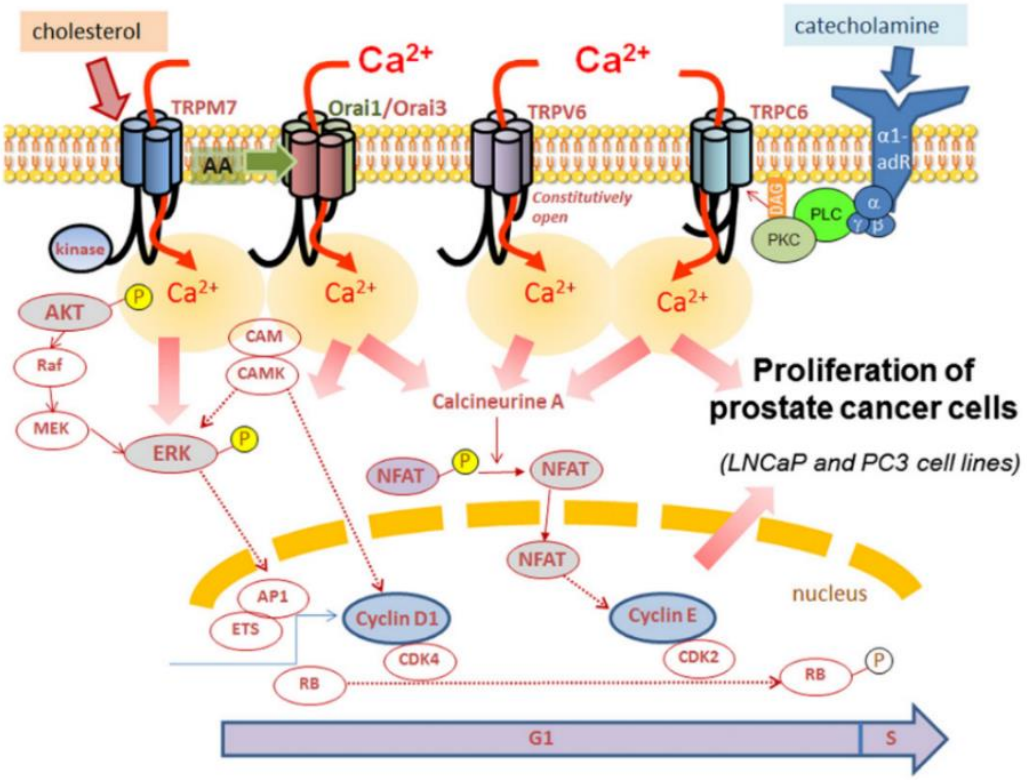


FIGURE 37 : LES CANAUX CALCIQUES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE ET LA PROLIFERATION DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES *(DELIOT ET CONSTANTIN, 2015).*
La voie NFAT induite par l'entrée de calcium via TRPC6, TRPV6 et l'hétéromère Orai1/Orai3 est capable de réguler la cycline E qui joue un rôle dans le cycle cellulaire. La voie ERK, induite par l'entrée de calcium via le TRMP7 et l'hétéromère Orai1/Orai3 est capable de réguler l'expression de la Cycline D1 impliquée dans le cycle cellulaire. Les voies NFAT et ERK sont toutes les deux impliquées dans la prolifération cellulaire.

3.2 Rôle du calcium dans la migration, l'invasion et la formation de métastases

Il a été démontré que le calcium est impliqué dans les différentes étapes de la migration/invasion cellulaire telles que l'organisation du cytosquelette, les points d'adhésion focaux, le contrôle directionnel ou encore la sécrétion d'enzymes responsables de la dégradation de la MEC (333).

Il existe au niveau du front de migration des cellules des microdomaines présentant une concentration calcique transitoire très élevée, appelés « calcium flickers ». Ces microdomaines sont couplés à l'activité du canal calcique TRPM7 et permettent à la cellule de contrôler sa direction de migration (334). L'entrée calcique médiée par le canal TRPM7 va permettre l'activation de calpaïnes qui vont cibler la E-cadhérine et ainsi favoriser la migration cellulaire.

Il a été montré que le canal calcique TRPV2 est davantage exprimé chez les patients atteints d'un CaP métastatique (M1) comparé aux patients avec une tumeur prostatique limitée à la prostate (T2) (306). Des expériences *in vitro*, ont montré que l'inhibition de ce canal dans les cellules PC3 diminue leur pouvoir migratoire. Par ailleurs, deux lysophospholipides (le lysophosphatidylcholine et le lysophosphatidylinositol) ont un effet stimulateur de l'influx calcique médié par le canal TRPV2, ce qui favorise la migration des cellules PC3 (335).

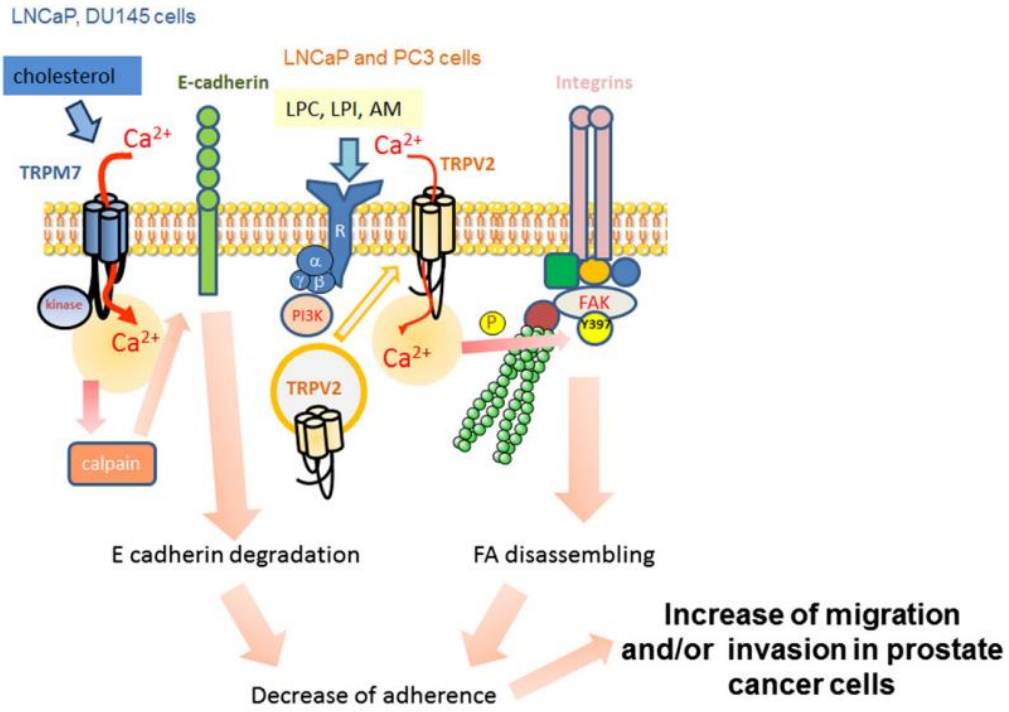


FIGURE 38 : LES CANAUX CALCIQUES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE LA MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES *(DELIOT ET CONSTANTIN, 2015).*
Un large panel de stimulus peut activer directement ou indirectement les canaux calciques de la famille des TRP. En effet, le cholestérol peut activer le canal TRPM7 qui médie l'entrée de calcium. L'augmentation de la [Ca²+]i permet l'activation des calpaïnes impliquées dans la dégradation de la E-cadhérine, diminuant ainsi l'adhérence cellulaire. L'activation du canal TRPV2 nécessite sa translocation du compartiment endosomal à la membrane plasmique via différents stimulis (LPC, LPI, adréno-médulline AM) qui activent la voie PI3K médiée par les protéines G. L'augmentation de la [Ca²+]i favorise la phosphorylation de FAK qui entraîne le désassemblage des filaments d'actine et active in fine la migration et l'invasion cellulaire.

Par ailleurs, il a été montré que des complexes canalaires peuvent se former au niveau de la membrane plasmique dans des nanodomaines enrichis en cholestérol. Ces complexes sont composés de canaux calciques (TRP, Orai) et du canal potassique SK3 sensible au calcium. Il a été montré dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-435s, que l'efflux d'ions potassiques par le canal SK3 induit une hyperpolarisation de la membrane plasmique, qui augmente la force électromotrice pour le calcium et permet via les canaux calciques, une entrée

importante de calcium impliquée dans la migration, l'invasion et la formation des métastases (40).

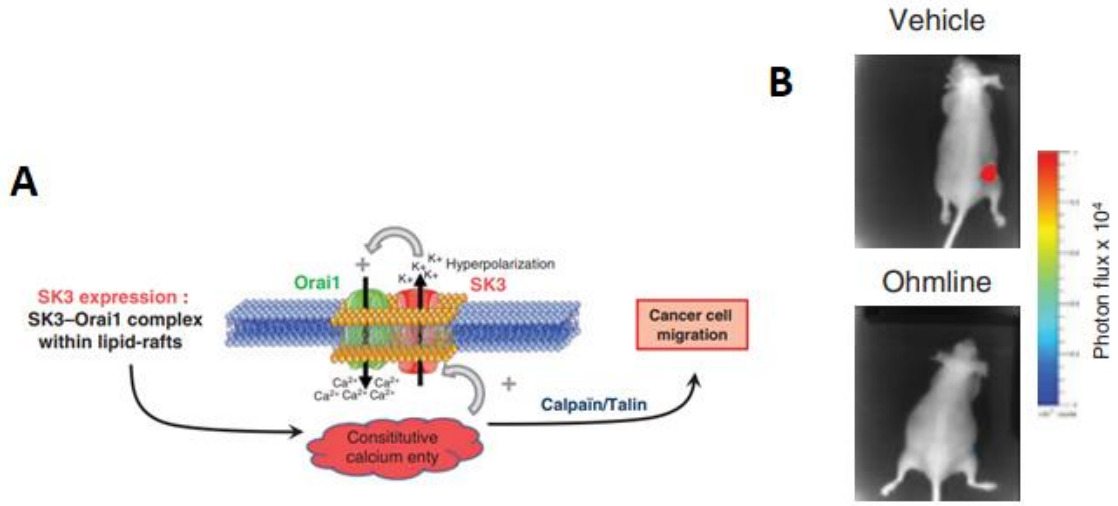


FIGURE 39 : A : IMPLICATION DU COMPLEXE CANALAIRE ORAI1/SK3 DANS LA MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES. B : IMPLICATION DU CANAL SK3 DANS LA FORMATION DE METASTASES *(CHANTOME ET AL., 2013).*
A : L'association des canaux SK3 et Orai1 au sein de nanodomaines enrichis en cholestérol favorise l'entrée constitutive de calcium qui participe à la migration des cellules cancéreuses mammaires. B : L'Ohmline diminue la formation de métastases pulmonaires et osseuses suite à l'inoculation de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-435s chez la souris.

3.3 Calcium et résistance à l'apoptose

La régulation spatio-temporelle de la signalisation calcique est caractérisée par la localisation subcellulaire du signal, son amplitude et sa cinétique (fréquence et durée). Le signal calcique peut avoir un double rôle : induire la survie cellulaire mais également induire l'apoptose. Par exemple, un signal calcique en oscillation permet la prolifération cellulaire via l'activation du facteur de transcription NFAT, alors qu'une élévation de la $[Ca^{2+}]i$ soutenue induit l'apoptose (336).

Pour résister à l'apoptose, les cellules cancéreuses prostatiques peuvent utiliser l'entrée de calcium médiée par les canaux TRP et Orai en tant que signal de survie. Selon la durée et la fréquence du signal calcique, celui-ci peut induire l'inhibition des caspases 8 et 9 par l'intermédiaire de la calmoduline kinase II calcium dépendante. L'apoptose mitochondriale dépendante du calcium peut également être inhibée en bloquant l'entrée calcique médiée par les canaux Orai1, les pompes SERCA et le récepteur à l'IP3 présents sur la membrane du RE (337). De plus, il a été montré dans les cellules LNCaP sous déprivation androgénique, que l'expression du canal calcique Orai1 est diminuée entraînant une diminution de l'entrée SOCE, ce qui participe à la résistance à l'apoptose (296).

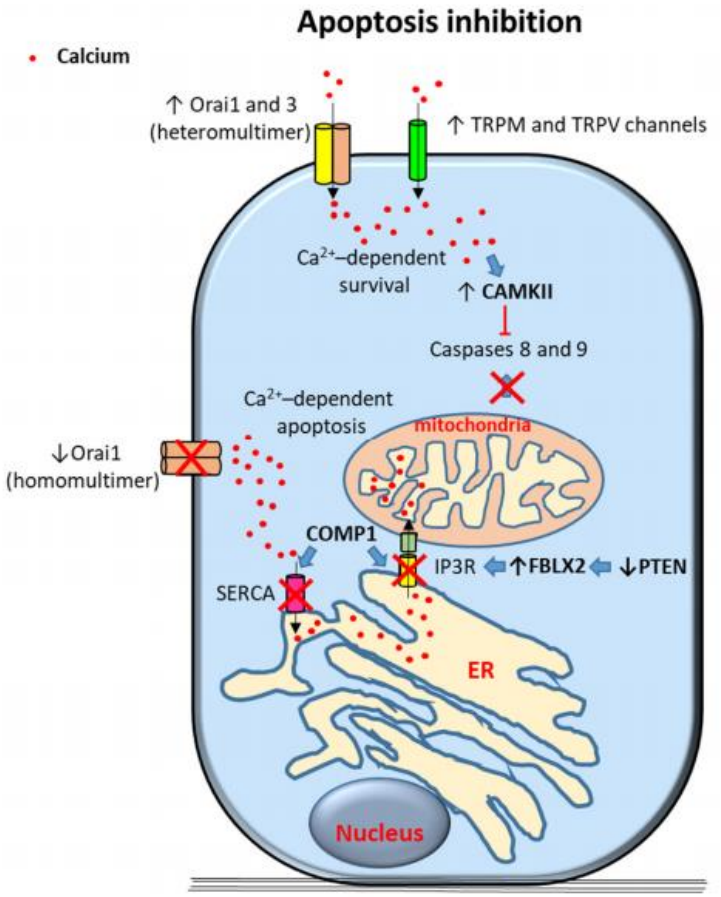


FIGURE 40 : MECANISME DE RESISTANCE A L'APOPTOSE CALCIUM DEPENDANTS DANS LES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES *(ARDURA ET AL., 2020).*
Des signaux de survie peuvent être induits par l'entrée de calcium médiée par les canaux calciques TRP et l'hétéromère Orai1/Orai3. L'induction de la CAMKII (Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II) permet de réguler négativement les caspases 8 et 9. L'inhibition de l'entrée calcique médiée par les canaux Orai1, les pompes SERCA et le récepteur à l'IP3 présents sur la membrane du RE réprime l'apoptose mitochondriale dépendante du calcium.

3.4 Calcium et résistance aux traitements

Le calcium peut également être impliqué dans l'acquisition de la résistance aux traitements.

L'expression de canaux calciques de type T est augmentée dans les CaP présentant des mutations du RA observées dans les stades résistants à la castration (338). De plus, le canal calcique de type T CaV3.2 est surexprimé dans les CRPC notamment les CaP NE (339).

Une étude a montré que, lors de la progression du CaP vers le stade de CRPC, le canal calcique TRPV2 est constitutivement actif, une [Ca^{2+}]i élevée est alors maintenue. De plus, l'expression du canal est corrélée à celle du marqueur NE NSE dans les cellules PC3, C4-2 et LNCaP. L'expression du canal TRPV2 constitue donc un marqueur pronostic des CaP les plus agressifs (306).

Une activation autocrine du récepteur cholinergique muscarinique 3 (CHMR3) a été montré dans les cellules cancéreuses prostatiques. L'activation de ce récepteur, qui induit l'influx de calcium dans les cellules, favorise la croissance du CaP et la résistance à la castration. En effet, dans un modèle de xénogreffe orthotopique de cellules PC3 androgéno-indépendantes, la surexpression de CHRM3 induit le développement tumoral chez la souris castrée. A l'inverse, l'inhibition de CHRM3 réprime cette croissance tumorale (340).

Dans les LNCaP androgéno-dépendantes, les réserves calciques du RE sont diminuées, le récepteur à l'IP3 de type 1 est surexprimé et il est 3 fois plus phosphorylé, ce qui va entrainer une sortie du calcium réticulaire et fonctionner comme un canal de fuite. Des expériences *in vitro*, visant à restaurer les stocks calciques du RE en surexprimant les pompes PMCA, ont montré que les cellules entrent en apoptose, elles deviennent alors plus sensibles à la déprivation androgénique (341).

4. Rôle du calcium dans la différenciation NE

La signalisation calcique régit un grand nombre de processus cellulaires et participe à la progression tumorale. En effet, l'augmentation de la concentration cytosolique de calcium augmente la migration, l'invasion et la formation de métastases (40,72,264). Le rôle du calcium dans la progression du CaP est assez bien décrit, néanmoins, seulement quelques études ont approfondi l'éventuelle implication du calcium dans la progression du CaP vers un phénotype NE.

Lors de la différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques, l'homéostasie calcique est dérégulée. Il a été montré que lors de la différenciation NE, il existe une diminution des pompes SERCA qui assurent la recapture du calcium cytosolique dans le réticulum endoplasmique (RE). La diminution d'expression des pompes SERCA génère donc un stock calcique du RE moins important. Ainsi, dans les cellules NE, l'entrée calcique SOCE, dépendante de la vidange des stocks calciques du RE, est diminuée (342).

De plus, lors du processus de différenciation NE, l'expression et l'activité des canaux calciques qui médient les entrées calciques intracellulaires peuvent être dérégulées. Il a notamment été montré que la densité du courant calcique est augmentée et que le canal voltage dépendant CaV3.2 est surexprimé dans les cellules présentant des neurites et exprimant la CgA (343). Ce canal favorise la sécrétion de facteurs potentiellement mitogènes tels que les neuropeptides ou la sérotonine par les cellules NE (339).

Durant la progression du PCa vers le stade d'échappement hormonal, l'expression du canal calcique Orai1, participant à l'entrée SOCE, est diminuée. Trois ARE (Androgen Response Element) ont été identifiés sur le promoteur du gène codant pour le canal Orai1. Ainsi, la diminution de l'entrée calcique SOCE décrite lors de la différenciation NE, résulterait de la régulation négative du RA sur l'expression du canal Orai1 (296). Cette dérégulation de l'entrée SOCE a été associé à la résistance à l'apoptose des cellules androgéno-indépendantes (296).

Outre la diminution de l'entrée SOCE et la sous expression du canal Orai1, une sur-polymérisation des filaments d'actine a été observée dans les cellules du CaP NE. Ce réarrangement du cytosquelette impacte l'internalisation et l'insertion des canaux calciques à la membrane, ce qui modifie l'entrée de calcium dans les cellules NE (344).

Objectifs

Les objectifs de mon travail de thèse ont été les suivants :

- Le premier objectif a été de **déterminer si l'hypoxie régule le facteur de transcription clé de la TEM Zeb1 et son gène cible, le canal potassique sensible au calcium SK3 dans les cellules cancéreuses prostatiques.** Nous avons ensuite étudié le mode d'action de deux AG qui ont été précédemment décrits pour être inversement associés à l'agressivité du CaP, sur cette voie de signalisation en conditions hypoxiques. Cette étude a été valorisée par un article original « Hypoxia promotes prostate cancer aggressiveness by upregulating EMT-activator Zeb1 and SK3 channel expression » publié dans *International Journal of Molecular Sciences*.

- Le second objectif a été d'**étudier le lien entre le CaSR et la différenciation NE du CaP.** Dans cette étude, l'expression du CaSR et du marqueur NE CgA a été analysée au cours de l'évolution naturelle du CaP dans une cohorte de tissus provenant de 467 patients, et répartis en quatre groupes : tissu sain, CaP cliniquement localisé (CLC), CaP métastatique résistant à la castration (mCRPC) et CaP NE (NEPC). En parallèle, l'expression du CaSR a été modulée *in vitro* en utilisant des activateurs/inhibiteurs pharmacologiques et les conséquences sur l'expression des marqueurs NE ont été étudiées. Ces travaux ont abouti à une publication « The calcium-sensing receptor is a marker and potential driver of neuroendocrine differentiation in prostate cancer » dans *Cancers*.

- Le troisième objectif a été de **déterminer si l'Enza, thérapie ciblant le RA, est capable d'induire une dérégulation de la signalisation calcique responsable de l'induction de la TEM et de la progression vers le stade de CRPC NE.** Nous avons étudié l'expression de Zeb1, de SK3 et des canaux Orai dans une cohorte de tissus tumoraux provenant de 286 patients, et répartis en trois groupes : CLC (220), CRPC de phénotype adénocarcinome (CRPC adéno) (50) ou de phénotype NE (CRPC NE) (16). Nous avons étudié *in vitro* l'effet de l'Enza, un inhibiteur du RA, sur l'expression des acteurs Zeb1, SK3 et Orai et leur potentielle implication dans la différenciation NE. Les résultats de cette étude sont rapportés dans un article « Zeb1 and SK3 channel are up-regulated in castration-resistant prostate cancer and promote neuroendocrine differentiation » qui est soumis pour publication.

Première partie

Rôle de l'hypoxie dans l'agressivité du CaP : implication du facteur de transcription clé de la TEM, Zeb1 et du canal potassique sensible au calcium SK3.

L'hypoxie est une caractéristique fréquente des tumeurs solides du CaP qui participe à leur agressivité. En effet, les cellules cancéreuses développent des mécanismes d'adaptation face au stress hypoxique, ce qui renforce la résistance aux traitements et la dissémination métastatique. Il est capital d'étudier par quels mécanismes l'hypoxie participe à l'agressivité du CaP et d'identifier les acteurs impliqués.

Lors d'une précédente étude menée au laboratoire, nous avons identifié une nouvelle voie de signalisation induite par le TGFβ qui participe à l'agressivité du CaP et pouvant être régulée par, l'AL et l'EPA, deux AGPI inversement associés à l'agressivité tumorale. Le facteur de transcription Zeb1 est associé à l'agressivité du CaP, son expression augmente selon les stades évolutifs de la maladie et est associé à une diminution du taux de survie des patients. Nous avons montré que le facteur de transcription Zeb1 a pour gène cible le canal potassique SK3 qui joue également un rôle dans l'agressivité tumorale, en s'associant avec des canaux calciques à la membrane plasmique pour former des complexes canalaires qui médient l'influx de calcium dans les cellules tumorales, favorisant leur migration, invasion et la formation de métastases.

Au vu de l'ensemble de ces données, notre étude vise à déterminer i) si l'hypoxie favorise l'agressivité du CaP en activant la voie de signalisation Zeb1/SK3 et ii) si nos deux AG d'intérêt, l'AL et l'EPA, sont capables de réguler cette voie.

Nous avons étudié l'expression des acteurs Zeb1 et SK3 dans les cellules cancéreuses prostatiques PC3 cultivées en condition hypoxique. L'expression de Zeb1 et SK3 est augmentée en hypoxie versus normoxie. Nous avons également constaté que le canal SK3, surexprimé en condition hypoxique, participe à l'agressivité tumorale en favorisant l'entrée calcique SOCE et la migration cellulaire. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique du canal SK3 (l'Ohmline) et d'un activateur de SK3 (le CyPPA), nous a permis de montrer que la migration cellulaire induite sous hypoxie dépend du canal SK3.

Nos résultats montrent que l'hypoxie induit l'expression du canal SK3 et favorise l'influx de calcium dans les cellules cancéreuses et entrainant une augmentation de l'expression de Zeb1 et de la migration cellulaire. Enfin, nous avons testé l'effet de nos AG d'intérêt, l'AL et l'EPA, et montré qu'ils sont capables de bloquer la voie de signalisation Zeb1/ SK3 induite par l'hypoxie.

Les résultats ont été publiés dans l'article ci-joint. Les figures ont été agrandies à la fin de l'article.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Communication

Hypoxia Promotes Prostate Cancer Aggressiveness by Upregulating EMT-Activator Zeb1 and SK3 Channel Expression

Fanny Bery [1,†], Sandy Figiel [1,†], Sana Kouba [1], Delphine Fontaine [1], Maxime Guéguinou [1], Marie Potier-Cartereau [1], Christophe Vandier [1], Roseline Guibon [1,2], Franck Bruyère [3], Gaëlle Fromont [1,2,†] and Karine Mahéo [1,†,*]

1 INSERM, N2C UMR 1069, University of Tours, F-37032 Tours, France; fanny.bery@etu.univ-tours.fr (F.B.); sandy.figiel@gmail.com (S.F.); sana.kouba@etu.univ-tours.fr (S.K.); delphine.fontaine@etu.univ-tours.fr (D.F.); maxime.gueguinou@univ-tours.fr (M.G.); marie.potier-cartereau@univ-tours.fr (M.P.-C.); christophe.vandier@univ-tours.fr (C.V.); roseline.guibon@univ-tours.fr (R.G.); gaelle.fromont-hankard@univ-tours.fr (G.F.)
2 Department of Pathology, CHRU of Tours, CEDEX 9, F-37044 Tours, France
3 Department of Urology, CHRU of Tours, CEDEX 9, F-37044 Tours, France; f.bruyere@chu-tours.fr
* Correspondence: karine.maheo@univ-tours.fr; Tel.: +33-(0)2-47-36-62-13
† These authors contributed equally to this work.

Received: 5 May 2020; Accepted: 3 July 2020; Published: 6 July 2020



Abstract: Hypoxia is a well-established feature of prostate cancer (PCa) and is associated with disease aggressiveness. The hypoxic microenvironment initiates multiple adaptive responses including epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and a remodeling of calcium homeostasis involved in cancer progression. In the present study, we identified a new hypoxia signaling pathway with a positive feedback loop between the EMT transcription factor Zeb1 and SK3, a Ca^{2+}-activated K^+ channel, which leads to amplifying store-operated Ca^{2+} entry. Zeb1 and SK3 channel were strongly upregulated by hypoxia both in vitro and ex vivo in organotypic cultures of human PCa. Taking into account the sensitivity of the SK3 channel to the membrane lipid composition, we identified lipids such as Ohmline (an alkyl ether lipid and SK3 inhibitor), linoleic acid (LA) and eicosapentaenoic acid (EPA) (fatty acids associated with indolent PCa), which were able to completely abrogate the hypoxia-induced changes in Zeb1 expression. Ultimately, better understanding of this new hypoxia-induced EMT pathway may allow to develop adjuvant therapeutic strategies, in order to control PCa aggressiveness and improve treatment outcomes.

Keywords: prostate cancer; hypoxia; Zeb1; calcium; lipids

1. Introduction

Hypoxia is known to contribute to cancer progression and is associated with resistance to treatment and metastatic dissemination [1]. In prostate cancer (PCa), the most common cancer type in men, hypoxia is a common feature that correlates with poor prognosis [2,3].

In most tumors, hypoxia leads to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a process which allows cancer cells to acquire migratory and invasive characteristics, essentials for dissemination and distant metastases [4,5]. In fact, hypoxia has been shown to regulate the expression of EMT markers such as Snail or Zeb1 [6–8]. However, the intracellular signaling pathways that mediate hypoxia-induced EMT remain unclear. Among EMT markers, we previously demonstrated the clinical significance of Zeb1 in human PCa. Indeed, its expression is increased according to the different

steps of PCa progression and is associated with decreased overall survival [9]. Zeb1 is a pivotal EMT transcription factor that promotes multidrug resistance, proliferation, and metastasis [4,10].

Hypoxia was found to initiate multiple adaptive responses, allowing cancer cells to survive in a hostile microenvironment [11]. Recent findings demonstrate the relationship between hypoxia and calcium (Ca^{2+}) in different cancer types [12]. Ca^{2+} signaling is significantly remodeled in several cancer cell types, and gives them advantages for proliferation, migration, invasion, and resistance to apoptosis [13]. We previously demonstrated the pivotal role of the SK3 channel, a Ca^{2+}-activated potassium channel, regulating Ca^{2+} entry in breast, colon, and prostate cancer aggressiveness [14–16]. SK3 has been shown to form complexes with Ca^{2+} channels, leading to an increase in cytosolic Ca^{2+} concentration in cancer cells and metastasis development. Interestingly, SK3 is located in cholesterol-enriched membrane nanodomains, also known as lipid rafts, and its function is dependent on the lipid environment [14]. We previously identified a fatty acid (FA) profile inversely associated with PCa aggressiveness and characterized by high levels of linoleic acid (LA) and eicosapentaenoic acid (EPA) [17]. Furthermore, we highlighted that these FAs exert their protective effects through a reduction of Ca^{2+} entry, involved in Zeb1 upregulation induced by TGFb, another EMT inducer [16]. In the present study, we report that hypoxia-induced Zeb1 is associated with activation of SK3 channel expression in PCa cells and subsequently affects their potential of aggressiveness. Moreover, and most importantly, the protective lipids identified in human PCa, namely LA and EPA, were found to totally reverse this process.

2. Results

2.1. Hypoxia Induces Zeb1 and SK3 Expression in Human Prostate Cancer Cells and Human Malignant Prostate Tissue

Human PCa cells PC3 were exposed to hypoxia for 24 h or 48 h. Zeb1 mRNA levels were increased by ~60% after hypoxia (24 h and 48 h) compared to normoxic conditions (Figure 1A). Since it was previously reported that *KCNN3* (the SK3 encoding gene) is a target gene of Zeb1 [16], we investigated whether the SK3 channel could also be regulated by hypoxia. Figure 1B shows that after 24 h and 48 h under hypoxia, SK3 mRNA is increased and interestingly at the same level as that of Zeb1 (by ~60%).

We next investigated whether these findings could also be reproduced in clinical samples. Hypoxic conditions were tested in human malignant prostate tissue slices ($N = 4$ patients). Figure 1C,D shows representative immunohistochemistry pictures of Zeb1 and SK3 protein expression under normoxic and hypoxic conditions. Under normoxic conditions, cancer cells showed focal or absent Zeb1 expression, without significant SK3 staining. Hypoxia led to an increase in Zeb1 (4 cases out of 4) and SK3 (3 cases out of 4) expression, with a diffuse positive staining.

2.2. SK3 Channel Contributes to PCa Aggressiveness by Increasing Store-Operated Ca^{2+} Entry, Cell Migration, and Zeb1 Expression

In non-excitable cells, Ca^{2+} entry from extracellular medium is mainly supported by a capacitive mechanism, also known as store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), which is mediated by store-operated Ca^{2+} channels [18]. Treatment of PC3 cells with Ohmline (1-O-hexadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-lactose), an alkyl ether lipid inhibitor of the SK3 channel, significantly decreased the amplitude of SOCE (by ~20%) (Figure 2A), demonstrating that this Ca^{2+} entry is regulated by the SK3 channel in PC3 cells.

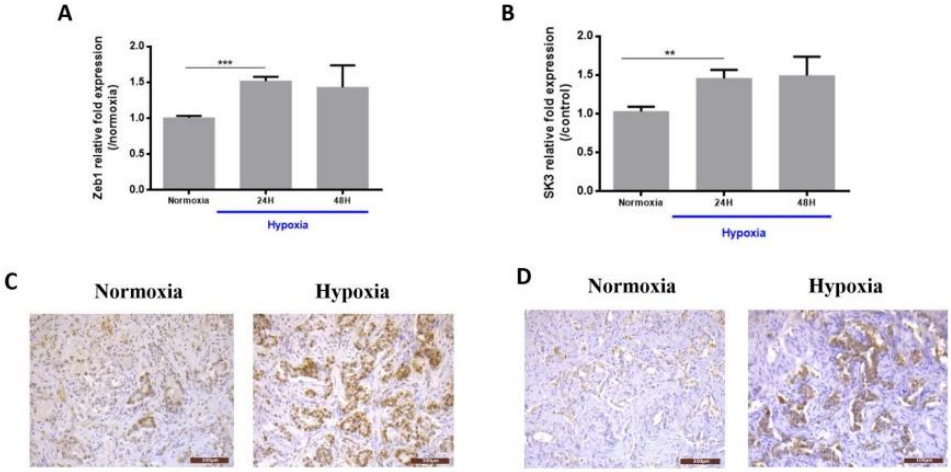


Figure 1. Expression of Zeb1 and SK3 channel under hypoxia conditions. (**A**) Zeb1 and (**B**) SK3 expression in PC3 cells. Cells were cultured under normoxic conditions for 24 h and then were cultured under hypoxia (1% O_2) for 24 h or 48 h. qPCR results are normalized to normoxic conditions (N = 3; n = 3; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Kruskal–Wallis, post-test: Dunn). (**C**) Zeb1 and (**D**) SK3 expression in human prostate cancer slices (Scale = 100 µm). Organotypic cultures were cultured under normoxia for 24 h and then were cultured under hypoxia (1% O_2) for another 24 h. Five slices were obtained for each patient (N = 4 patients) to test the different conditions.

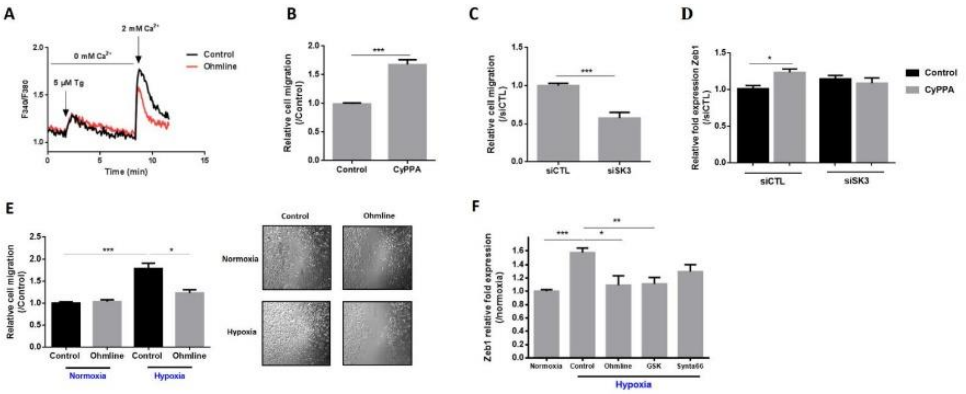


Figure 2. SK3 channel induces Zeb1 expression and cell migration under hypoxia conditions. (**A**) SOCE is inhibited by Ohmline (an SK3 inhibitor). Fluorescence measurements and relative fluorescence of Ca^{2+} entry after endoplasmic reticulum Ca^{2+} store depletion by thapsigargin (Tg) in PC3 cells pretreated for 48 h with Ohmline (1 µM). (**B**,**C**) SK3 channel promotes PC3 cell migration. (**B**) PC3 cells were treated with an SK3 activator, CyPPA (10 µM), and used for transwell migration assay performed for 24 h (N = 5; n = 2; *** $p < 0.001$; Mann–Whitney test). (**C**) PC3 cells were transfected with a siRNA directed against SK3 for 24 h and then used for transwell migration assay performed for 24 h (N = 3; n = 3; *** $p < 0.001$; Mann–Whitney test). (**D**) SK3 activator regulates Zeb1 expression. PC3 cells were transfected with a siRNA directed against SK3 for 24 h and then treated with CyPPA (10 µM) for another 24 h (**C**) (N = 4; n = 3; * $p < 0.05$; Kruskal–Wallis, post-test: Dunn). (**E**) SK3 regulates hypoxia-induced migration. PC3 cells were treated with an SK3 inhibitor, Ohmline (1 µM), and used for transwell (left) and wound-healing (right) migration assays performed for 24 h under normoxic or hypoxic conditions (N = 5; n = 2; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; Kruskal–Wallis, post-test: Dunn). (**F**) Hypoxia-induced Zeb1 expression is abolished by channel inhibitors. PC3 cells were treated with Ohmline, GSK7975A, and Synta66 (inhibitors of TRP and Orai channels) for 48 h and cultured under hypoxia (1% O_2) for the last 24 h (N = 3; n = 3; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Kruskal–Wallis, post-test: Dunn).

To determine whether the SK3 channel has a pivotal role in cell migration as already reported in PCa cells and in other cell types [14,16], we performed transwell migration assays with cells treated by a pharmacological SK3 activator (CYPPA) or with siRNA-SK3-transfected cells. As expected, cell migration was strongly increased by CYPPA (+69%) (Figure 2B). In contrast, the suppression of SK3 showed significantly reduced migratory ability of cancer cells (−43%) (Figure 2C). These findings demonstrate that SK3 contributes to PCa aggressiveness by increasing SOCE and PCa cancer cell migration. We then analyzed the effect of CyPPA on Zeb1 expression in PC3 cells transfected or not with siSK3. CyPPA treatment led to an increase in the Zeb1 mRNA level by 23% under si-control conditions, and had no effect on Zeb1 expression in siSK3-transfected cells. This finding demonstrates a direct effect of SK3 on Zeb1 expression.

As shown above, the SK3 channel was induced by hypoxia and was able to increase cell migration in normoxia. Therefore, we studied whether SK3 plays a role in hypoxia-induced migration. Cells were treated with Ohmline and used for transwell and wound-healing migration assays performed for 24 h (+/− Ohmline). Hypoxia strongly induced cell migration (+78%) (Figure 2E). The SK3 inhibitor Ohmline was able to completely abrogate the hypoxia-induced migration.

As SK3 has been shown to form complexes with Ca^{2+} channels, leading to an increase in cytosolic Ca^{2+} concentrations, we wondered whether the mechanism involved in hypoxia-induced Zeb1 expression depends on Ca^{2+}. Figure 2F shows that the upregulation of Zeb1 by hypoxia was inhibited by Ca^{2+} channel inhibitors GSK7975A and Synta66 (inhibitors of TRP and Orai channels, respectively). Interestingly, the SK3 inhibitor Ohmline was also able to completely abrogate the effect of hypoxia on Zeb1 expression. All together, these results suggest that hypoxia induces a positive feedback loop between Zeb1 and the SK3 channel in a pathway that leads to an increase of Ca^{2+} entry.

2.3. LA and EPA Lipids Totally Block the Expression of Zeb1 and SK3 Induced by Hypoxia

We recently reported that LA and EPA, FAs associated with indolent PCa, reduced SOCE in PCa cells [16]. Here, we hypothesized that these lipids may modulate Zeb1 and SK3 gene expression induced by hypoxia.

As observed in Figure 3, hypoxia treatment failed to induce Zeb1 and SK3 expression in LA- and EPA-supplemented cells (Figure 3A,B). To assess the clinical relevance of these results, human PCa slices were treated with these FAs for 48 h and for the last 24 h they were cultured under hypoxia (N = 4 patients). Treatment by LA and EPA prevented either totally (LA) or partially (EPA) Zeb1 expression induced by hypoxia (Figure 3C), whereas palmitic acid (PA) had no effect. These data suggest a pivotal role for EPA and LA to prevent hypoxia-induced EMT.

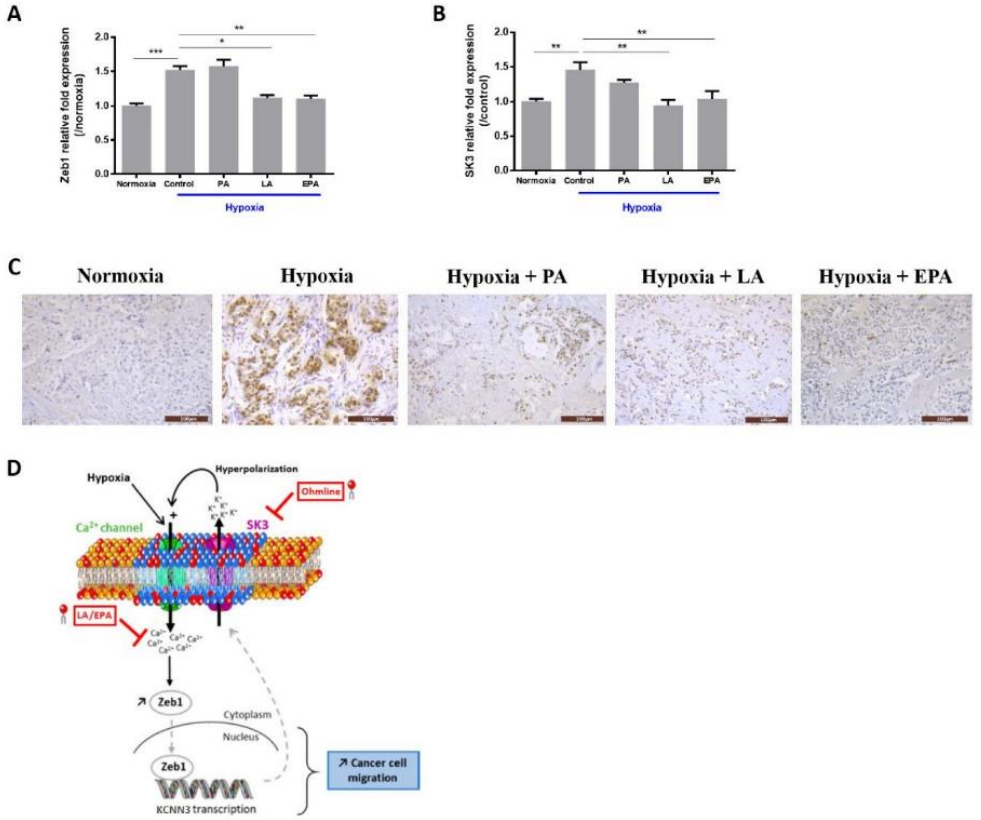


Figure 3. Linoleic acid (LA) and eicosapentaenoic acid (EPA) inhibit hypoxia-induced Zeb1 and SK3 expression. (**A**,**B**) FA effects on hypoxia-induced Zeb1 and SK3 expression. PC3 cells were treated with FAs for 48 h and the last 24 h cultured under hypoxia (1% O_2). qPCR results are expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$, (N = 3; n = 3; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Kruskal–Wallis, post-test: Dunn's test). (**C**) Zeb1 expression in human prostate cancer slices (Scale = 100 µm). Organotypic cultures were treated with FAs (60 µM) and cultured under normoxia for 24 h and then were cultured (with FAs) under hypoxia (1% O_2) for another 24 h; Zeb1 nuclear expression increased under hypoxia conditions. After palmitic acid (PA) treatment, most of the cancer cells (present in the upper right area) were still positive for Zeb1, whereas after treatment with either LA or EPA, only rare Zeb1 positive cancer cells were observed. Five slices were obtained for each patient (N = 4 patients) to test the different conditions. (**D**) Proposed schematic model for a positive feedback loop leading to prostate cancer (PCa) aggressiveness and inhibited by LA and EPA based on our results. In fact, hypoxia induces the transcription factor Zeb1 known to be regulated by calcium. Zeb1 targets the *KCNN3* gene encoding for SK3. At the plasma membrane, the SK3 channel allows an increase in calcium entry by hyperpolarization of the plasma membrane. By incorporating Ohmline, LA, and EPA into the membrane, we observed that they inhibit this signaling pathway induced by hypoxia.

3. Discussion

Hypoxia is a common feature in the microenvironment of solid tumors, and it promotes cancer cell survival and aggressiveness [1,19]. Here, we report that hypoxia induces the EMT transcription factor Zeb1 through a Ca^{2+} -dependent mechanism involving SK3, a Ca^{2+}-activated K^+ channel sensitive to lipids. The data in human PCa samples strongly emphasized the clinical consistency of our observations. The lipids tested in this study were selected because of their potential clinical interest, and include Ohmline, a synthetic alkyl ether lipid with antimetastatic effects [14,15], as well as LA and EPA, FAs inversely associated with PCa aggressiveness [17].

Although EMT and hypoxia were initially considered as separate events promoting invasion and metastasis, several recent studies have shown that the signaling pathways are interrelated [20]. Among the potential mediators of hypoxia-induced EMT, a role of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) has been reported. HIF-1α was found to directly regulate Zeb1, which has four hypoxia-response element (HRE) sites on its proximal promoter [7]. An HIF-1α/Zeb1 signaling axis initiated by hypoxia has been described in several types of cancer cells [21,22].

Interactions between hypoxia and Ca^{2+} modulators, including channels, pumps, and sensors have been recently highlighted [12]. On the one hand, the expression of Ca^{2+} regulating proteins is controlled by HIF-1 and, on the other hand, these proteins are involved in the regulation of HIF-1 activity [12]. In PCa, TRPM8 promotes HIF-1α protein levels by suppression of RAK1-mediated HIF-1α ubiquitination [23]. Here, we report for the first time that the expression of SK3 is increased by hypoxia. Recently, we demonstrated that SK3 expression was upregulated by TGFβ, a potent inducer of EMT, and that *KCNN3* (the SK3 encoding gene) is a target gene of Zeb1 [16]. These data suggest that the SK3 channel is upregulated by factors of the tumor microenvironment, including TGFb and hypoxia, which may explain its differential expression in tumor and non-tumor tissues [14].

In the present study, we provide evidence that hypoxia-induced Zeb1 expression was inhibited by either Ohmline (SK3 inhibitor) or Ca^{2+} channel inhibitors. SK3 has been shown to form complexes with Ca^{2+} channels, leading to an increase in cytosolic Ca^{2+} concentration promoting breast and colon cancer cell migration [14,15]. Here, we showed that the SK3 channel regulated SOCE and migration induced by hypoxia in PCa cells. Taken together and as summarized in Figure 3D, our results suggest a positive feedback loop between Zeb1 and SK3 expression under hypoxic conditions, leading to Ca^{2+} entry amplification (by hyperpolarizing the membrane). This model requires further experiments in a future study to specify the sequence of events and actors involved in the Ca^{2+} regulation.

Calcium signaling plays a major role in several events driving cancer progression, including proliferation, cell migration, angiogenesis, and apoptosis [24]. An increase of Ca^{2+} entry in malignant tissues compared with benign tissues was also demonstrated [25]. Recently, we reported higher intracellular Ca^{2+} entries in human tissue samples from high-risk PCa compared with indolent tumors [26]. Our findings raise the hypothesis that Ca^{2+} homeostasis could play a pivotal role in PCa progression.

The location of SK3 in cholesterol-enriched membrane nanodomains, also known as lipid rafts, with a function dependent on the lipid environment, provides an opportunity for the control of prostate cancer aggressiveness. Indeed, by incorporating a lipid such as Ohmline into nanodomains, we observed that it delocalizes the SK3 channel outside lipid nanodomains and reduces SOCE-dependent cell migration [14]. We recently reported that LA and EPA reduced Ca^{2+} entry involved in Zeb1 regulation by TGFb, leading to cancer cell migration [16]. Here, we report that the expression of both Zeb1 and SK3 are strongly inhibited by LA and EPA supplementation. Since LA and EPA administration in humans has been shown to be well tolerated, with any toxic effect [27], the present study reinforces their potential applications as an adjuvant treatment to control PCa aggressiveness.

4. Materials and Methods

4.1. Human Tissue Slice Cultures

Prostatic tissue samples, including malignant and normal tissues, were obtained from 4 patients undergoing radical prostatectomy for PCa. Patients were 66 to 75 years old, with PCa grade ISUP1 ($n = 1$), ISUP2 ($n = 2$), or ISUP 5 ($n = 1$). All tumors were staged pT2. Written informed consents were obtained from patients following the requirements of the medical ethics committee of our institution (Comité de Protection des Personnes (CPP) de Tours—Région Centre Ouest I) (ethics code DC-2014-2045) (years between 2003 and 2018). Immediately after surgery, 4 to 5 mm samples were dissected aseptically and cut with a vibratome into 6–10 slices per sample, as previously described [26]. Slices were incubated with DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin–streptomycin,

1nM dihydrotestosterone, and placed in a 37 °C-humidified incubator with 5% CO_2 in normoxia or in a hypoxia chamber at 1% O_2.

4.2. Immunohistochemistry

Tissue slices or cells were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and cut in serial 3 µm sections. One section was stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES), and the other sections were deparaffinized, rehydrated, and heated in citrate buffer pH 6 for antigenic retrieval. After blocking for endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide, primary antibodies were incubated for 1 h, including Zeb1 (Abnova, Taoyuan, Taiwan, dilution 1/500) and SK3 (LSBio, Seattle, WA, USA, dilution 1/200). Immunohistochemistry was then performed using the streptavidin–biotin–peroxydase method with diaminobenzidine (DAB) as the chromogen (Kit LSAB, Dakocytomation, Glostrup, Denmark). Slides were finally counterstained with hematoxylin. Positive staining was expressed as a percentage of total cancer cells.

4.3. Cell Lines and Products

Human PCa PC3 (CRL-1435) cell line (American Type Culture Collection (ATCC)) was received in 2016–2018. This cell line was tested and authenticated by DNA fingerprinting by the ATCC. After reception, cells were amplified in order to make a large reserve of cryopreserved cells. Every 3 months, a new cryopreserved bulb was thawed and used for this study. PC3 cells were cultured in RPMI medium (BE12-702F, Lonza, Levallois-Perret, France), supplemented with 5% FBS (CVFSVF0001, Eurobio, Les Ulis, France) and 1% (*v/v*) penicillin–streptomycin in a 37 °C-humidified incubator, 5% CO_2.

LA (L1876), EPA (17266), and PA (P5177) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Calcium channel inhibitors GSK7975A (GLXC03243) and Synta66 (GLXC03244) were from GLIXX Laboratories INC (Hopkinton, MA, USA). The SK3 activator, CyPPA, was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). 1-Ohexadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-lactose (Ohmline) was synthetized as previously described [28].

4.4. RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR

Total RNAs from cultured cells were extracted using the Nucleopsin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). To obtain cDNA at 50 ng/µL, RNAs were reverse transcribed with an RT kit (PrimeScriptTM RT Reagent, Perfect Real Time, Takara, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The reaction progressed in a LightCycler 480 (Roche Applied Science, Meylan, France) at 37 °C for 17 min followed by 85 °C for 5 min. For each reaction, SYBR Green mix (RR420L, Takara) was mixed with specific primers (0.5 µM, see Supplementary Materials) and cDNA at 50 ng/µL. Relative levels of mRNA were calculated according to the DDCT method relative to the housekeeping gene HPRT and cyclophilin A. Primers used for quantitative real-time PCR are available in Table S1, Supplementary Materials.

4.5. Cytosolic Calcium Measurements

Cytosolic Ca^{2+} concentrations were studied using the ratiometric fluorescent dye Fura-2-AM from Thermo Fischer Scientific (Illkirch, France) (1H, 5 µM). A SOCE protocol was followed: cells were incubated in a physiological saline solution (PSS) without Ca^{2+}, whose composition is detailed in the Supplementary Materials (Table S2). After a short stabilizing time, PC3 cells were treated by a SERCA pump inhibitor, thapsigargin (Tg 5 µM). After total endoplasmic reticulum-Ca^{2+} depletion, PSS with 2 mM $CaCl_2$ (2Ca) was added. Fluorescence emission was measured at 510 nm with an excitation light at 340 and 380 nm. Analyses were performed using SoftMax Pro Software (5.4.6 version, Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

4.6. Migration Assays

Transwell assays were performed in 24-well plates receiving 8 µm pore size cell culture inserts (353097, Falcon, Boulogne-Billancourt, France).

For treated cells with CyPPA, 30,000 cells were seeded in the upper compartment containing growth medium (5% FBS +/− CyPPA 10 µM) and allowed to migrate through the pores to the other side of the membrane for 24 h. The lower compartment was also filled with growth medium (10% FBS +/− CyPPA 10 µM).

For siRNA-SK3-transfected cell migration, 24 h after transfection, 60,000 cells were seeded with a 5% to 10% FBS gradient in upper and lower compartments, respectively. After 24 h, migrated cells to the bottom side were fixed, stained, and automatically counted.

For Ohmline treatment, 60,000 cells were seeded with a 5% to 10% FBS gradient (+/− Ohmline 1 µM) in upper and lower compartments. Migration assay was performed for 24 h under normoxic and hypoxic conditions.

Wound-healing assays were performed in 24-well plates (2515083, Falcon, Boulogne-Billancourt, France). For these assays, 80,000 cells were seeded and incubated at 37 °C for 24 h under normoxic conditions. Once the scar was made, cells were placed under normoxia or hypoxia for another 24 h.

4.7. Transfection Assays

In all, 200,000 cells/well were seeded in growth medium in a 6-well plate and incubated at 37 °C overnight. After 24 h, cells were transfected with a free-serum opti-MEM medium containing a mixture of Lipofectamine RNAimax (10514953, Fisher Scientific TM, Illkirch, France) and 20 nM of siRNA. Transfected cells were incubated at 37 °C for 6 h. The medium was then removed and replaced with a fresh growth medium. siRNA used in this study are available in Table S3 (Supplementary Materials). For CyPPA experiments, cells were treated after 24 h of transfection with CyPPA (10 µM) for another 24 h.

4.8. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using the Mann–Whitney test and Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by Dunn's test (as indicated in figure legends). All results are expressed as mean +/− SEM.

5. Conclusions

The present study identified an original signaling pathway associated with increased PCa aggressiveness, promoted by hypoxia and leading to Zeb1 and SK3 induction through an increase of Ca^{2+} entry. LA and EPA supplementation strongly inhibited several steps of this process, which underlines their therapeutic potential as adjuvant for cancer treatments.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at http://www.mdpi.com/1422-0067/21/13/4786/s1.

Author Contributions: F.B. (Fanny Bery) and S.F., data acquisition and data analysis of most of the experiments; D.F. and S.K., data acquisition and data analysis (in vitro); R.G., data acquisition (immunohistochemistry); F.B. (Franck Bruyère), provided human tissues and clinical data; M.P.-C. and C.V., helped to design the in vitro experiments; G.F. study concept, study design, supervised all the pathology experiments; K.M., study concept, study design, data analysis, manuscript preparation; K.M., F.B. (Fanny Bery), and G.F., wrote the paper. All authors, manuscript review. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the University of Tours, France, the Région Centre-Val de Loire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Cancéropôle Grand Ouest, the Ligue Contre le Cancer, the CANCEN Association, and the Institut National du Cancer (INCa PLBIO14-213).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition
EPA	Eicosapentaenoic acid
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1α
HRE	Hypoxia-response element
FA	Fatty acid
LA	Linoleic acid
PA	Palmitic acid
PCa	Prostate cancer
SOCE	Store-operated Ca2+ entry

References

1. Harris, A.L. Hypoxia—A key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 38–47. [CrossRef] [PubMed]
2. Ragnum, H.B.; Vlatkovic, L.; Lie, A.K.; Axcrona, K.; Julin, C.H.; Frikstad, K.M.; Hole, K.H.; Seierstad, T.; Lyng, H. The tumour hypoxia marker pimonidazole reflects a transcriptional programme associated with aggressive prostate cancer. *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 382–390. [CrossRef]
3. McKeown, S.R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br. J. Radiol.* **2014**, *87*, 20130676. [CrossRef]
4. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–196. [CrossRef] [PubMed]
5. Zhang, P.; Wei, Y.; Wang, L.; Debeb, B.G.; Yuan, Y.; Zhang, J.; Yuan, J.; Wang, M.; Chen, D.; Sun, Y.; et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 864–875. [CrossRef]
6. Azimi, I.; Milevskiy, M.J.G.; Kaemmerer, E.; Turner, D.; Yapa, K.T.D.S.; Brown, M.A.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. TRPC1 is a differential regulator of hypoxia-mediated events and Akt signalling in PTEN-deficient breast cancer cells. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 2292–2305. [CrossRef] [PubMed]
7. Zhang, W.; Shi, X.; Peng, Y.; Wu, M.; Zhang, P.; Xie, R.; Wu, Y.; Yan, Q.; Liu, S.; Wang, J. HIF-1α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129603. [CrossRef] [PubMed]
8. Choi, B.-J.; Park, S.-A.; Lee, S.-Y.; Cha, Y.N.; Surh, Y.-J. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells through ubiquitin-specific protease 47-mediated stabilization of Snail: A potential role of Sox9. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15918. [CrossRef] [PubMed]
9. Figiel, S.; Vasseur, C.; Bruyere, F.; Rozet, F.; Maheo, K.; Fromont, G. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. *Hum. Pathol.* **2017**, *61*, 26–32. [CrossRef]
10. Sánchez-Tilló, E.; Siles, L.; de Barrios, O.; Cuatrecasas, M.; Vaquero, E.C.; Castells, A.; Postigo, A. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am. J. Cancer Res.* **2011**, *1*, 897–912.
11. Semenza, G.L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 3664–3671. [CrossRef]
12. Azimi, I. The interplay between HIF-1 and calcium signalling in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *97*, 73–77. [CrossRef] [PubMed]
13. Monteith, G.R.; Prevarskaya, N.; Roberts-Thomson, S.J. The calcium–cancer signalling nexus. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 373–380. [CrossRef] [PubMed]
14. Chantome, A.; Potier-Cartereau, M.; Clarysse, L.; Fromont, G.; Marionneau-Lambot, S.; Gueguinou, M.; Pages, J.-C.; Collin, C.; Oullier, T.; Girault, A.; et al. Pivotal Role of the Lipid Raft SK3-Orai1 Complex in Human Cancer Cell Migration and Bone Metastases. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4852–4861. [CrossRef] [PubMed]
15. Guéguinou, M.; Harnois, T.; Crottes, D.; Uguen, A.; Deliot, N.; Gambade, A.; Chantôme, A.; Haelters, J.P.; Jaffrès, P.A.; Jourdan, M.L.; et al. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: A novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline. *Oncotarget* **2016**, *7*. [CrossRef]

16. Figiel, S.; Bery, F.; Chantôme, A.; Fontaine, D.; Pasqualin, C.; Maupoil, V.; Domingo, I.; Guibon, R.; Bruyère, F.; Potier-Cartereau, M.; et al. A Novel Calcium-Mediated EMT Pathway Controlled by Lipids: An Opportunity for Prostate Cancer Adjuvant Therapy. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
17. Figiel, S.; Pinault, M.; Domingo, I.; Guimaraes, C.; Guibon, R.; Besson, P.; Tavernier, E.; Blanchet, P.; Multigner, L.; Bruyère, F.; et al. Fatty acid profile in peri-prostatic adipose tissue and prostate cancer aggressiveness in African–Caribbean and Caucasian patients. *Eur. J. Cancer* **2018**, *91*, 107–115. [CrossRef]
18. Prevarskaya, N.; Skryma, R.; Shuba, Y. Calcium in tumour metastasis: New roles for known actors. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 609–618. [CrossRef]
19. Hill, R.P.; Bristow, R.G.; Fyles, A.; Koritzinsky, M.; Milosevic, M.; Wouters, B.G. Hypoxia and Predicting Radiation Response. *Semin. Radiat. Oncol.* **2015**, *25*, 260–272. [CrossRef]
20. Tam, S.Y.; Wu, V.W.C.; Law, H.K.W. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1α and Beyond. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 486. [CrossRef]
21. Joseph, J.V.; Conroy, S.; Pavlov, K.; Sontakke, P.; Tomar, T.; Eggens-Meijer, E.; Balasubramaniyan, V.; Wagemakers, M.; den Dunnen, W.F.A.; Kruyt, F.A.E. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1α–ZEB1 axis. *Cancer Lett.* **2015**, *359*, 107–116. [CrossRef] [PubMed]
22. Zhu, J.; Huang, Z.; Zhang, M.; Wang, W.; Liang, H.; Zeng, J.; Wu, K.; Wang, X.; Hsieh, J.-T.; Guo, P.; et al. HIF-1α promotes ZEB1 expression and EMT in a human bladder cancer lung metastasis animal model. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 3482–3489. [CrossRef] [PubMed]
23. Yu, S.; Xu, Z.; Zou, C.; Wu, D.; Wang, Y.; Yao, X.; Ng, C.-F.; Chan, F.L. Ion channel TRPM8 promotes hypoxic growth of prostate cancer cells via an O2-independent and RACK1-mediated mechanism of HIF-1α stabilization. *J. Pathol.* **2014**, *234*, 514–525. [CrossRef]
24. Clapham, D.E. Calcium signaling. *Cell* **2007**, *131*, 1047–1058. [CrossRef] [PubMed]
25. Stewart, T.A.; Yapa, K.T.D.S.; Monteith, G.R. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 2502–2511. [CrossRef] [PubMed]
26. Figiel, S.; Pasqualin, C.; Bery, F.; Maupoil, V.; Vandier, C.; Potier-Cartereau, M.; Domingo, I.; Guibon, R.; Bruyere, F.; Maheo, K.; et al. Functional Organotypic Cultures of Prostate Tissues. *Am. J. Pathol.* **2019**, *189*, 1268–1275. [CrossRef]
27. Saini, R.K.; Keum, Y.-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. *Life Sci.* **2018**, *203*, 255–267. [CrossRef]
28. Girault, A.; Haelters, J.-P.; Potier-Cartereau, M.; Chantome, A.; Pinault, M.; Marionneau-Lambot, S.; Oullier, T.; Simon, G.; Couthon-Gourvès, H.; Jaffrès, P.-A.; et al. New alkyl-lipid blockers of SK3 channels reduce cancer cell migration and occurrence of metastasis. *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 1111–1125. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

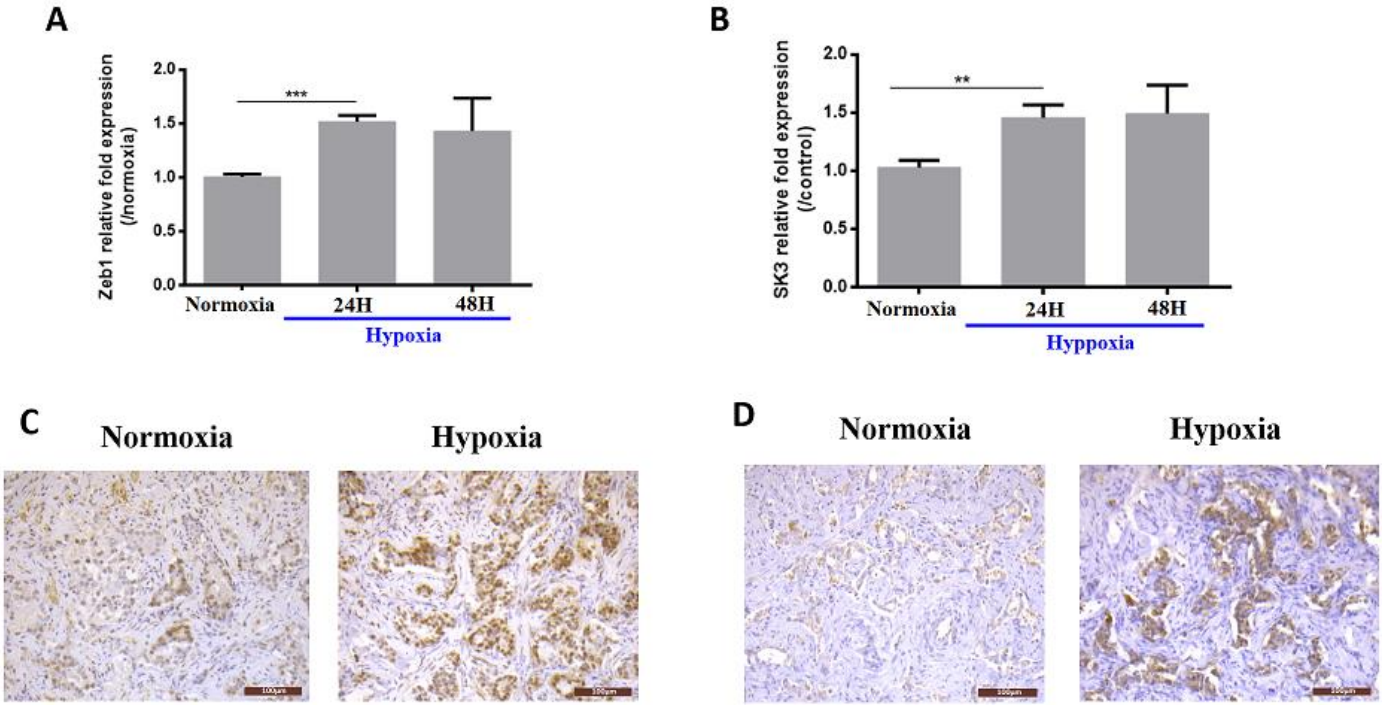


Figure 1: Expression of Zeb1 and SK3 channel under hypoxia conditions.
(A) Zeb1 and (B) SK3 expression in PC3 cells. Cells were cultured under normoxic conditions for 24h and then were cultured under hypoxia (1% O2) for 24h or 48h. qPCR results are normalized to normoxic conditions (N=3; n=3; ** p<0,01; *** p<0,001; Kruskal-Wallis, post test: Dunn). *(C) Zeb1 and (D) SK3 expression in human prostate cancer slices (Scale = 100µm).* Organotypic cultures were cultured under normoxia for 24h and then were cultured under hypoxia (1% O_2) for another 24h. Five slices were obtained for each patient (N=4 patients) to test the different conditions.

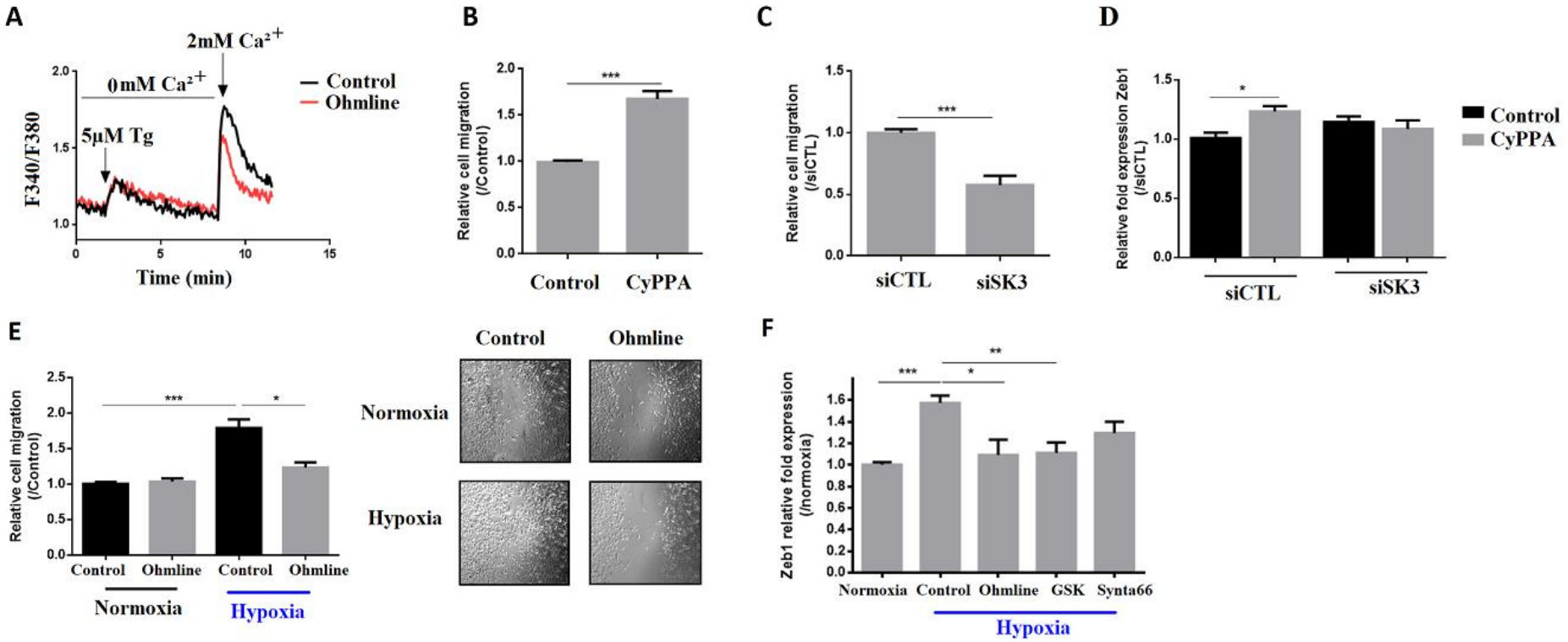

A
2mM Ca2+
0mM Ca2+
5μM Tg
Control
Ohmline
F340/F380
Time (min)
B
Relative cell migration (/Control)
Control
CyPPA
C
Relative cell migration (/siCTL)
siCTL
siSK3
D
Relative fold expression Zeb1 (/siCTL)
Control
CyPPA
siCTL
siSK3
E
Relative cell migration (/Control)
Control
Ohmline
Normoxia
Hypoxia
F
Zeb1 relative fold expression (/normoxia)
Normoxia
Control
Ohmline
GSK
Synta66
Hypoxia

Figure 2: SK3 channel induces Zeb-1 expression and cell migration under hypoxia conditions.
(A) SOCE is inhibited by Ohmline (a SK3 inhibitor). Fluorescence measurements and relative fluorescence of Ca^{2+} entry after endoplasmic reticulum Ca^{2+} store depletion by thapsigargin (Tg) in PC3 cells pre-treated for 48h by Ohmline (1 µM). *(B, C) SK3 channel promotes PC3 cells migration. (*B) PC3 were treated with an SK3 activator, CyPPA (10 µM) and used for transwell migration assay performed for 24h. (N=5; n=2; ***p<0,001; Mann-Whitney test). (C) PC3 were transfected with a siRNA directed against SK3 for 24h and then used for transwell migration assay performed for 24h (N=3; n=3; ***p<0,001; Mann-Whitney test). *(D) SK3 activator regulates Zeb1 expression*. PC3 were transfected with a siRNA directed against SK3 for 24h and then treated with CyPPA (10µM) for another 24h. (C) (N=4; n=3; *p<0,05; Kruskal-Wallis, post test: Dunn). *(E) SK3 regulates hypoxia-induced migration.* PC3 were treated with an SK3 inhibitor, Ohmline (1µM) and used for transwell (left) and wound-healing (right) migration assays performed for 24h under normoxic or hypoxic conditions (N=5; n=2; *p<0,05; *** p<0,001; Kruskal-Wallis, post test: Dunn). *(F) Hypoxia-induced Zeb1 expression is abolished by channel inhibitors.* PC3 cells were treated with Ohmline, GSK7975A and Synta66 (inhibitors of TRP and Orai channels) for 48h and cultured under hypoxia (1% O_2) for the last 24h. (N=3; n=3; *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; Kruskal-Wallis, post test: Dunn).

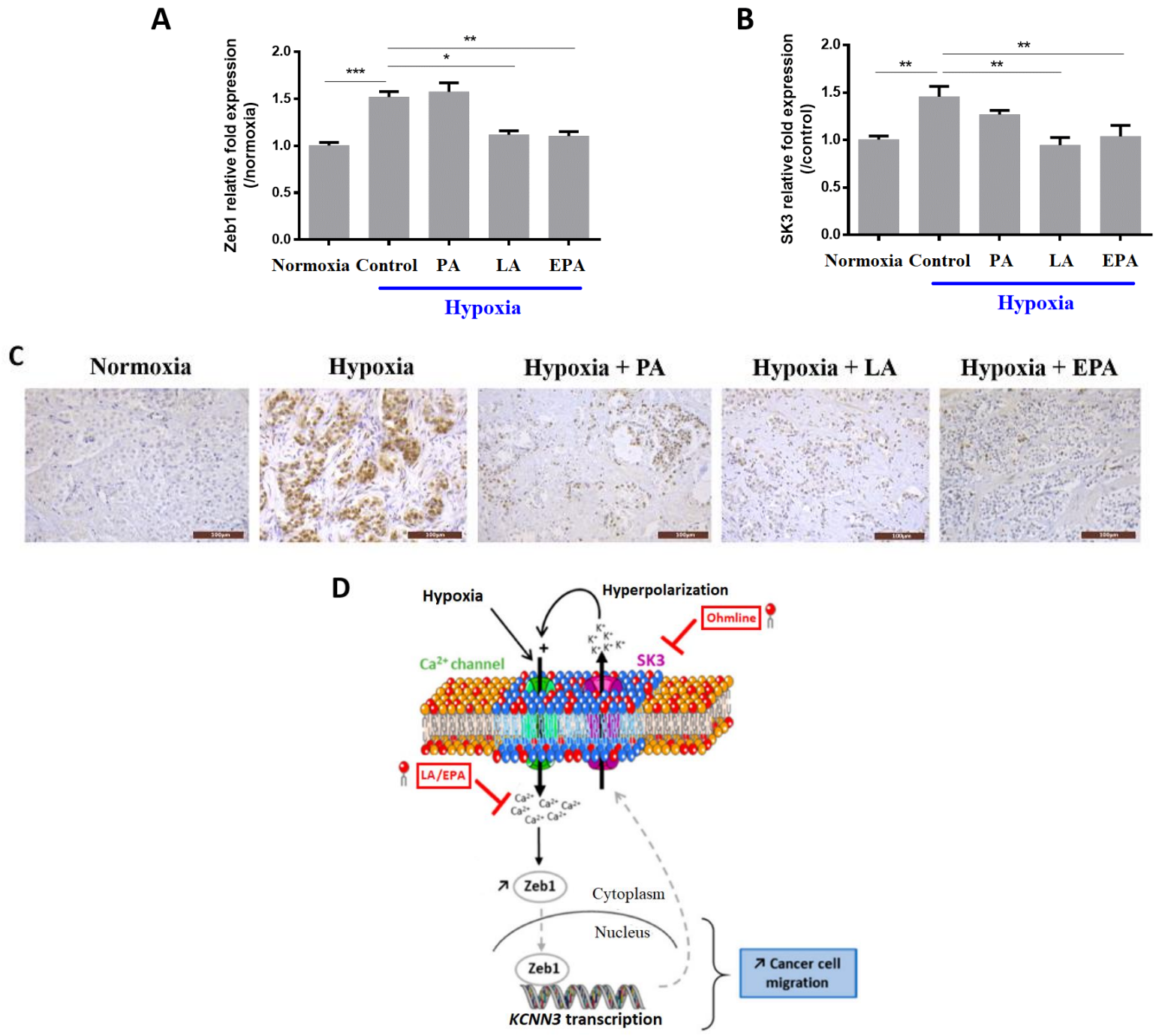

A
Zeb1 relative fold expression (/normoxia)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
*
**
Normoxia Control PA LA EPA
Hypoxia
B
SK3 relative fold expression (/control)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
**
Normoxia Control PA LA EPA
Hypoxia
C
Normoxia
Hypoxia
Hypoxia + PA
Hypoxia + LA
Hypoxia + EPA
D
Hypoxia
Hyperpolarization
Ohmline
Ca2+ channel
SK3
LA/EPA
Zeb1
Cytoplasm
Nucleus
Zeb1
KCNN3 transcription
↗ Cancer cell migration

Figure 3: Linoleic acid (LA) and eicosapentaenoic acid (EPA) inhibit hypoxia-induced Zeb1 and SK3 expression.

(A, B) FA effects on hypoxia-induced Zeb1 and SK3 expression. PC3 cells were treated with FA for 48h and the last 24h cultured under hypoxia (1% O_2). qPCR results are expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$, (N=3; n=3; *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; Kruskal-Wallis, post test: Dunn's test). (C) Zeb1 expression in human prostate cancer slices (Scale =100µm). Organotypic cultures were treated with FA (60 µM) and cultured under normoxia for 24h and then were cultured (with FA) under hypoxia (1% O_2) for another 24h; Zeb1 nuclear expression increased under hypoxia conditions. After palmitic acid (PA) treatment, most of cancer cells (present in the upper right area) were still positive for Zeb1, whereas after treatment with either LA or EPA, only rare Zeb1 positive cancer cells were observed. Five slices were obtained for each patient (N=4 patients) to test the different conditions. (D) Proposed schematic model for a positive feedback loop leading to prostate cancer (PCa) aggressiveness and inhibited by LA and EPA based on our results. In fact, hypoxia induces the transcription factor Zeb1 known to be regulated by calcium. Zeb1 targets the *KCNN3* gene encoding for SK3. At the plasma membrane, the SK3 channel allows an increase in calcium entry by hyperpolarization of the plasma membrane. By incorporating Ohmline, LA and EPA into the membrane, we observed that they inhibit this signaling pathway induced by hypoxia.

Deuxième partie

Identification d’un marqueur et inducteur du CaP neuroendocrine hautement agressif : le récepteur sensible au calcium.

Les stratégies thérapeutiques pour les CaPs les plus agressifs et métastatiques restent limitées et des phénomènes de résistance apparaissent plus ou moins rapidement. Dans 10 à 20% des CRPC, l'émergence d'un phénotype NE est observée. Ces cellules deviennent androgéno-insensibles et expriment des marqueurs NE tels que la CgA, la Syp, la NSE ou la β tubulineIII. Les mécanismes à l'origine de cette transdifférenciation NE sont encore très mal connus.

La différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques a été associée à une modification de l'homéostasie calcique. Il a en effet été montré que l'expression et/ou l'activité de certains canaux calciques est modifiée dans les cellules NE. Le canal calcique Cav3.2, surexprimé dans les cellules NE, joue un rôle dans la sécrétion de peptides NE (339,343). L'expression du canal calcique Orai1 est diminuée dans les cellules NE et associée à une diminution de l'entrée SOCE favorisant la résistance à l'apoptose des cellules androgéno-indépendantes (296).

Nous nous sommes intéressés au CaSR qui est un récepteur connu pour participer au maintien de la calcémie en régulant notamment la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne. Dans le CaP, le CaSR est associé à un risque accru de mortalité et participe à l'agressivité des cellules tumorales (321,322). Notre étude est fondée sur l'observation anatomopathologique au sein d'un carcinome mixte (association d'un contingent NE et d'un contingent adénocarcinomateux) d'une expression accrue du CaSR limitée à la zone NE.

Nous avons alors analysé, par immunohistochimie sur TMA (tissue microarray), l'expression du CaSR et des marqueurs NE CgA et Syp dans une cohorte de tissus provenant de 467 patients et répartis en 4 groupes : 57 tissus prostatiques non tumoraux, 314 CaP localisés (CLC), 81 CaP résistants à la castration métastatiques (MCRPC) et 15 CaP NE (NEPC). Nos résultats montrent qu'il existe une corrélation entre le CaSR et la CgA dans le tissu prostatique. Dans les NEPC, le CaSR et la CgA sont co-exprimés. De plus, le CaSR est associé à une diminution du taux de survie dans les MCRPC.

Nous avons poursuivi notre étude sur des lignées cancéreuses prostatiques afin d'étudier l'effet de la modulation de l'expression du CaSR sur l'expression des marqueurs NE. Nos expérimentations *in vitro* montrent que l'inhibition pharmacologique ou par ARN interférence du CaSR diminue l'expression des marqueurs NE. A l'inverse, l'activation pharmacologique du CaSR favorise l'expression des marqueurs NE.

En conclusion, le CaSR est un marqueur de la différenciation NE du CaP. Son expression est accrue dans les stades les plus agressifs de la maladie et est associée à une diminution du taux de survie. Le ciblage du CaSR par des inhibiteurs spécifiques pourrait être une stratégie pour prévenir la neurodifférenciation du CaP.

Les résultats ont été publiés dans l'article ci-joint. Les figures ont été agrandies à la fin de l'article.

cancers

MDPI

Article

The Calcium-Sensing Receptor is A Marker and Potential Driver of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer

Fanny Bery [1], Mathilde Cancel [1,2], Aurélie Chantôme [1], Roseline Guibon [1,3], Franck Bruyère [4], François Rozet [5], Karine Mahéo [1,†] and Gaëlle Fromont [1,3,†,*]

1 Inserm N2C UMR1069 "Nutrition, Croissance et Cancer" Université de Tours, CEDEX 1, F-37032 Tours, France; fanny.bery@etu.univ-tours.fr (F.B.); mathilde.cancel@univ-tours.fr (M.C.); aurelie.chantome@med.univ-tours.fr (A.C.); R.GUIBON@chu-tours.fr (R.G.); karine.maheo@univ-tours.fr (K.M.)
2 Department of Oncology, CHRU Bretonneau, CEDEX 9, F-37044 Tours, France
3 Department of Pathology CHRU Bretonneau, CEDEX 9, F-37044 Tours, France
4 Department of Urology, CHRU Bretonneau, CEDEX 9, F-37044 Tours, France; f.bruyere@chu-tours.fr
5 Institut Mutualiste Montsouris, Department of Urology, F-75014 Paris, France; francois.rozet@imm.fr
* Correspondence: gaelle.fromont-hankard@univ-tours.fr; Tel.: +33-(0)2-47-47-82-72
† These authors contributed equally to this work.

Received: 9 March 2020; Accepted: 1 April 2020; Published: 2 April 2020



Abstract: The mechanisms underlying neuroendocrine (NE) differentiation in prostate cancer (PCa) remain mostly uncharacterized. Since a deregulated calcium homeostasis has been reported in neuroendocrine prostate cancer (NEPC), we explored herein the link between NE differentiation and the calcium-sensing receptor (CaSR). CaSR expression was evaluated by immunohistochemistry—together with NE markers—on tissue microarrays containing samples of normal prostate, localized PCa, metastatic castration resistant PCa (MCRPC) and NEPC. In prostate tissues, we observed a strong association between CaSR and chromogranin expression. Both markers were strongly expressed in all cases of NEPC and co-expression was confirmed by double immunostaining. In MCRPC, the expression of CaSR was significantly associated with shorter overall survival. The involvement of CaSR in NE differentiation was evaluated in PCa cell lines. Inhibition of CaSR led to decrease the expression of neuronal (NSE, βtubulinIII) and NE (chromogranin, synaptophysin) markers in the NE PCa cell line NCI-H660. A decrease of neuronal and NE markers was also observed in siCaSR-transfected PC3 and 22RV1 cells, respectively, whereas CaSR activation increased both NSE and synaptophysin expression in PC3 cells. These results strongly suggest that CaSR is a marker and a driver of NE differentiation in PCa and emphasize the potential of CaSR directed therapy for NEPC patients.

Keywords: prostate cancer; calcium-sensing receptor; calcium; neuroendocrine differentiation; hormone therapy

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed cancer among men and a common cause of male cancer death. Calcium (Ca^{2+}) signaling has been involved in both the development and progression of PCa. Dietary calcium intake is associated with an increased risk of PCa and aggressive disease in several epidemiological studies [1–4]. This is most likely linked to the fact that changes in cytosolic Ca^{2+} and Ca^{2+} signal trigger key events in cancer cells, such as proliferation, invasion and resistance to apoptosis [5]. Disturbances of Ca^{2+} homeostasis can be caused by various mechanisms,

such as excessive calcium intake in the diet, vitamin D deficiency, structural and functional changes in vitamin D receptor, changes in Ca^{2+} channels and Calcium-Sensing Receptor (CaSR) [6].

The CaSR is a G protein-coupled cell surface receptor (GCPR), characterized by a large extracellular domain that can bind several ligands, including Ca^{2+}, amino acids, vitamin D and interleukin 6 [7]. The best documented role for CaSR is the systemic homeostasis of free ionized Ca^{2+} concentration, through the regulation of parathormone secretion by the parathyroid gland. CaSR is also involved in Ca^{2+} homeostasis in non calcitropic tissues, including brain, lung and breast, where it regulates several cellular processes, such as proliferation, differentiation and hormone secretion [7]. In PCa cell lines, CaSR was reported to be a mediator of Ca^{2+} effects on cell proliferation and tumor progression [8].

Neuroendocrine (NE) cells are normal and rare components of the human prostate, randomly scattered within the epithelium of the prostate glands. These cells contain a variety of neuropeptide and hormones, such as chromogranin A, synaptophysin, neuron-specific enolase (NSE) and others [9]. NE cells are defined in current practice by immunohistochemical positivity for either chromogranin, synaptophysin or CD56 [9]. NE cells can also be found after immunohistochemical staining in usual prostate adenocarcinoma, scattered among cancer cells. The presence of such a focal NE differentiation in hormone naive PCa has not been shown to worsen disease prognosis [9]. In contrast, neuroendocrine prostate cancer (NEPC) is a highly aggressive form of PCa, that rarely arises *de novo* and most often emerges from prostate adenocarcinoma after androgen deprivation or androgen receptor (AR) targeted therapy [10]. Although some NEPC are composed only by NE cells, characterized by the presence of secretory granules, others are admixed with an adenocarcinoma component [10]. NE differentiation of PCa cells has been associated with significant modifications of Ca^{2+} homeostasis compared to adenocarcinoma cells, with increased Ca^{2+} current density and overexpression of voltage-gated Ca^{2+} channel CaV3.2 [11]. This channel is involved in Ca^{2+} dependent secretion of neuroendocrine peptides [12]. The CaSR has been reported to be expressed in cells of the diffuse neuroendocrine system, including the endocrine pancreas [13] and the enteroendocrine cells of the gastrointestinal tract [14], where it regulates hormone secretion. CaSR is also expressed in lung epithelial cells, with a selective staining in NE cells [15].

We therefore hypothesized that NE differentiation in the normal and tumoral prostate could be linked to CaSR expression. The present study aimed to analyze CaSR expression at different stages of PCa progression including NEPC, in correlation with the neuroendocrine phenotype. In addition, we investigated in vitro the impact of CaSR modulation on NE differentiation in PCa cell lines.

2. Results

2.1. Prevalence of CaSR Expression and Correlation with Chromogranin Staining

The characteristics of immunostainings in the different groups of prostate tissues are summarized in Table 1.

In normal prostate tissues, CaSR and chromogranin were expressed in the epithelial compartment in respectively 24 and 23 cases on 57, with less than 1% of positive cells (Figure 1A,B). CaSR staining was observed on cancer cells in 26% of CLC cases, 25% of MCRPC samples (Figure 1C) and 100% of NEPC (Figure 1E). Considering the percentage of positive cells per case, we observed an increase in CaSR staining between CLC, MCRPC and NEPC (Kruskall–Wallis, $p < 0.0001$). Similar findings were found for chromogranin expression (Kruskall–Wallis, $p < 0.0001$) (Figure 1D,F).

Table 1. Markers expression in prostate tissue samples.

	NL (n = 57)	CLC (n = 314)	MCRPC (n = 81)	NEPC (n = 15)
CaSR				
− (*n*)	33	231	61	0
+ (*n*)	24	83	20	15
% (median, range)	1 (1–2)	1 (1–8)	2 (1–15)	90 (40–100)
Chromogranin				
− (*n*)	34	227	67	0
+ (*n*)	23	87	14	15
% (median, range)	1 (1–2)	1 (1–9)	2 (1–7)	80 (10–100)
Synaptophysin				
− (*n*)	45	269	72	9
+ (*n*)	12	42	9	6
Ki67	NA			
% (median, range)		2 (0–12)	6 (0–70)	70 (8–90)
ERG		(274 cases available)		
− (*n*)	NA	114	50	13
+ (*n*)		60	31	2

CaSR: calcium-sensing receptor; NL: normal prostate tissue; CLC: hormone naive clinically-localized cancer; MCRPC: metastatic castration resistant prostate cancer. NEPC: neuroendocrine prostate cancer; NA: not applicable.

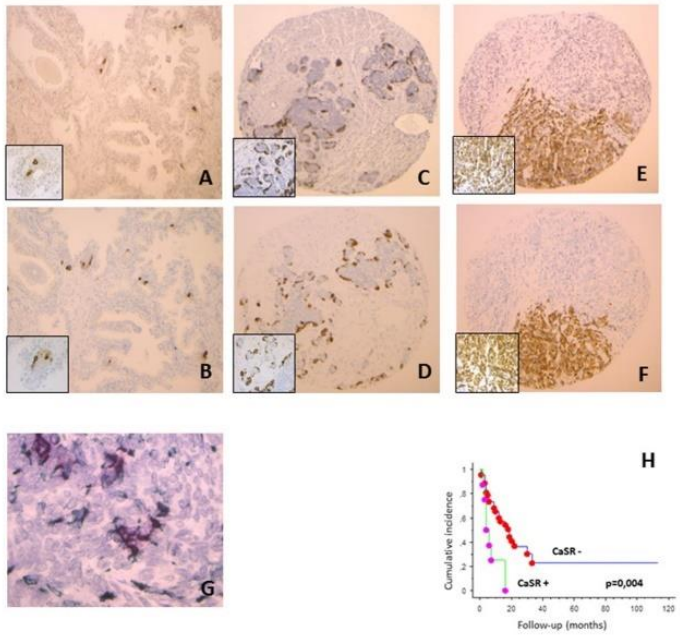


Figure 1. Immunostaining for calcium-sensing receptor (CaSR) (**A**,**C**,**E**) and chromogranin (**B**,**D**,**F**) on sequential slides. Both markers are expressed in the same areas of normal prostate tissue (**A**,**B**, ×10; in inset ×40) and metastatic castration resistant prostate cancerv (MCRPC) (**C**,**D**, ×5; in inset ×40). In case of mixed neuroendocrine prostate cancer (NEPC), only the neuroendocrine (NE) component expressed both CaSR and chromogranin (**E**,**F**, ×5; in inset ×40). (**G**). Double immunostaining showing co-localization of CaSR and chromogranin in MCRPC. Cytoplasmic expression of chromogranin is shown as red; membranous staining of CaSR is shown as green. In some cells, CaSR was expressed without chromogranin staining (×60). (**H**). Kaplan-Meier overall survival in MCRPC patients, according to CaSR staining (p = 0.004).

In normal prostate tissues, CLC and MCRPC, we observed a strong association between CaSR and chromogranin expression (Spearman test, $p < 0.0001$). In NEPC, both markers were expressed

in each case. No significant difference was found in CaSR and chromogranin expression between de novo NEPC and treatment induced NEPC (Mann–Whitney, $p = 0.17$ and 0.09, respectively).

In NEPC, synaptophysin positivity was found only in 6 cases on 15, most often those with low chromogranin staining. In normal prostate tissues, CLC and MCRPC, synaptophysin staining was observed in approximately half of cases positive for chromogranin, and none of negative cases. Double immunostaining confirmed the co-expression of chromogranin and CaSR in all groups of tissues, including MCRPC and NEPC. In some cells, CaSR was expressed without chromogranin staining (Figure 1G).

2.2. Correlation of CaSR Expression with Proliferation and ERG Status. Association with ISUP Group and pTNM Stage in CLC

In the CLC and NEPC groups, no association was found between CaSR and proliferation, determined by the percentage of Ki67 positive cancer cells (Spearman test, $p = 0.4$ and 0.5, respectively) and between CaSR and the ERG status (Mann–Whitney, $p = 0.1$ and 0.9, respectively). In MCRPC, an inverse correlation was observed in one hand between CaSR and proliferation (Spearman test, $p = 0.002$), in the other hand between CaSR and ERG status (Mann–Whitney, $p = 0.007$). A similar inverse correlation was found between chromogranin and ERG status (Mann–Whitney, $p = 0.001$).

In the CLC group, no significant association was found between CaSR and the ISUP score (Kruskall–Wallis, $p = 0.4$). CaSR expression was increased in pT3 tumors compared to pT2 (Mann–Whitney, $p = 0.02$).

2.3. Prognostic Value of CaSR Staining

In CLC treated by radical prostatectomy, CaSR and chromogranin expressions were not significantly associated with biochemical relapse (log rank, $p = 0.18$ and 0.40, respectively); only Ki67 staining was significantly associated with biochemical progression, after adjusting for preoperative PSA, ISUP group and pTNM stage (log rank, $p = 0.007$). In MCRPC, CaSR expression was significantly associated with shorter overall survival (log rank, $p = 0.004$) (Figure 1H), while proliferation and chromogranin staining were not (log rank, $p = 0.3$ and 0.1, respectively).

2.4. Neuroendocrine Profile of PCa Cell Lines and CaSR Expression

The expression of CaSR, neuronal markers (NSE and βtubulinIII) and NE markers (chromogranin and synaptophysin) was analyzed by qPCR and immunohistochemistry in the PCa cell lines NCI-H660, PC3 and 22RV1 (Figures 2 and 3).

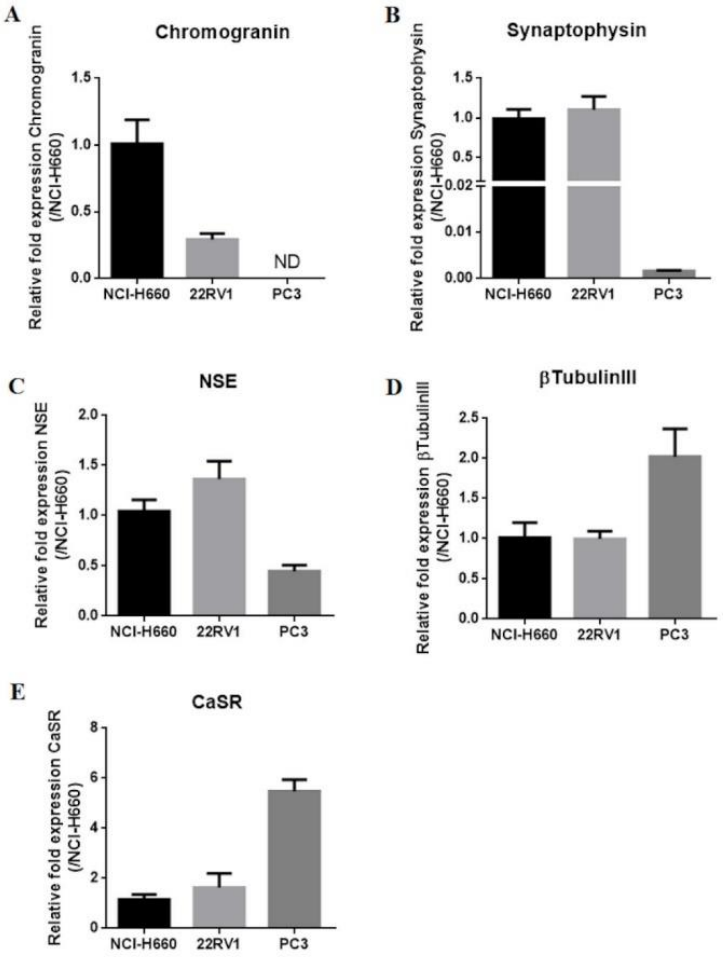


Figure 2. Neuroendocrine markers (**A**–**D**) in NCI-H660, PC3 and 22RV1 cell lines and Expression of CaSR (**E**). qPCR results (mean ± SEM) are expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ and normalized to NCI-H660 cell line.

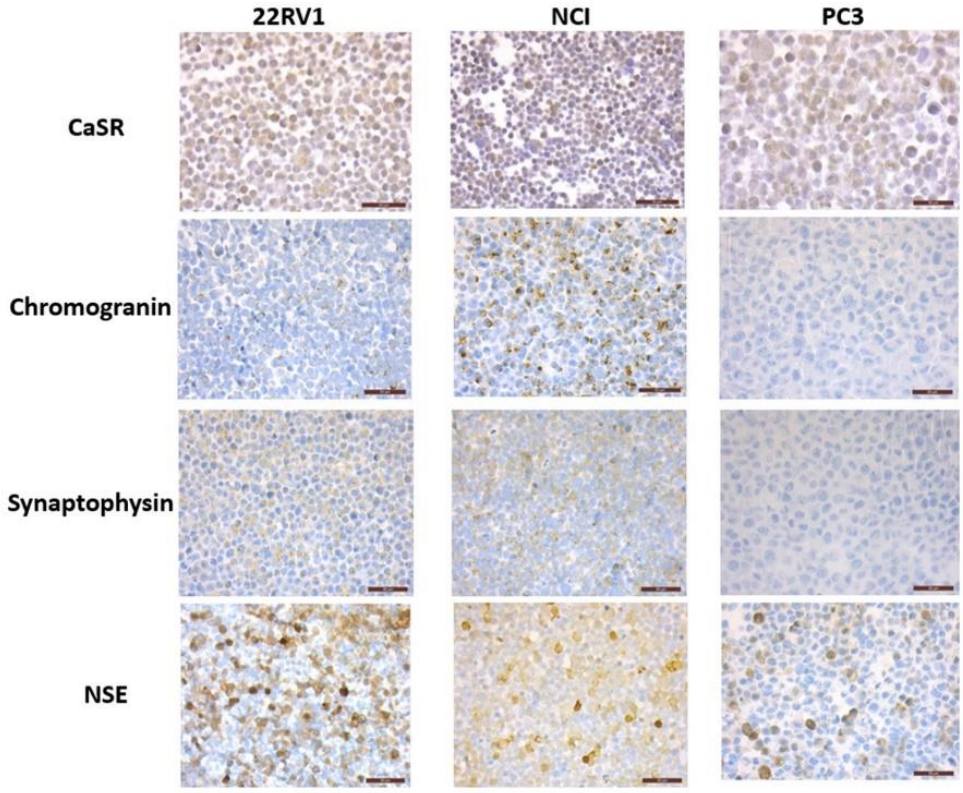


Figure 3. Expression of CaSR and neuroendocrine markers in NCI-H660, PC3 and 22RV1 cell lines. Immunohistochemical staining on cell pellets: all markers are expressed in NCI-H660 and 22RV1 cell lines, with nevertheless a weak expression of chromogranin in 22RV1. In PC3 cells, while both CaSR and NSE are expressed, no staining was observed for chromogranin and synaptophysin.

NCI-H660, the only existing cell line derived from human NEPC, was used as reference. As expected, in the NCI-H660 neuroendocrine cell line, all markers were highly expressed especially the neuroendocrine markers chromogranin and synaptophysin. Unfortunately, this cell line grows extremely slowly, with floating cell clusters that limit the use of the model.

The 22RV1 cell line shows a neuroendocrine expression profile similar to NCI-H660 (except for a lower chromogranin level), suggesting the acquisition of NE characteristics (Figures 2 and 3).

In PC3 cells, chromogranin and synaptophysin were weakly expressed or undetectable. In contrast, consistent expression of neuronal markers was noticed, with a high βTubulinIII mRNA level and a sustained mRNA and protein level expression for NSE (Figures 2 and 3). CaSR was expressed in the 3 PCa cell lines and with the highest mRNA level in PC3 (Figures 2 and 3).

2.5. Pharmacological CaSR Regulators Induce Changes in NE Marker Expression

To evaluate the potential implication of CaSR in neuroendocrine differentiation, we treated the NE cell type NCI-H660 and 22RV1 with the CaSR inhibitor *NPS-2143,* and the neuronal cell type PC3 with R-568, a CaSR-positive allosteric modulator.

Decreased expression of NE markers was observed in NCI-H660 cells treated with *NPS-2143* compared to control cells. Indeed, in treated NCI-H660 cells, the expression of neuronal markers NSE (Figure 4A) and βtubulinIII (Figure 4) was reduced by 42% and 40% respectively and the expression of NE markers chromogranin (Figure 4A) and synaptophysin (Figure 4A) was reduced by 14% and 33%, respectively. In 22RV1 cells treated with NPS-2143, our results showed a decreased expression of synaptophysin by 30% and a decreasing tendency for chromogranin (Figure 4B). After treatment of

PC3 cells with the CaSR activator R-568, NSE and synaptophysin mRNA levels were increased by 41% and 36% respectively (Figure 4C).

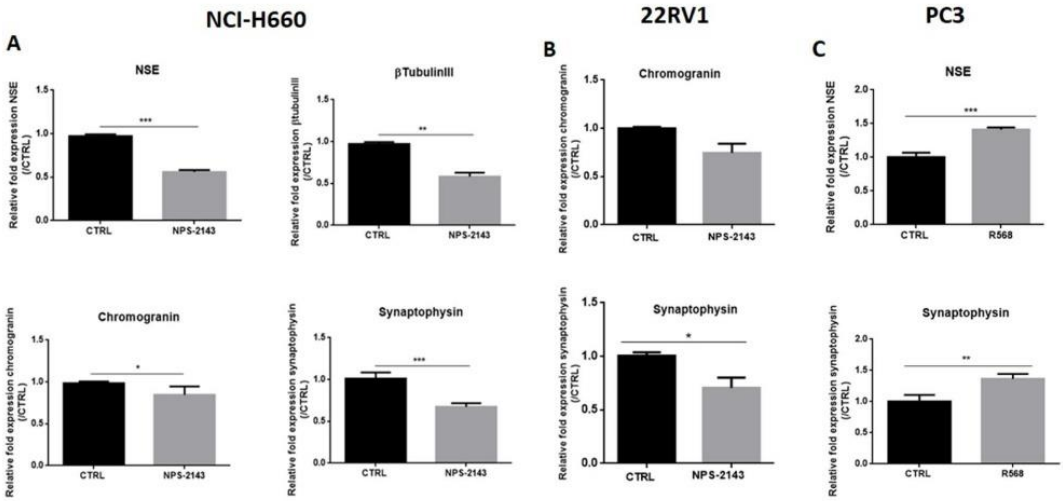


Figure 4. (**A**,**B**): Effects of CaSR inhibitor on the expression of NE markers in NCI-H660 and 22RV1. Cells were treated for 72 h (NCI-H660) or 24 h (22RV1) with a CaSR inhibitor, NPS-2143 at 1 µM (NCI-H660) or 300 nM (22RV1). (**C**): Effects of CaSR activator on the expression of NE markers in PC3. Cells were treated for 24 h with a CaSR activator, R-568 (10 µM) in presence of calcium (1.2 mM). qPCR results are normalized to control condition and are expressed as mean ± S.E.M. The statistical differences are indicated: $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ (Mann–Whitney). $n = 3$.

2.6. Downregulation of CaSR Reduces the Expression of Neuronal Markers in PC3 and Neuroendocrine Markers in 22RV1

To confirm the implication of CaSR in NE differentiation, transfection with siCaSR was performed in PC3 and 22RV1 cell lines. Unfortunately, the NCI-HH60 did not survive transfection. The inhibition of CaSR expression by siRNA was −62% and −51% in PC3 and 22RV1 cell lines, respectively (Figure 5A).

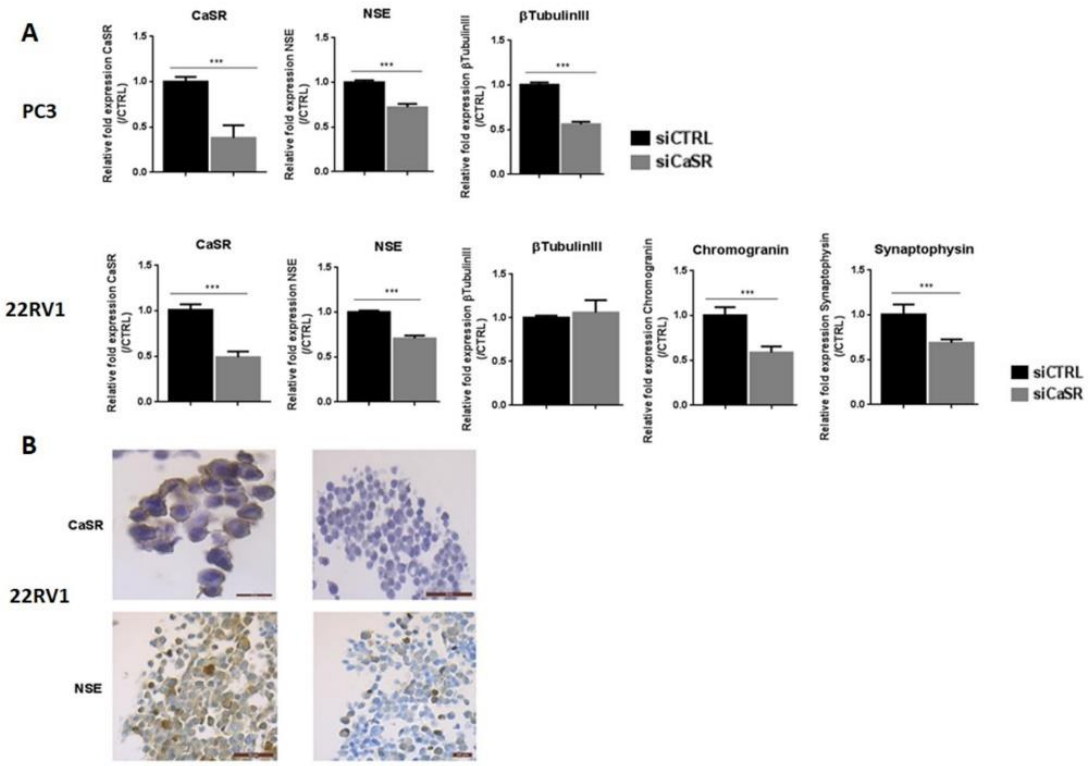


Figure 5. (**A**). Effects of CaSR inhibition on the expression of NE markers in PC3 and 22RV1. Cells were transfected with a siRNA control (siCTRL) or directed against CaSR (siCaSR) for 48 h (qPCR analysis were performed 48 h post-transfection). Results are normalized to control condition and are expressed as mean ± S.E.M. The statistical differences are indicated: ***$p < 0.001$ (Mann–Whitney). $n = 3$. (**B**). Immunohistochemical expression of CaSR and the neuronal marker NSE in 22RV1 cells, transfected with either a siRNA control (siCRTL) or directed against CaSR (siCaSR) for 48 h. CaSR inhibition is confirmed by an absence of immunostaining, and led to a decrease in NSE expression, from focal to almost diffuse.

In siCaSR-transfected PC3 cells, the expression of neuronal markers NSE and βtubulinIII was reduced by 28% and 44%, respectively, and NE markers remained undetectable. CaSR inhibition in the 22RV1 cell line led to decrease the expression of NSE (−30%), synaptophysin (−31%) and chromogranin (−41%) (Figure 5A). All together, these results suggested that CaSR could be involved in the NE differentiation process.

To confirm these results, we analyzed protein expression of CaSR and NSE by immunohistochemistry (Figure 5B). The results confirm the efficiency of the siRNA directed against CaSR, with a strong decrease of CaSR expression in 22RV1. Interestingly, CaSR inhibition also led to a decrease of NSE staining.

3. Discussion

CaSR expression has been previously demonstrated by using immunoblotting in several PCa cell lines and has been shown to be increased in prostate cancer tissues compared to normal prostate [8,16]. A single report has investigated CaSR expression in human PCa by immunohistochemistry, with a positive staining at diagnosis associated with an increased risk of lethal disease [17].

In the present study, we observed in the epithelial compartment of the normal prostate a focal CaSR staining with less than 2% of positive cells. Normal glands with CaSR positive cells also showed a focal staining for chromogranin, in the same areas. In all groups, from normal tissue to NEPC, synaptophysin staining was observed in around half of chromogranin positive cases, suggesting that chromogranin is

a better neuroendocrine marker than synaptophysin in the prostate. In NEPC, other studies, composed mainly of de novo cases, had in contrast reported a more frequent positivity for chromogranin than for synaptophysin [18,19]. This discrepancy could be explained by a different NE profile in post treatment versus de novo NEPC, most of our patients having been previously treated by hormonal deprivation. In conventional PCa with focal NE differentiation, the predominant chromogranin expression in NE cells when compared to synaptophysin has been previously described [20].

Colocalization of chromogranin and CaSR in the same tumor areas was also observed in CLC and MCRPC cases, and CaSR was expressed in all cases of NEPC. Double staining demonstrated that—particularly in NEPC and in MCRPC, where clusters of NE cells are found—most of CaSR positive cells in PCa have a neuroendocrine phenotype.

In human PCa tissues, we correlated CaSR expression with cancer cell proliferation and ERG expression that reflect the presence of the fusion gene TMPRSS2-ERG (observed in around half of PCa cases). We observed in the MCRPC group an inverse correlation between CaSR and both the proliferation and ERG expression. This association was also observed between chromogranin and ERG. In MCRPC, when present, NE cells were largely minority, with a median of 2% of cancer cells. Therefore, the decrease in proliferation we observed may concern non-NE neighboring cancer cells. Such an inhibitory effect of NE cells on the proliferation of adenocarcinoma cells has already been described in cell lines [21] and highlights the paracrine function of NE cells. Inversely, adenocarcinoma cells could also have an impact on the neuroendocrine component. In fact, it has been shown in a transgenic mouse model that ERG expression that reflects the presence of the TMPRSS2-ERG gene fusion, is able to decrease NE cell differentiation [22]. This report is perfectly in accordance with our present observation of decreased chromogranin and CaSR expression in ERG positive PCa. In both the CLC and NEPC groups, we found no significant association between CaSR staining, proliferation and ERG status. In CLC, the median percentage of CaSR positive cancer cells is less than 1%; it is therefore likely that such a tiny component could not able to influence the proliferation of the neighboring non-NE cancer cells. Inversely, in NEPC, all cases expressed CaSR, with a median of 90% positive cells. Therefore, it is understandable that, considering the high and rather homogeneous CaSR expression in NEPC, no association could be found between CaSR staining, the proliferation rate and ERG status (expressed in only 2 cases on 15).

CaSR staining in cancer cells increases with the stages of PCa progression, from pT2 to pT3 in CLC, then in MCRPC and NEPC. We also observed a similar increase in chromogranin expression between CLC and CRPC, as previously described [23–25]. It has been shown that the level of serum chromogranin A is associated with a bad prognosis in CRPC patients treated with either enzalutamide or abiraterone [26,27]. Treatment induced NEPC have a decreased overall survival compared to other CRPCs [28], but it remains uncertain whether focal neuroendocrine divergent differentiation in otherwise standard adenocarcinoma has a prognostic value. In CLC, after adjusting for usual prognostic factors such as ISUP group and pTNM stage, we found no significant correlation between disease free survival and either chromogranin or CaSR staining. In this group of patients, after adjustment, the only marker associated with biochemical recurrence was the proliferation marker Ki67, as previously shown [29]. On the other hand, in MCRPC, the CaSR status was significantly associated with decreased overall survival, while chromogranin staining was not. In six of our MCRPC specimens, CaSR is found to be expressed without chromogranin staining. Moreover, double immunostaining demonstrated that in some cells, CaSR can be expressed without chromogranin staining. These findings suggest that CaSR expression could occur earlier than other NED markers after castration and could be used for prognostic purpose.

It has been suggested that CaSR can act either as a tumor suppressor or as an oncogene, depending on the type of cancer. In colon carcinoma, CaSR is downregulated during tumorogenesis, leading to growth suppressive effects of high Ca^{2+} [30]. On the other hand, CaSR activation could facilitate bone metastasis in breast, kidney and prostate cancer [31–33]. CaSR could be targeted through NPS2143, a calcilytic drug with a good specificity and minor side effects [34], that has been shown

to inhibit in vitro both proliferation and migration of the PCa cell line PC3 [35]. The link between a neuroendocrine phenotype, Ca^{2+} signaling and CaSR has already been suggested. In fact, NE differentiation in PCa cells has been associated with modifications of Ca^{2+} homeostasis [11], and CaSR has been shown to regulate hormone secretion in the enteroendocrine cells of the gastrointestinal tract [14]. The understanding of signal pathways involved in regulating NE differentiation in PCa is hampered by the lack of appropriate animal models or cell lines. NCI-H660, the only widely available NEPC cell line, is derived from a human NEPC, that expresses the PCa-specific TMPRSS2-ERG gene fusion [36]. This cell line is AR negative and expresses high levels of NE markers. However, its growth in vitro is slow—in the form of suspending cells—and transfection with plasmids or siRNA is not very effective, which limits its applications. We have therefore completed the experiments by using the PC3 PCa cell line that expresses neuronal markers, and the 22RV1 cell line that expresses high levels of both neuronal and NE markers.

We observed that CaSR is expressed in the three cell lines. Immunohistochemical staining shows that CaSR was not only localized to the plasma membrane but also in the intracellular compartment. The intracellular pool of receptor that localizes to the ER/Golgi is described as an intracellular reservoir, a mechanism thought to regulate membrane CaSR abundance in the presence of agonist [37]. As previously described, G-protein-coupled receptor (GPCR) are not confined to the plasma membrane and are capable of trafficking among a variety of subcellular compartments, initiating specific signaling pathways at different locations: nuclear, mitochondrial and the endosomal–Golgi membrane [38]. As observed in the present study, CaSR was also localized in the nuclear compartment in some cells and at a lower extend, but its biologic relevance in the nucleus remains to be explored. Activation of CaSR in PC3 cells led to induce a NE phenotype, with increased expression of NSE and synaptophysin. In addition, inhibition of CaSR by siRNA led to decrease the expression of neuronal markers in PC3 and of both neuronal and NE markers in 22RV1. Interestingly, the treatment of NCI-H660 and 22RV1 by the CasR inhibitor (NPS-2143) is able to decrease the expression of both neuronal and NE markers, suggesting that CaSR inhibition should reverse or limit the NE differentiation process. Taken together, these results suggest that CaSR could be a driver of NE differentiation in PCa cells. Several recent studies have proposed various mechanisms of NEPC development, including modifications of the tumor microenvironment with epigenetic effects on cancer cells, as well as reports of molecular drivers such as SRRM4, FOXA1 and ONECUT2 [39]. The connection of CaSR with the previously described molecular mechanisms of NE differentiation remains now to be determined. Since NE differentiation in PCa is mainly observed as a consequence of androgen targeted therapy, it will be necessary to understand the mechanisms initiating treatment induced CaSR expression in PCa cells.

In conclusion, our results demonstrate that CaSR is a marker of NE differentiation in PCa. CaSR expression is increased in aggressive disease states such as MCRPC and NEPC, is associated with decreased survival, and could therefore be targeted through specific antagonists.

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Samples

Normal prostate tissues (n = 57) were obtained from patients treated by cystoprostatectomy for bladder carcinoma, without incidental prostate cancer. Written informed consents were obtained from patients following the requirements of the medical ethic committee of our institution (Comité de Protection des Personnes (CPP) de Tours—Région Centre Ouest I) (Ethic Code: DC-2014-2045) (years between 2003 and 2018). Clinically localized cancer samples (CLC) (n = 314), were obtained from patients treated by radical prostatectomy for localized PCa at Tours University Hospital and Institut Mutualiste Montsouris. CLC cases were composed of 157 tumors with negative surgical margins and biochemical relapse (defined as 2 consecutive increases in serum PSA 0.2 ng/ml or greater), matched with 157 tumors without recurrence. Each patient with biochemical relapse was matched with 1 patient with identical age groups, preoperative PSA, ISUP group and pathological stage, but who was free of

recurrence after at least the same follow-up. This matching allows to have already taken into account the traditional predictive markers, in order to analyze the prognostic value of candidate markers. The median time to recurrence was 19 months (range 2–90) and the median follow-up in the group of patients without recurrence was 55 months (range 25–95).

Fifty-two cases of metastatic castration resistant prostate cancers (MCRPC) were selected from patients treated with androgen deprivation therapy (ADT). Hormonal relapse was defined as 2 consecutive rises in PSA, with serum testosterone under castration level (50 ng/dl). A total of 81 samples were analyzed, with 1 to 4 samples per patient. Tissues were collected either by transurethral resection, performed because of lower urinary tract symptoms associated with local tumor progression (n = 56) or by biopsy from a metastatic site (n = 15), including lymph nodes (n = 7), visceral (n = 7) and bone (n = 1) metastases. The median follow-up after tissue collection was 9.5 months (range 1–113). The median overall survival from tissue collection to death was 6.5 months (1–33 months). Cases with prominent NE cell differentiation were excluded from this group and classified as treatment induced NEPC.

Fifteen cases of neuroendocrine prostate cancer (NEPC) were selected from samples obtained by transuretral resection (n = 10), radical prostatectomy (n = 2) or prostate biopsies (n = 3). The diagnosis of NEPC was performed in case of prominent NE cell population, identified on morphologic criteria (small cells) and after immunostaining with either chromogranin or synaptophysin. Six cases were diagnosed de novo, in the absence of any prior treatment; 9 cases were subsequent to previous hormone deprivation. Six cases were pure NEPC; for 9 patients NEPC was mixed with conventional adenocarcinoma. All patients died; the median overall survival from tissue collection to death was 8 months (0.3–33 months).

The characteristics of patients and tissues are summarized in Table 2. Written informed consents were obtained from patients following the requirements of the medical ethic committee of our institution.

Table 2. Patients and tissues characteristics.

Groups	NL (n = 57)	CLC (n = 314)	MCRPC (n = 52)	NEPC (n = 15)
Age (year), Median (Range)	64 (48–80)	63 (46–74)	69 (48–91)	77 (61–90)
PSA (ng/ml)	-	9 (1.5–22)	31.6 (3.2–2000)	5.8 (0.03–12.8)
pTNM				
pT2	NA	204	NA	NA
pT3		110		
ISUP Group				
1		77		
2	NA	89	NA	NA
3		128		
4–5		20		

NL: normal prostate tissue; CLC: hormone-naive clinically-localized cancer; MCRPC: metastatic castration resistant prostate cancer; y: years; NEPC: neuroendocrine prostate cancer; NA: not applicable.

4.2. Immunohistochemistry on Tissue Micro-Array and Cell Lines

TMA Construction: TMAs were constructed using formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. Original slides stained with hematoxylin-eosin were reviewed using the 2009 TNM classification and the 2014 modified "Gleason" system. For each case, a minimum of 3 cores (0.6 diameter) were transferred from the selected areas to the recipient block, using a TMA workstation (Manual Tissue Arrayer MTA Booster, Alphelys, France). Serial 3 µm sections of the TMA blocks were used for immunohistochemistry. One section on ten was stained with hematoxylin-eosin to check that the cores adequately represented diagnostic areas.

Cell line pellets: cells were washed with a Phosphate Buffered Saline solution (PBS) (CS1PBS00-01, Eurobio, Les Ulis, France) and were harvested by trypsinization using TrypLE Express (12605-028,

Gibco, Waltham, MA, USA). Centrifugation at 1500 rpm during 5 min was performed to get a cell pellet, which was subsequently fixed in formalin, embedded in paraffin and cut in 3 µm sections.

Immunohistochemistry: Slides were deparaffinized, rehydrated and heated in citrate buffer pH 6 for antigenic retrieval. After blocking for endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide, the primary antibodies were incubated. The panel of primary antibodies included chromogranin (Zytomed, Berlin, Germany, MSG 062, 1/1, 30 min), synaptophysin (DakoCytomation, Glostrup, Denmark, clone DAK-SYNAP, 1/200, 30 min), CaSR (Thermofisher, Waltham, MA, USA, clone 5C10 ADD, 1/2000, 1 h), ERG (Roche Ventana, Oro Valley, AZ, USA, EPR 3864, 1/1, 30 min) and the proliferation marker Ki67 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark, clone 39-9, 1/50, 30 min). Immunohistochemistry was performed with either the automated BenchMark XT slide stainer (Ventana Medical Systems Inc, Oro Valley, AZ, USA) using OptiView Detection Kit (Ventana Medical Systems Inc) or manually (for CaSR) using the streptavidin-biotin-peroxidase method with diaminobenzidine as the chromogen (Kit LSAB, Dakocytomation, Glostrup, Denmark). Slides were finally counterstained with hematoxylin. Negative controls were obtained after omission of the primary antibody or incubation with an irrelevant antibody. Positive control for CaSR staining was obtained by using sections of parathyroid tissue.

Double sequential immunostaining was performed using a double stain polymer kit (Zytomed plus 2-step, POLD2S). The first primary antibody (CaSR, mouse monoclonal antibody, Thermofisher, Waltham, MA, USA, clone 5C10 ADD) was applied at 1/2000 dilution and incubated for 1 h. After washing, the second primary antibody (chromogranin, rabbit monoclonal antibody, Abcam, Cambridge, UK, EP 1030Y) was incubated at 1/1000 dilution for 1 h. Horse radish peroxidase (HRP) polymer anti mouse was then applied for 30 min, followed by 10 min incubation with permanent HRP green kit (Zytomed, ZUC 070) as a substrate. Then alkaline phosphatase (AP) was incubated for 30 min, followed by permanent AP red chromogen (Zytomed, Berlin, Germany, ZUC 001). Contrasting chromogens were used to visualize the antibodies, green for CaSR and red for chromogranin. Scoring of antibody staining in TMA: The slides were analyzed by 2 observers in a blinded fashion. Chromogranin, CaSR and Ki67 were expressed as a percentage of total epithelial cells in case of normal tissues, or cancer cells in case of PCa. Synaptophysin and ERG were expressed as positive or negative. In case of inter-observer variability (different categories in the case of categorical data or variability more than 10% in the case of continuous data), which occurred in < 5% of cases, slides were rescored until a consensus was reached.

4.3. Cell Culture and Products

The PCa lines PC3 (CRL-1435), 22RV1 (CRL-2505) and NCI-H660 (CRL-5813) were purchased from American Type Culture Collection (ATTC-HTB-81). PC3 and 22RV1 were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, BE12-702F, Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 5% (PC3) or 10% (22RV1) fetal bovine serum (FBS) (CVF5VF00-01, Eurobio, Les Ulis, France) and 1% penicillin-streptomycin (PS). NCI-H660 were grown in RPMI 1640 Medium (ATCC modification, A10491-01) supplemented with: insulin (0.005 mg/mL); Transferrin (0.01 mg/mL); Sodium selenite (30 nM); Hydrocortisone (10 nM); β-estradiol (10 nM); L-glutamine (2 mM); 5% FBS and 1% PS. All cell lines were maintained in 37 °C humidified incubator with 5% CO_2. The positive allosteric modulator of the CaSR, R-568 (SML2160), was purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). The CaSR inhibitor, calcilytic NPS-2143 hydrochloride (362610), was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom).

4.4. RNA Extraction and Quantitative Real Time PCR

Total RNA was isolated with the Nucleopsin RNA kit (Macherey–Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity were determined by measuring the absorbance at 230, 260 and 280 nm with spectrophotometer EpochTM (Biotek Instruments, Inc, Colmar, France). To obtain cDNA at 50 ng/µL, RNAs were reverse transcribed with RT kit (PrimeScriptTM RT Reagent, Perfect Real Time, Takara, Saint Quentin Yvelines, France). The reaction

progressed in a LightCycler 480 (Roche Applied Science, Meylan, France) at 37 °C during 17 min followed by 85 °C for 5 min. For reactions, 5 µL of SYBR Green mix (RR420L, Takara, Saint Quentin Yvelines, France) was mixed with 1 µL of specific primers (0.5 µL of each primer: forward and reverse) and 1 µL of cDNA at 50 ng/µL. The quantitative PCR analysis was done using CFX ConnectTM BIORAD and analyzed with Biorad CFX Maestro software. Relative levels of mRNA were calculated according to the ΔΔCT method, relative to the housekeeping gene HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) and TBP (TATA-binding protein). Primers used for quantitative real time PCR are available in Table S1.

4.5. Transfection Assays

Cells were plated in culture dishes in culture medium at a density of 170 000 cells/well, 24 h before transfection. Cells were incubated with a mix of siRNA and lipofectamineTM RNAiMAX (10514953, Fisher Scientific TM, Illkirch, France) in medium for 24 h. On the next day, medium was refreshed. SiRNA used in this study are available in Table S2. Experiments were performed 48 h after transfection. PCR and immunohistochemical analysis of cells were performed 48 h after transfection.

4.6. Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out with StatView, version 5.0, software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Comparison between groups was performed using the $\chi 2$ test for categorical data and nonparametric Mann–Whitney U test or Kruskall–Wallis test for continuous data. The relationship between 2 continuous variables was evaluated using the nonparametric Spearman rank correlation test. Recurrence after treatment was analyzed by Kaplan-Meier method, and the curves were compared using the log-rank test. p-values < 0.05 were considered significant.

5. Conclusions

The present study demonstrate that CaSR is a marker of NE differentiation in PCa. CaSR expression is increased in aggressive disease states such as MCRPC and NEPC, is associated with decreased survival, and could therefore be targeted through specific antagonists.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2072-6694/12/4/860/s1, Table S1: Primers used for quantitative real-time PCR; Table S2: siRNA sequences used for transfection assays.

Author Contributions: F.B. (Fanny Bery): data acquisition (in vitro), data analysis (in vitro), statistical analysis, manuscript preparation. M.C.: data acquisition (clinical), data analysis (clinical). A.C.: data acquisition (in vitro), data analysis (in vitro). R.G.: data acquisition (TMA, immunohistochemistry. F.B. (Franck Bruyère) and F.R.: data acquisition (clinical). K.M.: study concept and design (in vitro), data analysis (in vitro), manuscript preparation. G.F.: study concept, study design (clinical), data analysis (clinical), manuscript preparation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the "Ligue Contre le Cancer".

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mitrou, P.N.; Albanes, D.; Weinstein, S.J.; Pietinen, P.; Taylor, P.R.; Virtamo, J.; Leitzmann, M.F. A prospective study of dietary calcium, dairy products and prostate cancer risk (Finland). *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 2466–2473. [CrossRef] [PubMed]
2. Rowland, G.W.; Schwartz, G.G.; John, E.M.; Ingles, S.A. Protective effects of low calcium intake and low calcium absorption vitamin D receptor genotype in the California Collaborative Prostate Cancer Study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2013**, *22*, 16–24. [CrossRef] [PubMed]
3. Kurahashi, N.; Inoue, M.; Iwasaki, M.; Sasazuki, S.; Tsugane, A.S. Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group. Dairy product, saturated fatty acid, and calcium intake and prostate cancer in a prospective cohort of Japanese men. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2008**, *17*, 930–937. [CrossRef] [PubMed]

4. Giovannucci, E.; Liu, Y.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C. A prospective study of calcium intake and incident and fatal prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2006**, *15*, 203–210. [CrossRef]
5. Chalmers, S.B.; Monteith, G.R. ORAI channels and cancer. *Cell Calcium* **2018**, *74*, 160–167. [CrossRef]
6. Skrajnowska, D.; Bobrowska-Korczak, B.; Tokarz, A. Disorders of Mechanisms of Calcium Metabolism Control as Potential Risk Factors of Prostate Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 4229–4244. [CrossRef]
7. Hannan, F.M.; Kallay, E.; Chang, W.; Brandi, M.L.; Thakker, R.V. The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *15*, 33–51. [CrossRef]
8. Bernichtein, S.; Pigat, N.; Barry Delongchamps, N.; Boutillon, F.; Verkarre, V.; Camparo, P.; Reyes-Gomez, E.; Méjean, A.; Oudard, S.M.; Lepicard, E.M.; et al. Vitamin D3 Prevents Calcium-Induced Progression of Early-Stage Prostate Tumors by Counteracting TRPC6 and Calcium Sensing Receptor Upregulation. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 355–365. [CrossRef]
9. Epstein, J.I.; Amin, M.B.; Beltran, H.; Lotan, T.L.; Mosquera, J.M.; Reuter, V.E.; Robinson, B.D.; Troncoso, P.; Rubin, M.A. Proposed morphologic classification of prostate cancer with neuroendocrine differentiation. *Am. J. Surg. Pathol.* **2014**, *38*, 756–767. [CrossRef]
10. Priemer, D.S.; Montironi, R.; Wang, L.; Williamson, S.R.; Lopez-Beltran, A.; Cheng, L. Neuroendocrine Tumors of the Prostate: Emerging Insights from Molecular Data and Updates to the 2016 World Health Organization Classification. *Endocr. Pathol.* **2016**, *27*, 123–135. [CrossRef]
11. Mariot, P.; Vanoverberghe, K.; Lalevee, N.; Rossier, M.F.; Prevarskaya, N. Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10824–10833. [CrossRef] [PubMed]
12. Gackière, F.; Bidaux, G.; Delcourt, P.; Van Coppenolle, F.; Katsogiannou, M.; Dewailly, E.; Bavencoffe, A.; Tran Van Chuoï-Mariot, M.; Mauroy, B.; Prevarskaya, N. CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 10162–10173. [CrossRef]
13. Gray, E.; Muller, D.; Squires, P.E.; Asare-Anane, H.; Huang, G.C.; Amiel, S.; Persaud, S.J.; Jones, P.M. Activation of the extracellular calcium-sensing receptor initiates insulin secretion from human islets of Langerhans: Involvement of protein kinases. *J. Endocrinol.* **2006**, *190*, 703–710. [CrossRef] [PubMed]
14. Feng, J.; Petersen, C.D.; Coy, D.H.; Jiang, J.K.; Thomas, C.J.; Pollak, M.R.; Wank, S.A. Calcium-sensing receptor is a physiologic multimodal chemosensor regulating gastric G-cell growth and gastrin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 17791–17796. [CrossRef] [PubMed]
15. Lembrechts, R.; Brouns, I.; Schnorbusch, K.; Pintelon, I.; Kemp, P.J.; Timmermans, J.P.; Riccardi, D.; Adriaensen, D. Functional expression of the multimodal extracellular calcium-sensing receptor in pulmonary neuroendocrine cells. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 4490–4501. [CrossRef]
16. Huang, C.; Liu, S.; Miller, R.T. Role of p115RhoGEF in the regulation of extracellular Ca(2+)-induced choline kinase activation and prostate cancer cell proliferation. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 2833–2842. [CrossRef]
17. Ahearn, T.U.; Tchrakian, N.; Wilson, K.M.; Lis, R.; Nuttall, E.; Sesso, H.D.; Loda, M.; Giovannucci, E.; Mucci, L.A.; Finn, S.; et al. Calcium-Sensing Receptor Tumor Expression and Lethal Prostate Cancer Progression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *101*, 2520–2527. [CrossRef]
18. Yao, J.L.; Madeb, R.; Bourne, P.; Lei, J.; Yang, X.; Tickoo, S.; Liu, Z.; Tan, D.; Cheng, L.; Hatem, F.; et al. Small cell carcinoma of the prostate: An immunohistochemical study. *Am. J. Surg. Pathol.* **2006**, *30*, 705–712. [CrossRef]
19. Wang, W.; Epstein, J.I. Small cell carcinoma of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* **2008**, *32*, 65–71. [CrossRef]
20. Ather, M.H.; Abbas, F.; Faruqui, N.; Israr, M.; Pervez, S. Correlation of three immunohistochemically detected markers of neuroendocrine differentiation with clinical predictors of disease progression in prostate cancer. *BMC Urol.* **2008**, 8–21. [CrossRef]
21. Wang, Q.; Horiatis, D.; Pinski, J. Inhibitory effect of IL-6-induced neuroendocrine cells on prostate cancer cell proliferation. *Prostate* **2004**, *61*, 253–259. [CrossRef] [PubMed]
22. Mounir, Z.; Lin, F.; Lin, V.G.; Korn, J.M.; Yu, Y.; Valdez, R.; Aina, O.H.; Buchwalter, G.; Jaffe, A.B.; Korpal, M.; et al. TMPRSS2:ERG blocks neuroendocrine and luminal cell differentiation to maintain prostate cancer proliferation. *Oncogene* **2015**, *34*, 3815–3825. [CrossRef]
23. Hirano, D.; Okada, Y.; Minei, S.; Takimoto, Y.; Nemoto, N. Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *Eur. Urol.* **2004**, *45*, 586–592. [CrossRef] [PubMed]

24. Wafa, L.A.; Palmer, J.; Fazli, L.; Hurtado-Coll, A.; Bell, R.H.; Nelson, C.C.; Gleave, M.E.; Cox, M.E.; Rennie, P.S. Comprehensive expression analysis of L-dopa decarboxylase and established neuroendocrine markers in neoadjuvant hormone-treated versus varying Gleason grade prostate tumors. *Hum. Pathol.* **2007**, *38*, 161–170. [CrossRef]
25. Terry, S.; Maillé, P.; Baaddi, H.; Kheuang, L.; Soyeux, P.; Nicolaiew, N.; Ceraline, J.; Firlej, V.; Beltran, H.; Allory, Y. Cross modulation between the androgen receptor axis and protocadherin-PC in mediating neuroendocrine transdifferentiation and therapeutic resistance of prostate cancer. *Neoplasia* **2013**, *15*, 761–772. [CrossRef] [PubMed]
26. Conteduca, V.; Burgio, S.L.; Menna, C.; Carretta, E.; Rossi, L.; Bianchi, E.; Masini, C.; Amadori, D.; de Giorgi, U. Chromogranin A is a potential prognostic marker in prostate cancer patients treated with enzalutamide. *Prostate* **2014**, *74*, 1691–1696. [CrossRef] [PubMed]
27. Fan, L.; Wang, Y.; Chi, C.; Pan, J.; Xun, S.; Xin, Z.; Hu, J.; Zhou, L.; Dong, B.; Xue, W. Chromogranin A and neurone-specific enolase variations during the first 3 months of abiraterone therapy predict outcomes in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int.* **2017**, *120*, 226–232. [CrossRef]
28. Komiya, A.; Yasuda, K.; Watanabe, A.; Fujuichi, Y.; Tsuzuki, T.; Fuse, H. The prognostic significance of loss of the androgen receptor and neuroendocrine differentiation in prostate biopsy specimens among castration-resistant prostate cancer patients. *Mol. Clin. Oncol.* **2013**, *1*, 257–262. [CrossRef]
29. Fromont, G.; Rozet, F.; Cathelineau, X.; Ouzzane, A.; Doucet, L.; Fournier, G.; Cussenot, O. BCAR1 expression improves prediction of biochemical reccurence after radical prostatectomy. *Prostate* **2012**, *72*, 1359–1365. [CrossRef]
30. Brennan, S.C.; Thiem, U.; Roth, S.; Aggarwal, A.; Fetahu, I.S.; Tennakoon, S.; Gomes, A.R.; Brandi, M.L.; Bruggeman, F.; Mentaverri, R.; et al. Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 1732–1744. [CrossRef]
31. Mihai, R.; Stevens, J.; McKinney, C.; Ibrahim, N.B. Expression of the calcium receptor in human breast cancer–a potential new marker predicting the risk of bone metastases. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2006**, *32*, 511–515. [CrossRef] [PubMed]
32. Frees, S.; Breuksch, I.; Haber, T.; Bauer, H.K.; Chavez-Munoz, C.; Raven, P.; Moskalev, I.; Costa, N.D.; Tan, Z.; Daugaard, M.; et al. Calcium-sensing receptor (CaSR) promotes development of bone metastasis in renal cell carcinoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 15766–15779. [CrossRef] [PubMed]
33. Liao, J.; Schneider, A.; Datta, N.S.; McCauley, L.K. Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9065–9073. [CrossRef]
34. Marquis, R.W.; Lago, A.M.; Callahan, J.F.; Trout, R.E.; Gowen, M.; DelMar, E.G.; van Wagenen, B.C.; Logan, S.; Shimizu, S.; Fox, J.; et al. Antagonists of the calcium receptor I. Amino alcohol-based parathyroid hormone secretagogues. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3982–3993. [CrossRef] [PubMed]
35. Yamamura, A.; Nayeem, M.J.; Sato, M. Calcilytics inhibit the proliferation and migration of human prostate cancer PC-3 cells. *J. Pharmacol. Sci.* **2019**, *139*, 254–257. [CrossRef] [PubMed]
36. Mertz, K.D.; Setlur, S.R.; Dhanasekaran, S.M.; Demichelis, F.; Perner, S.; Tomlins, S.; Tchinda, J.; Laxman, B.; Vessella, R.L.; Beroukhim, R.; et al. Molecular characterization of TMPRSS2-ERG gene fusion in the NCI-H660 prostate cancer cell line: A new perspective for an old model. *Neoplasia* **2007**, *9*, 200–206. [CrossRef]
37. Grant, M.P.; Stepanchick, A.; Cavanaugh, A.; Breitwieser, G.E. Agonist-driven maturation and plasma membrane insertion of calcium-sensing receptors dynamically control signal amplitude. *Sci. Signal* **2011**, *4*, ra78. [CrossRef]
38. Gerbino, A.; Colella, M. The Different Facets of Extracellular Calcium Sensors: Old and New Concepts in Calcium-Sensing Receptor Signalling and Pharmacology. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 999. [CrossRef]
39. Patel, G.K.; Chug, N.; Tripathi, M. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer—An intriguing example of tumor evolution at play. *Cancers* **2019**, *11*, 1405. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

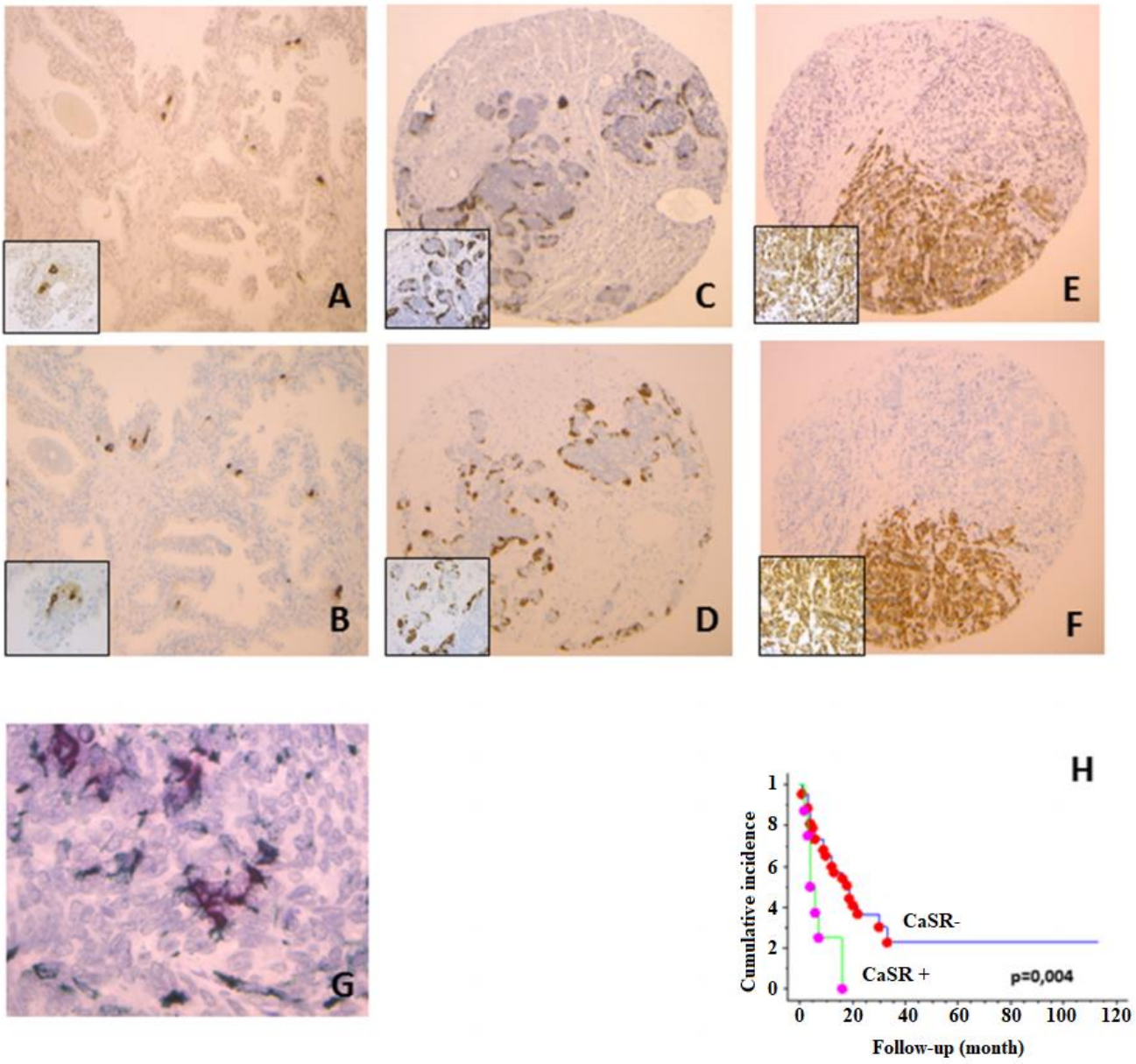


Figure 1: Immunostaining for calcium-sensing receptor (CaSR) (A,C,E) and chromogranin (B,D,F) on sequential slides. Both markers are expressed in the same areas of normal prostate tissue (A,B, ×10; in inset ×40) and metastatic castration resistant prostate cancerv (MCRPC) (C,D, ×5; in inset ×40). In case of mixed neuroendocrine prostate cancer (NEPC), only the neuroendocrine (NE) component expressed both CaSR and chromogranin (E,F, ×5; in inset ×40). (G). Double immunostaining showing co-localization of CaSR and chromogranin in MCRPC. Cytoplasmic expression of chromogranin is shown as red; membranous staining of CaSR is shown as green. In some cells, CaSR was expressed without chromogranin staining (×60). (H). Kaplan-Meier overall survival in MCRPC patients, according to CaSR staining (p = 0.004).

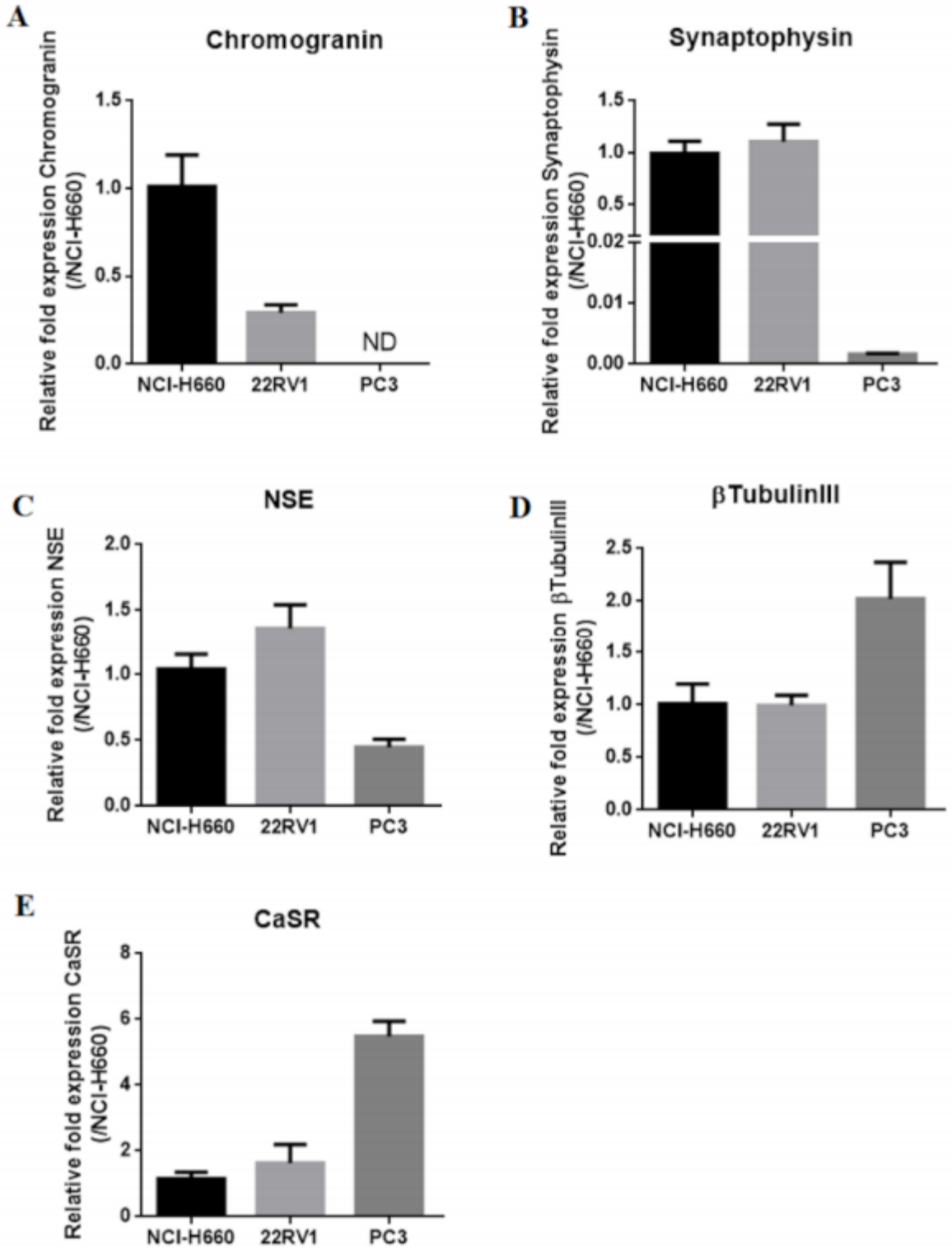


Figure 2: Neuroendocrine markers (A–D) in NCI-H660, PC3 and 22RV1 cell lines and Expression of CaSR (E). qPCR results (mean ± SEM) are expressed in 2-ΔΔCt and normalized to NCI-H660 cell line.

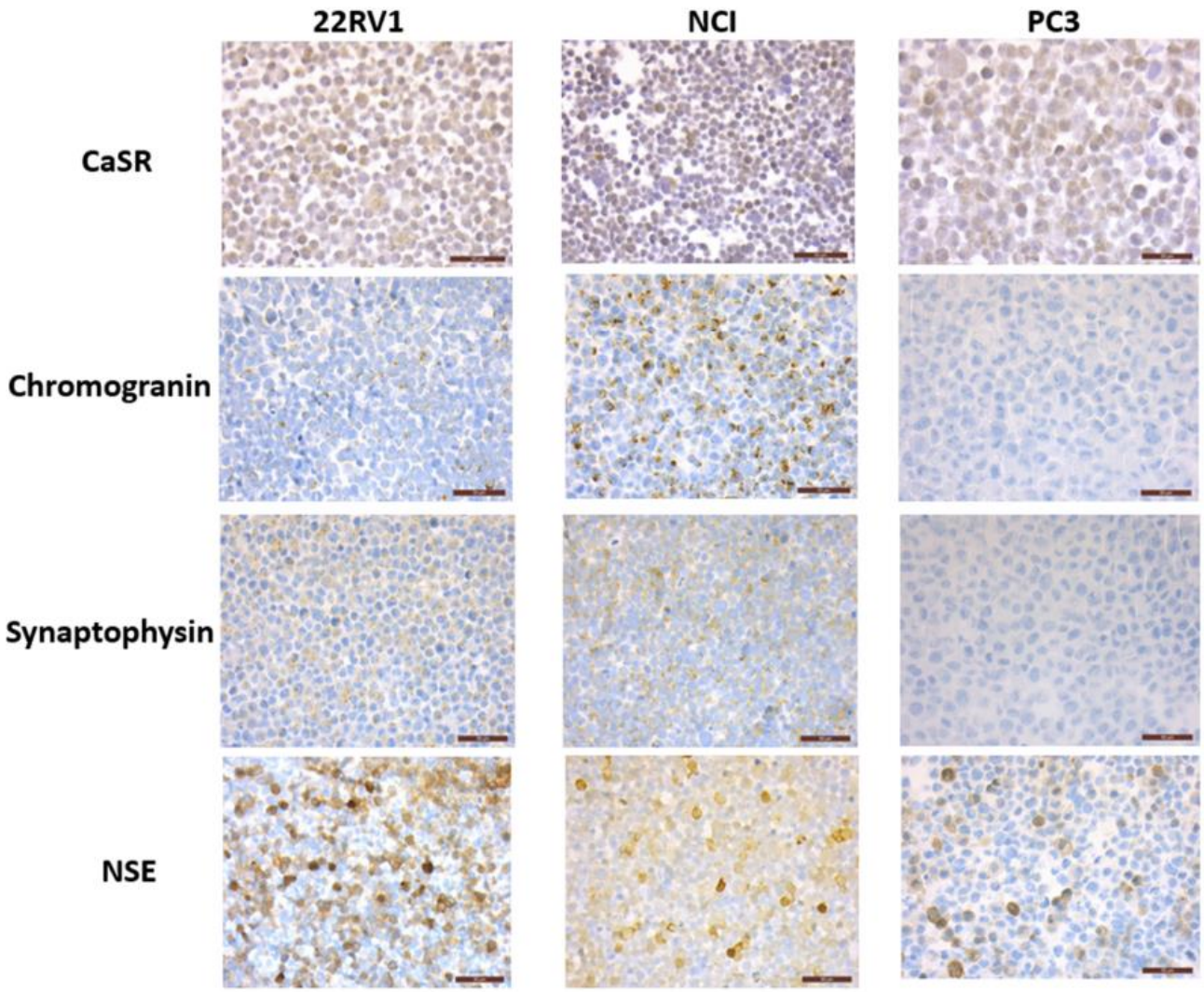


Figure 3: Expression of CaSR and neuroendocrine markers in NCI-H660, PC3 and 22RV1 cell lines. Immunohistochemical staining on cell pellets: all markers are expressed in NCI-H660 and 22RV1 cell lines, with nevertheless a weak expression of chromogranin in 22RV1. In PC3 cells, while both CaSR and NSE are expressed, no staining was observed for chromogranin and synaptophysin

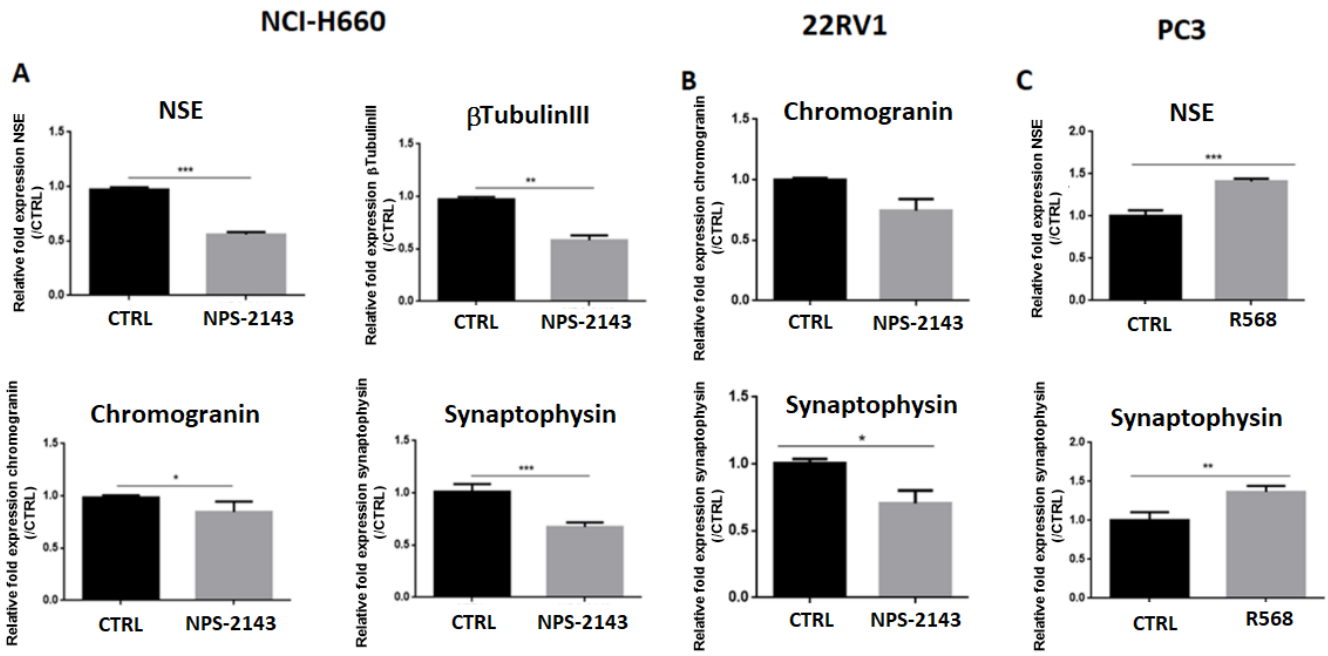


Figure 4: (A, B): Effects of CaSR inhibitor on the expression of NE markers in NCI-H660 and 22RV1. Cells were treated for 72 h (NCI-H660) or 24 h (22RV1) with a CaSR inhibitor, NPS-2143 at 1 µM (NCI-H660) or 300 nM (22RV1). (C): Effects of CaSR activator on the expression of NE markers in PC3. Cells were treated for 24 h with a CaSR activator, R-568 (10 µM) in presence of calcium (1.2 mM). qPCR results are normalized to control condition and are expressed as mean ± S.E.M. The statistical differences are indicated: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 (Mann–Whitney). n = 3.

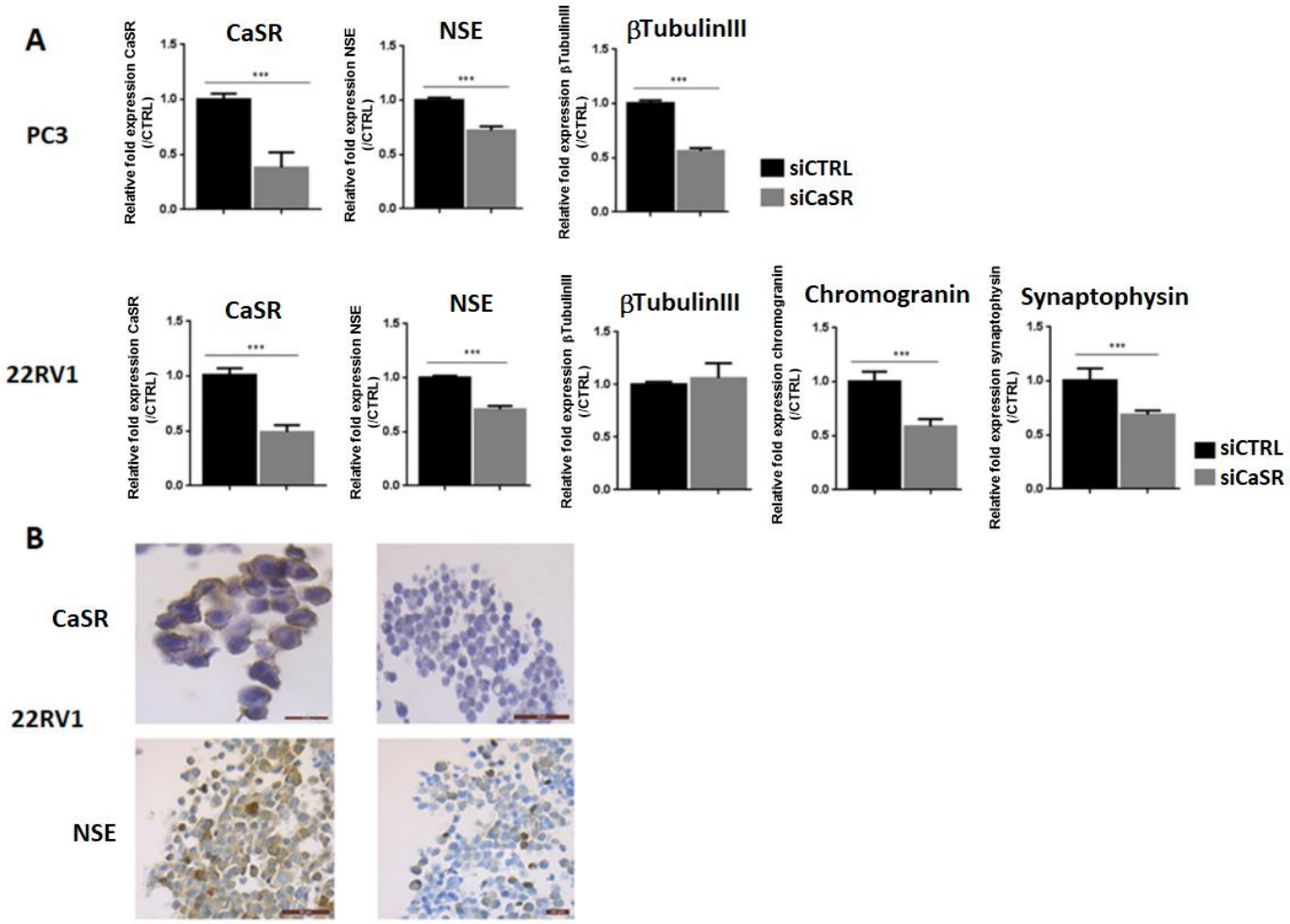


Figure 5: (A). Effects of CaSR inhibition on the expression of NE markers in PC3 and 22RV1. Cells were transfected with a siRNA control (siCTRL) or directed against CaSR (siCaSR) for 48 h (qPCR analysis were performed 48 h post-transfection). Results are normalized to control condition and are expressed as mean ± S.E.M. The statistical differences are indicated: ***$p < 0.001$ (Mann–Whitney). n = 3. (B). Immunohistochemical expression of CaSR and the neuronal marker NSE in 22RV1 cells, transfected with either a siRNA control (siCRTL) or directed against CaSR (siCaSR) for 48 h. CaSR inhibition is confirmed by an absence of immunostaining, and led to a decrease in NSE expression, from focal to almost diffuse.

Troisième partie

Le facteur de transcription Zeb1 et le canal SK3, surexprimés chez les patients atteints d'un CRPC, favorisent la différenciation NE.

Les thérapies de déprivations androgéniques préconisées pour les CaP métastatiques sont efficaces dans un premier temps, néanmoins après quelques mois le cancer progresse à nouveau et atteint le stade de CRPC. Des traitements d'hormonothérapie de nouvelle génération visant à inhiber directement le RA, sont alors proposés aux patients, c'est le cas de l'Enza, un inhibiteur non stéroïdien du RA. Malgré la mise en place de ces thérapies ciblant le RA, la maladie récidive inévitablement et reste mortelle (345,346). Suite à l'exposition aux thérapies ciblant le RA, l'émergence d'un phénotype NE apparaît (347). Les cellules tumorales acquièrent une certaine plasticité qui leur permet de s'adapter et d'acquérir un phénotype NE hautement agressif.

L'hormonothérapie peut également réactiver des programmes embryonnaires associés à la TEM. Ce processus qui permet aux cellules d'acquérir un phénotype mésenchymateux, est associé à l'agressivité et la résistance aux traitements des cellules du CaP (272,348). Il a été montré qu'il existe une boucle de rétroaction négative entre le facteur de transcription Zeb1, qui participe à la progression et l'agressivité du CaP, et le RA. En effet, l'inhibition du RA par l'Enza favorise l'expression de Zeb1 et à l'inverse, l'expression de Zeb1 est diminuée lorsque le RA est activé par la DHT (192,210).

Nous avons précédemment montré que l'homéostasie calcique joue un rôle dans les processus de TEM et de différenciation NE. En effet, nous avons mis en évidence une boucle de régulation positif entre Zeb1 et le canal potassique sensible au calcium SK3, conduisant à une amplification de l'entrée calcique SOCE et une augmentation de la migration cellulaire (349). Nous avons également montré que le CaSR est un marqueur et inducteur de la différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques (350).

Suite à l'ensemble de ces données, nous avons voulu déterminer si l'Enza peut induire le processus de TEM et une dérégulation de l'homéostasie calcique impliqués dans la progression du CaP vers le stade de CaP NE.

Nous avons analysé, par immunohistochimie sur TMA, l'expression du facteur de transcription Zeb1 et des canaux SK3, Orai1 et Orai2 dans une cohorte de tissus provenant de 286 patients et répartis en 3 groupes : 220 CLC, 50 CRPC d'adénocarcinome (CRPC-adéno) et 16 CRPC-NE. Nos résultats montrent que Zeb1, SK3 et Orai2 sont suxexprimés dans les CRPC comparés aux CLC alors que l'expression de Orai1 est diminuée dans les CRPC comparée aux CLC. Nous avons ensuite testé l'effet de l'Enza sur l'expression des marqueurs NE et des acteurs de la TEM et de l'homéostasie calcique dans les cellules LNCaP. Nos résultats montrent

que l'Enza est capable d'induire la différenciation NE des LNCaP qui acquièrent des prolongements cytoplasmiques et expriment des marqueurs NE. Cette neurodifférenciation induite par l'Enza dépend du facteur de transcription Zeb1 et est associée à une augmentation de l'expression de SK3. Concernant les acteurs calciques, nos résultats montrent que l'Enza induit dans un premier temps (24h) une augmentation de l'expression des canaux Orai2 et Orai3 associée à une induction de l'entrée SOCE. Suite à un temps de traitement plus long (1 semaine), l'Enza induit une diminution de l'expression d'Orai1 associée à une diminution des entrées caclciques SOCE et constitutive. Le blocage du canal SK3 par l'Ohmline, permet de prévenir l'induction de Zeb1 et des marqueurs NE par l'Enza.

Ainsi, l'initiation du processus de différenciation NE par l'Enza dépend d'une boucle de régulation positive Zeb1/SK3. Le ciblage du canal SK3 par l'Ohmline permettrait de bloquer cette voie impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses prostatiques à l'hormonothérapie de nouvelle génération.

Matériels et méthodes :

- **Lignées cellulaires et produits utilisés :**

Les lignées cellulaires LNCaP (CRL-1740), C4-2 (CRL-3314) et C4-2B (CRL-3315) ont été achetées à l'ATCC (American Type Culture Collection). Les LNCaP ont été cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) contenant du D-glucose (4,5 g/L), du tampon HEPES (2,383 g/L), de la L-Glutamine, du bicarbonate de sodium (1,5g/L), du pyruvate de sodium (100mg/L) (RPMI, A1049101, Lonza, Levallois-Perret, France) et supplémenté avec 10% de sérum de veau fétal (CVF5VF00-01, Eurobio, Les Ulis, France) et 1% de pénicilline-streptomycine. Les C4-2 et C4-2B ont été cultivées dans du milieu RPMI (BE12-702F, Lonza, Levallois-Perret, France) supplémenté avec 5% de SVF et 1% de PS. Les cellules sont maintenues à 37°C dans un incubateur avec 5% de CO2.

L'Enza (inhibiteur du RA), le CyPPA (activateur du canal SK3) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). L'Ohmline (1-Ohexadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-lactose) a été synthétisée comme décrit précédemment dans *Girault et al., 2011*. Pour les traitements d'une semaine, les cellules ont été traitées 3 fois par semaine avec de l'Enza, Enza+Ohmline ou CyPPA.

- **Extraction d'ARN et PCR quantitative :**

L'extraction des ARN totaux a été effectuée à l'aide du Kit NucleoSpin (Macherey-Nagel GmbH &Co, Allemagne) en suivant les instructions du fournisseur. La quantité d'ARN a ensuite été déterminée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm, en utilisant la loi de Beer-Lambert. La reverse transcription est une réaction qui permet d'obtenir des ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN (50 ng/µL). Le kit PrimeScriptTM RT Reagent (Perfect Real Time) (TAKARA, RR037A) contenant les oligonucléotides, le tampon adéquat pour l'activité enzymatique et la reverse transcriptase, a été utilisé en suivant les instructions du fournisseur. La réaction s'effectue dans un thermocycleur (SensoQuest, Labcycler) à 37°C pendant 15 minutes pour la synthèse des brins d'ADNc par la reverse transcriptase, puis à 85°C pendant 5 secondes pour inactiver l'enzyme.

Le principe de la réaction de qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification au moyen d'un agent intercalant de l'ADN double brin, ici, le Platinum SYBRGreen® (TAKARA, RR420A), qui émet un signal de fluorescence après excitation par des rayonnements ultraviolets. La réaction d'amplification nécessite la réalisation d'un mix contenant :

- L'ADNc issu de la RT des ARN.
- Les amorces nucléotidiques spécifiques du gène d'intérêt.
- Le mix SYBRGreen I contenant la Taq polymérase, les dNTPs, du $MgCl_2$ et l'agent intercalant SYBR Green.

La réaction se déroule sur 40 cycles, avec une phase de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une phase d'hybridation à 60°C pendant 1 minute et une phase d'élongation de l'ADN par la Taq polymérase à 72°C pendant 30 secondes. La qPCR est réalisée à l'aide de l'appareil CFX ConnectTM de chez BIORAD. L'évolution de la fluorescence est suivie en fonction du nombre de cycle de PCR. L'intersection de la courbe de fluorescence avec le seuil (Threshold), placée dans la partie exponentielle de la courbe, permet de déterminer un cycle seuil ou Cycle de Threshold (Ct) pour chaque gène. Ce Ct étant directement lié au nombre de copies de ce gène au début de la PCR. Un faible nombre de copies d'un gène retarde l'apparition d'une fluorescence détectable. Plus le Ct est important, moins le gène est exprimé. La vérification de la spécificité des amorces est réalisée après l'amplification grâce à la courbe de fusion, sur laquelle on observe la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. La fluorescence diminue rapidement lors de la séparation des brins d'ADN qui survient avec l'augmentation progressive de la température. Ainsi l'amplicon généré sera visualisé par la présence d'une courbe en cloche dont la fluorescence maximale correspond à la température de fusion des amorces. Les produits non spécifiques seront représentés par des pics généralement plus larges avec une température de fusion différente. Nous avons utilisé une méthode de quantification relative, la « méthode comparative des Ct » Elle consiste à normaliser l'expression d'un gène d'intérêt par le Ct d'un gène de référence. Nous avons utilisé deux gènes de référence : hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) et TATABox binding protein (TBP). Les formules suivantes sont utilisées :

$$\Delta Ct = Ct \text{ (gène cible)} - Ct \text{ (gène référence)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (condition testée)} - \Delta Ct \text{ (condition témoin)}$$

Le rapport (R) du taux d'acide ribonucléique messager (ARNm) du gène cible entre la condition testée et la condition témoin est donné par la formule suivante : $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Les amorces nucléotidiques utilisées par quantifier les transcrits des gènes d'intérêt ont été achetées chez Sigma-Aldrich et sont répertoriées dans le tableau ci-dessous :

Gènes	Séquences 5'-3'
HPRT s HPRT as	5-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3 5-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3
TBP s TBP as	5-TGTATCCACAGTGAATCTTGGTTG-3 5-GGTTCGTGGCTCTCTTATCCTC-3
Zeb1 s Zeb1 as	5-TGCACTGAGTGTGGAAAAGC-3 5-TGGTGATGCTGAAAGAGACG-3
SK3 exon5 s SK3 exon7 as	5-TGGACACTCAGCTCACCAAG-3 5-GTTCCATCTTGACGCTCCTC-3
NSE s NSE as	5-TGGCTTTGCCCCCAATATCC-3 5-TCTTTTCCGTGTAGCCAGCC-3
Synaptophysine s Synaptophysine as	5-TGCCAACAAGACCGAGAGTG-3 5-TTCGGCTGACGAGGAGTAGT-3
RA s RA as	5-AAGACGCTTCTACCAGCTCAC-3 5-TCCCAGAAAGGATCTTGGGCA-3
PSA s PSA as	5-GGCAGCATTGAACCAGAGGA-3 5-ATCACCCGAGCAGGTGCTTT-3
Vimentine s Vimentine as	5-CCTTGAACGCAAAGTGGAATC-3 5-GACATGCTGTTCCTGAATCTGAG-3
MMP9 s MMP9 as	5-ACGCACGACGTCTTCCAGTA-3 5-CCACCTGGTTCAACTCACTCC-3
Orai1 s Orai1 as	5-AGGTGATGAGCCTCAACGAG-3 5-CTGATCATGAGCGCAAACAG-3
Orai2 s Orai2 as	5-GGCATTCGTATAAATGACCTGGTGG-3 5-GTTGTGGATGTTGCTCACGG-3
Orai3 s Orai3 as	5-CCACGTACCGGGAGTTCG-3 5-ACTCGTGGTCACTCTCCAGC-3

TABLEAU 4 : SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES AMORCES POUR LA QUANTIFICATION DES TRANSCRITS.
(s pour sens et as pour antisens)

- **Transfection transitoire par siARN**

L'objectif de cette technique est d'éteindre transitoirement et spécifiquement l'expression d'une protéine cible par ARN interférent (siARN). Les siARN sont des courtes séquences d'ARN double brin (20-25 nucléotides) ciblant une séquence spécifique en ARNm. Les ARN interférents vont s'associer à un complexe protéique pour former le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex). Ce complexe est capable de se fixer sur l'ARNm cible, entraînant le clivage de la séquence cible par le biais de la protéine Argonaute (endonucléase du complexe RISC). Suite à ce clivage, l'ARNm codant pour la protéine cible est dégradé par des exonucléases cellulaires. La protéine cible n'est alors pas traduite.

Les cellules LNCaP ont été traitées ou non pendant 1 semaine avec de l'Enza (10µM) puis ensemencées en plaque 6 puits à la densité de 250 000 cellules/ puits. Le lendemain, les cellules sont incubées avec un mix contenant le siARN dirigé contre Zeb1 (10nM) et l'agent de transfection, la lipofectamine RNAiMAX (10514953, Fisher Scientific TM, Illkirch, France). Le milieu de culture est changé 24h plus tard et les cellules sont récoltées sous forme de culot cellulaire 96h post transfection.

Les séquences des siARN utilisés lors de cette étude sont répertoriées dans le tableau ci-dessous :

siARN	Sequences 5'-3'
siCTRL	5- GCCGACCAAUUCACGGCCG-3
siZeb1	5- GGCGGUAGAUGGUAAUGUA-3

TABLEAU 5 : SEQUENCES DES SIARN UTILISES.

- **Mesure des variations de la concentration calcique cytosolique**

Les variations de concentration intracellulaire de calcium sont mesurées à l'aide d'une molécule fluorescente, le FURA-2-AM (acétoxyméthylester) (Molecular Probes) qui est une sonde ratiométrique. Cette sonde est utilisée sous forme estérifiée par un groupement AM la rendant ainsi perméable à la membrane cellulaire et incapable de fixer le calcium. Dans le milieu intracellulaire, le groupement AM est clivé par des estérases non spécifiques, induisant la fluorescence et la rétention du fluorophore à l'intérieur de la cellule. La liaison du calcium avec la sonde fluorescente entraîne à la fois une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation. Le FURA-2-AM présente deux longueurs d'onde d'excitation à 340 nm et à 380 nm et une longueur d'onde d'émission à 510 nm. L'émission de fluorescence à 510 nm obtenue en réponse à une excitation à 340 nm (F340) correspond à la forme de la sonde liée au calcium. La réponse d'excitation à 380 nm (F380) correspond à la forme libre de la sonde n'ayant pas fixée de calcium. Le passage d'une condition sans calcium dans le milieu extracellulaire à une condition en présence de calcium se traduit par une augmentation de la fluorescence à 340 nm et une diminution de la fluorescence à 380 nm. Le rapport de fluorescences F340 / F380 mesuré est le reflet de la concentration en calcium intracellulaire.

Pour ces expériences, nous avons utilisé des LNCaP non traitées (CTRL), des LNCaP traitées avec de l'Enza (10µM) pendant 24h et 1semaine (1sem).

Pour la mesure de l'entrée SOCE, les cellules LNCaP ont été ensemencées dans des plaques 96 puits, préalablement cottées avec de la fibronectine, à hauteur de 30 000 cellules dans 200µL de milieu de culture. La mesure est effectuée le lendemain, après 1h d'incubation avec la sonde Fura-2AM (1µg/mL), à l'aide d'un spectrofluorimètre (FlexStation 3, Molecular Devices) qui mesure un point de fluorescence toutes les 4 secondes. Les cellules sont placées dans une solution saline physiologique (PSS) sans calcium, puis après un temps de stabilisation (100s), une injection de thapsigargine (Tg 5µM) (Life Technologies) est réalisée, déclenchant la vidange des réserves calciques du RE. La Tg est un inhibiteur des pompes SERCA présentes à la surface du RE et empêche ainsi le repompage du calcium dans le RE. Lorsque la concentration calcique cytosolique revient à son état basal (500s), une injection de calcium (2mM) est réalisée, permettant l'entrée SOCE de calcium. Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel SoftMax Pro (version 5.4.6, Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

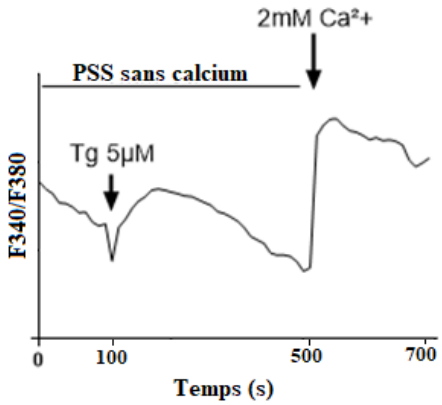


FIGURE 41 : PROTOCOLE DE MESURE DE L'ENTREE SOCE.

Pour la mesure de l'entrée constitutive de calcium, les cellules LNCaP ont été ensemencées à hauteur de 600 000 cellules dans 2 mL de milieu dans des boîtes de Petri à 60 mm de diamètre (Falcon, France). Après 1h d'incubation avec la sonde Fura-2AM (1µg/mL), les cellules ont été décollées et récoltées sous forme de culot cellulaire. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 2mL de PSS sans calcium et placées dans une cuve contenant un aimant rotatif permettant de maintenir les cellules en suspension. La mesure est réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre (F-2710, Hitachi High Technologies America, Inc., Pleasonton, USA). Après un court temps de stabilisation (30s), du calcium 2mM est injecté permettant l'entrée constitutive de calcium.

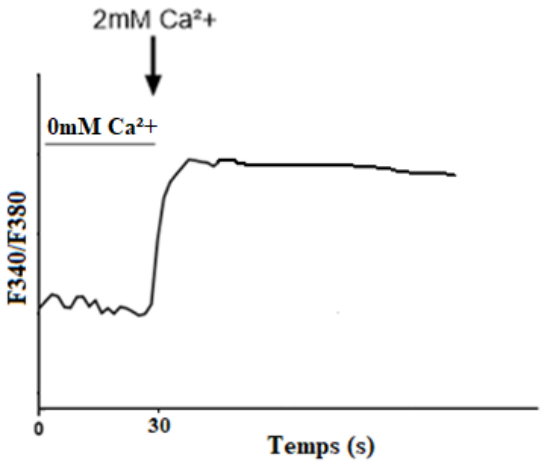


FIGURE 42 : PROTOCOLE DE MESURE DE L'ENTREE CONSTITUTIVE DE CALCIUM.

Composants	Concentration
NaCl	140mM
KCl	4mM
MgCl2	2mM
Glc	11mM
HEPES	10mM
EGTA	1mM

TABLEAU 6 : COMPOSITION DE LA SOLUTION SALINE PHYSIOLOGIQUE.

- **Test de viabilité cellulaire (MTT) :**

Ce test a été utilisé afin de mesurer l'effet de l'Enza sur la prolifération cellulaire. Il permet la numération des cellules vivantes en quantifiant leur activité mitochondriale. Le réactif MTT contenant du milieu de culture et des sels de tétrazolium a été utilisé. Les sels de tétrazolium sont réduits en cristaux de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. L'ajout de DMSO permet de dissoudre les cristaux et génère une coloration violette, proportionnelle au nombre de cellules viables, dont l'absorbance à 570nM est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. 50 000 cellules LNCaP ont été ensemencées dans des plaques 24 puits et traitées ou non pendant 24h, 72h et 1semaine avec de l'Enza (10µM). Les cellules

sont ensuite incubées pendant 1h avec 400µL par puit de réactif MTT à 37°C, puis le réactif est remplacé par 200µL par puit de DMSO. La plaque est ensuite mise 5min sous agitation à l'obscurité puis la lecture d'absorbance à 570nm est réalisée.

- **Culture organotypique :**

Des échantillons tissulaires de CaP ont été obtenus à partir de 4 patients ayant subi une prostatectomie radicale. Les patients étaient âgés de 58 à 71 ans, avec un score ISUP 2 (n=2), 4 (n=1) ou 5 (n=1). Les tumeurs ont été classées aux stades pT2 (n=1) ou pT3 (n=3). Des consentements écrits ont été obtenus des patients conformément aux exigences du comité d'éthique médicale du CHRU Bretonneau de Tours (Comité de Protection des Personnes (CPP) de Tours - Région Centre Ouest I) (code éthique DC-2014-2045) (années 2003-2018).

Les coupes tissulaires ont été réalisées à l'aide d'un vibratome avec une épaisseur d'environ 200-300 µm. Les coupes ont été mises en culture dans des plaques 6 puits contenant 2mL de milieu Dulbecco Modified Eagle Medium supplémenté avec 10 % SVF et de la DHT (1 nM) (Sigma, D073). Les explants ont été traités pendant 5 jours avec de l'Enza (10µM) en présence ou non d'Ohmline (1µM). Les coupes tissulaires ont ensuite été fixées au formol tamponné à 4 % et utilisées pour le marquage immunohistochimique.

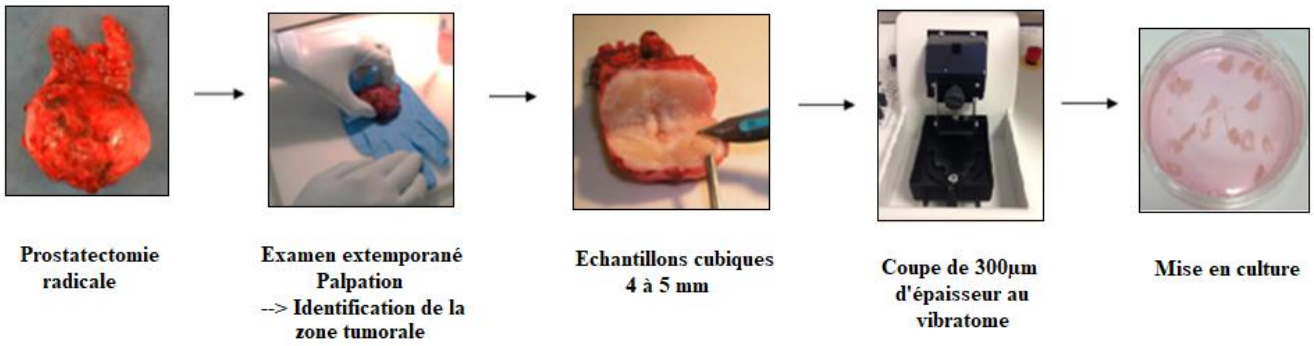


FIGURE 43 : PROCEDURE POUR LA REALISATION DES CULTURES ORGANOTYPIQUES.

- **Tissue microarray**

La technique de TMA permet de collecter sur un même bloc de paraffine (bloc TMA) des centaines d'échantillons tissulaires prélevés sous forme de carottes à partir de biopsies et d'analyser l'expression de protéines d'intérêt notamment par immunohistochimie.

- Elaboration du plan de construction des TMA : Les blocs de biopsies donneurs sont inclus en paraffine. Une coloration à l'hématoxyline-éosine-safran est réalisée sur une coupe de chaque

bloc donneur et examinée en utilisant la classification pTNM et le score ISUP afin de contrôler la qualité des blocs sélectionnés et délimiter les zones d'intérêts où le carottage sera réalisé.

- Construction du bloc TMA : Les TMA ont été construits à l'aide d'un poste de travail TMA (Manual Tissue Arrayer MTA Booster, Alphelys, France). Des carottes (600µm de diamètre) des blocs de biopsies donneurs sont prélevées et transférées dans le bloc TMA receveur qui sera alors chauffé à 37°C pour la bonne cohésion entre les carottes et la paraffine.

- Réalisation des coupes TMA : Des coupes en série de 3µm d'épaisseur ont été réalisées à partir des blocs TMA puis montées sur des lames pour le marquage immunohistochimique.

Patients : Les échantillons de CLC (n=220) ont été obtenus chez des patients atteints d'un CaP localisé, traités par prostatectomie radicale au CHRU Bretonneau de Tours. Les échantillons de CRPC-adéno (n=50) ont été obtenus chez des patients ayant reçu une thérapie anti-androgénique. Les tissus ont été prélevés soit par voie transurétrale soit par biopsie au niveau du site métastatique. L'échappement hormonal a été établi suite à deux augmentations consécutives du taux de PSA associées à une testostéronémie inférieure à 50ng/dl. Les échantillons CRPC-NE (n=16) ont été obtenus par voie transurétrale ou par biopsie au niveau du site métastatique. Le diagnostic de NEPC est établi suite à la présence d'une population de cellules NE identifiée sur des critères morphologiques et immunohistochimiques avec un marquage positif soit pour la CgA soit pour la Syp. Des consentements écrits et éclairés ont été obtenus de la part des patients, conformément aux exigences du comité d'éthique médicale du CHRU Bretonneau de Tours.

Groupes	CLC (n=220)	CRPC-adéno (n=50)	CRPC-NE (n=16)
Age (années), médiane (intervalle)	63 (46-75)	69 (48-91)	73 (52-87)
PSA (ng/ml)	7.4 (4.5-23)	26.9 (3.5-700)	4.1 (0.03-270)
pTNM			
pT2	108	NA	NA
pT3	112		
Score ISUP			
1	49	NA	NA
2	59		
3	102		
4/5	10		

TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES DES PATIENTS ET TISSUS.

CLC: cancer cliniquement localisé hormono-naïf; CRPC: cancer de la prostate résistant à la castration; ; adéno: adénocarcinome; NE: neuroendocrine; NA: non applicable.

- **Immunohistochimie sur TMA, culture organotypique et culots cellulaires :**

Il s'agit d'une technique qui permet de localiser l'expression de protéines à partir d'un échantillon tissulaire ou cellulaire. Après déparaffinage des coupes avec de l'histosol, elles sont plongées 1 minute dans trois bains successifs d'alcool (100 %, 100 %, 70 %) pour éliminer toute trace de paraffine. Après passage à l'eau (2 minutes) pour la réhydratation, les coupes sont immergées dans du tampon citrate pH=6 puis chauffées au micro-onde (600 Watt, 3 fois 10 minutes) pour démasquer les sites antigéniques. Afin de bloquer les sites non spécifiques, les coupes sont recouvertes de peroxyde d'hydrogène à 3% (5 minutes), puis rincées avec du tampon PBS-Tween. L'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt est incubé à température ambiante pendant 30 minutes ou 1 heure, puis rincé avec du tampon PBS-Tween. Les anticorps primaires utilisés pour les marquages immunohistochimiques sont les suivants : Zeb1 (Abnova, Clone 4C4, dilution 1/500, 1 heure), SK3 (LSBio, dilution 1/200, 1 heure), Orai1 (Lifespan, LS-C94375, dilution 1/4000, 1 heure), Orai2 (Sigma prestige, HPA065937ph6, 1/100, 1 heure), NSE (Cellmark, 760-47-85, 16 min), AR (Roche, clone SP107, 1/1, 30 minutes), et Ki67 (DakoCytomation, clone 39-9, 1/50, 30 minutes).

Un automate de coloration des lames BenchMark XT (Ventana Medical Systems Inc) a été utilisé avec le kit de détection Optiview (Ventana Medical Systems Inc). La détection des anticorps primaires dirigés contre les protéines Zeb1, SK3, Orai1 et Orai2 a été réalisée manuellement avec le kit de révélation LSAB, Dakocytomation, Glostrup, Denmark. Les coupes sont recouvertes de la solution d'anticorps secondaire biotinylé (30 minutes à température ambiante) puis rincées avec du tampon PBS-Tween. La solution de streptavidine conjuguée à la peroxydase HRP est déposée (30 minutes) puis rincée avec du tampon PBS-Tween. Le marquage est visualisé par ajout de diaminobenzidine (DAB) (10 minutes dans l'obscurité). La DAB est un substrat chromogène de la peroxydase, il se produit une coloration brune au niveau de la zone de localisation de la protéine d'intérêt. Les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline (2 minutes) pour permettre la visualisation des noyaux. Avant le montage des lames, elles sont plongées dans des bains successifs d'alcool puis du xylène pour les déshydrater.

Les coupes ont ensuite été analysées par Gaëlle FROMONT (PU-PH Anatomie Pathologique).

- **Mesure de l'activité du promoteur du gène KCNN3 : gène rapporteur : luciférase**

Le gène rapporteur de la luciférase dont l'expression est facilement quantifiable est placé sous le contrôle du promoteur d'intérêt *KCNN3.* La séquence promotrice du gène *KCNN3* (1.7 kb) a été délimitée comme précédemment décrit dans *Sun et al., 2001*., synthétisée et clonée en amont du gène luciférase dans le vecteur rapporteur pGL4.17 (promega).

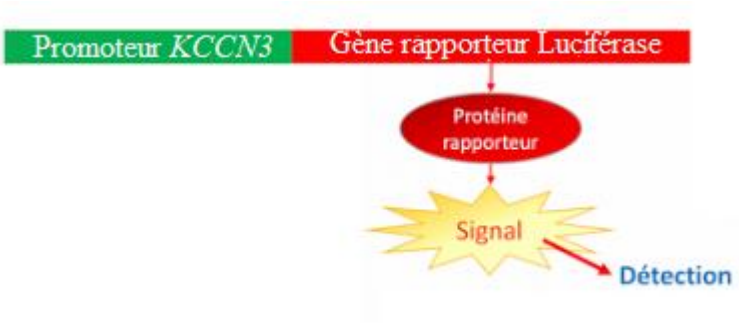


FIGURE 44 : STRUCTURE DU PLASMIDE (PGL4.17-KCNN3) UTILISE POUR L'ETUDE DU PROMOTEUR KCNN3.

La luciférase *Firefly*, issue de la luciole nord-américaine *Photinus pyralis,* catalyse l'oxydation bioluminescente de la luciférine en présence d'oxygène aboutissant à l'émission de photons. L'émission de photons (activité de la *firefly* luciférase) va donc refléter l'activité du promoteur KCNN3.

Le vecteur rapporteur pGL4.17-KCNN3 est co-transfecté avec un vecteur rapporteur luciférase *Renilla* (pRL-TK) qui est utilisé comme contrôle interne. Le gène de la luciférase *Renilla* est contrôlé par le promoteur de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès qui est constitutivement actif et non régulé par des facteurs de transfection. La luciférase *Firefly*, qui constitue notre gène rapporteur d'intérêt, et la luciférase *Renilla* qui constitue notre gène rapporteur contrôle ont des substrats différents, ce qui permet de différencier les émissions de photons spécifiques de chaque enzyme.

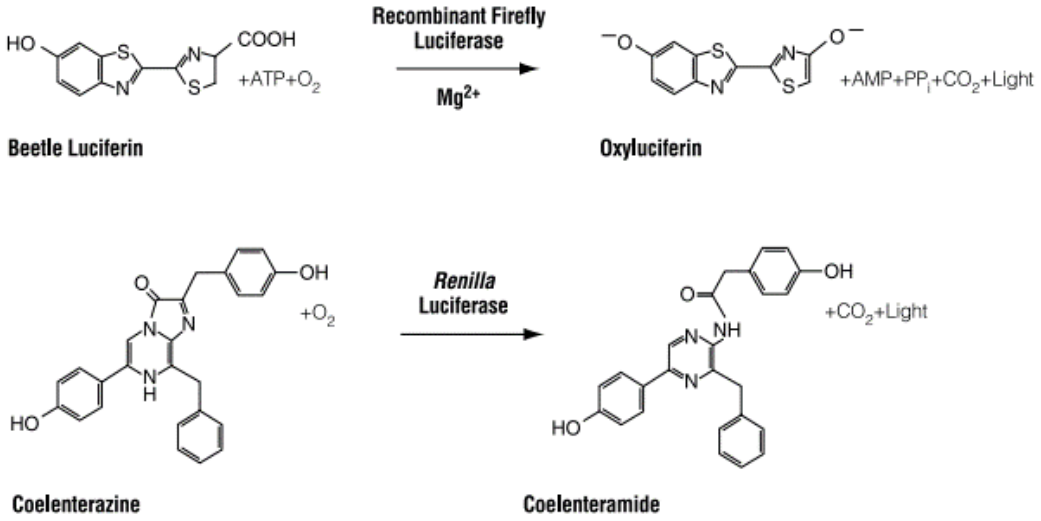


FIGURE 45 : LES REACTIONS DE BIOLUMINESCENCE CATALYSEES PAR LA LUCIFERASE FIREFLY ET LA LUCIFERASE RENILLA (PROMEGA).

Le pic d'émission de la bioluminescence de la luciférase *Firefly* et *Renilla* est mesuré respectivement à la λ de 560 et 470 nm à l'aide d'un luminomètre de façon séquentielle et les mesures sont exprimées en unités arbitraires (u.a) de bioluminescence. Le ratio u.a Firefly/ u.a Renilla est ensuite effectuée et permet de s'affranchir de la variabilité liée au nombre de cellules et/ou à l'efficacité de la transfection.

Pour étudier l'effet de la surexpression de Zeb1 sur l'activité du promoteur du gène *KCNN3*, nous avons utilisé le plasmide pCIneo-Zeb1 ou le plasmide pCIneo en tant que vecteur d'expression contrôle.

55 000 cellules LNCaP ont été ensemencées dans une plaque 24 puits en triplicate pour chaque condition. La transfection a été réalisée 48h plus tard avec :

- 0,48µL de l'agent de transfection TransIT-2020 (Mirus)
- 5ng du vecteur rapporteur contrôle de la luciférase de Renilla pRL-TK (Promega)
- 50 ng de pGL4.17-*KCNN3*
- 100 ng de pCIneo-Zeb1 ou du vecteur contrôle pCIneo. Le plasmide pCIneo-Zeb1 a été fourni par Marc Stemmler (Alexander University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany).

48h après la transfection, les cellules sont rincées avec du PBS (avec calcium) puis lysées avec un tampon de lyse (passive lysis buffer, Promega). La quantification du signal a été mesurée avec le Dual- Luciferase® Reporter Assay System (Promega).

- **Migration cellulaire en insert :**

La migration cellulaire a été étudiée à l'aide d'inserts de migration (Falcon, France) dont le fond comporte des pores de 8µm de diamètre. La capacité des cellules à se déformer pour passer à travers les pores est évaluée. Les inserts ont été déposés sur les puits d'une plaque compagnon (24 puits). Pour favoriser la capacité migratoire des cellules, un gradient de concentration de sérum (5/10%) a été réalisé. 30 000 cellules LNCaP non traitées (CTRL) ou traitées préalablement avec de l'Enza (10µM) depuis une semaine ont été ensemencées dans la partie haute des inserts contenant le milieu de culture supplémenté avec 5% de SVF avec ou sans Enza (10µM) alors que le fond du puit contient du milieu de culture supplémenté avec 10% de SVF avec ou sans Enza (10µM). Après 24 h de migration à 37°C, 5% de CO2, les inserts sont rincés au PBS, puis les cellules sont fixées au méthanol glacé pendant 10 min. Les cellules n'ayant pas migré sont retirées à l'aide d'un coton-tige. Les noyaux sont ensuite marqués au DAPI (1 mg/mL) (Sigma, France) dilué au 1/5000ème dans du PBS sans calcium. Cinq photos par insert sont prises au microscope à fluorescence Nikon TI-S (Nikon, France) et le nombre de cellules est compté.

- **Analyses statistiques :**

Les tests statistiques sont réalisés à partir du logiciel Prism 6 (GraphPad Software). Pour la comparaison de deux groupes avec des variables continues, le test de Mann-Whitney est utilisé. Lorsqu'il y a plus de deux groupes, un test de Kruskal-Wallis (ANOVA) est réalisé suivi d'un post-test de Dunn permettant de comparer les moyennes deux à deux. Tous les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM et ils sont considérés comme significatifs lorsque la probabilité est inférieure ou égale à 0,05.

Résultats

1) L'expression des acteurs Zeb1, SK3 et Orai2 est augmentée chez les patients atteints d'un CRPC d'adénocarcinome et NE.

Nous avons étudié *in vivo* l'expression protéique du facteur de transcription Zeb1, du canal potassique SK3 et des canaux calciques Orai1 et Orai2 dans des échantillons tumoraux issus de 220 patients avec un cancer cliniquement localisé (CLC), 50 patients avec un CRPC d'adénocarcinome (CRPC-adéno) et 16 patients avec un CRPC neuroendocrine (CRPC-NE). Les résultats sont résumés dans le Tableau 8 et la Figure 46.

Nos résultats montrent que l'expression de Zeb1 est augmentée dans les CRPC-adéno ($p=0,01$) et les CRPC-NE ($p=0,005$) par rapport aux CLC. En effet, 66% des cas CLC n'expriment pas Zeb1 (a) alors que 56% des cas CRPC-adéno et 93% des cas CRPC-NE l'expriment (b et c). Le nombre de cas exprimant SK3 est supérieur dans les CRPC-adéno et CRPC-NE comparé aux CLC ($p<0,0001$). En effet, 73% des cas CLC n'expriment pas SK3 (d) alors que 84% ds cas CRPC-adéno et 62 des cas CRPC-NE l'expriment (e et f). Nous observons également plus de cas exprimant Orai2 dans les CRPC-adéno ($p<0,02$) et CRPC-NE ($p<0,0004$) comparé aux CLC. En effet, dans plus de 40% des cas CLC, aucune expression du canal Orai2 n'a été retrouvée (j), alors qu'il est exprimé dans plus de 80% des cas CRPC-adéno et CRPC-NE (k et l). A l'inverse, le nombre de cas exprimant Orai1 est considérablement plus faible dans les CRPC-adéno ($p<0,0001$) et CRPC-NE ($p<0,004$) (h et i) comparé aux CLC dont 64% des cas l'expriment (g).

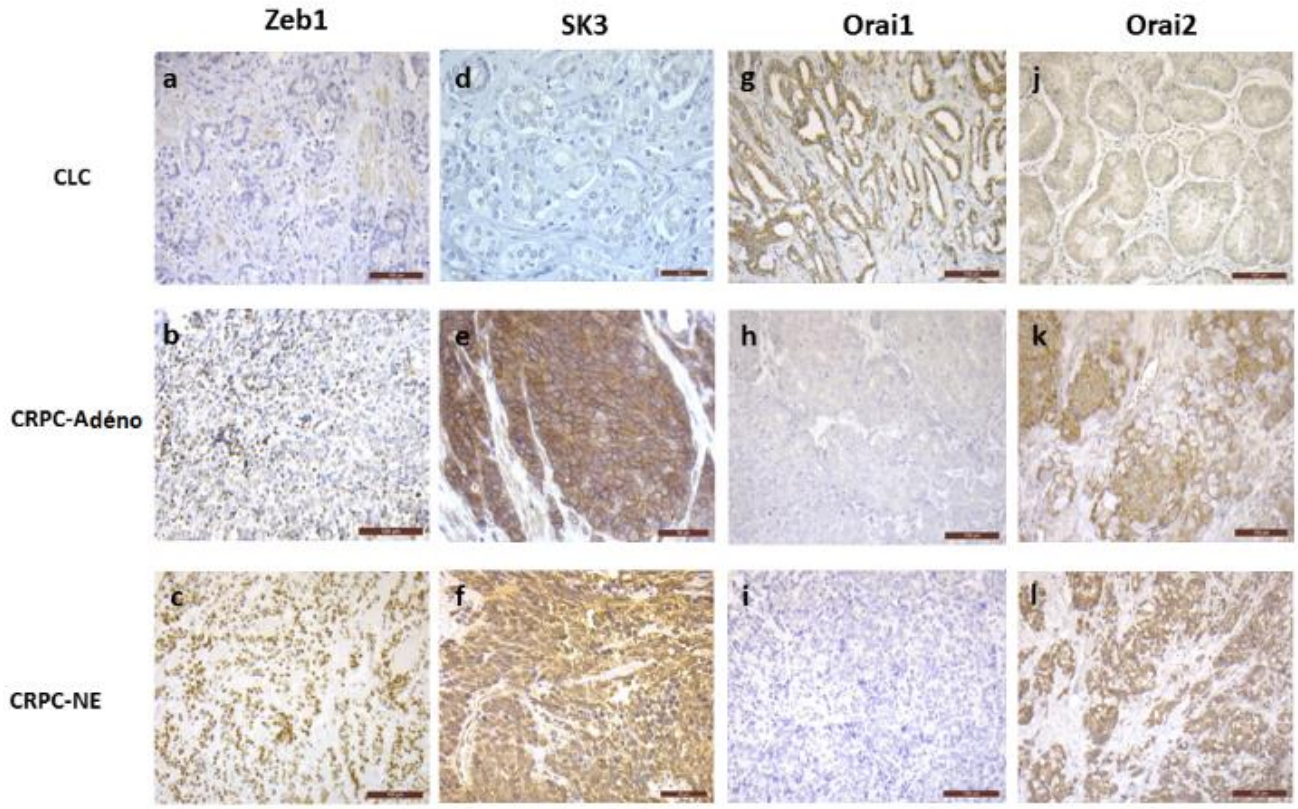


FIGURE 46 : IMAGES REPRESENTATIVES DU MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DES PROTEINES ZEB1, SK3, ORAI1 ET ORAI2 DANS DES TISSUS PROSTATIQUES CANCEREUX HUMAIN.
L'expression protéique de Zeb1, SK3, Orai1 et Orai2 a été étudiée par immunohistochimie à partir de tissus tumoraux prostatiques humains (CLC : Cancer cliniquement localisé hormono naïf, CRPC : Cancer de la prostate résistant à la castration, adéno : adénocarcinome, NE : neuroendocrine).

	CLC (n=220)	CRPC-adéno (n=50)	CRPC-NE (n=16)	p
Zeb1 (%cellules positives)	*NA*: *n=6*	*NA*: *n=2*	*NA*: *n=2*	
	- (n=142)	- (n=21)	- (n=1)	*<0,0001*
	+ (n=72)	+ (n=27)	+ (n=13)	
% + cellules (médiane, intervalle)	*10 (5-80)*	*10 (5-80)*	*40 (10-100)*	
SK3	*NA*: *n=5*	*NA*: *n=6*	*NA*: *n=3*	
	- (n=158)	- (n=7)	- (n=5)	*<0,0001*
	+ (n=50)	+ (n=15)	+ (n=4)	
	++ (n=7)	++ (n=22)	++ (n=4)	
Orai1	*NA: n=24*	*NA: n=3*	*NA: n=2*	
	- (n=69)	- (n=45)	- (n=11)	*<0,0001*
	+ (n=79)	+ (n=2)	+ (n=3)	
	++ (n=46)	++ (n=0)	++ (n=0)	
Orai2	*NA: n=29*	*NA: n=4*	*NA: n=2*	
	- (n=77)	- (n=9)	- (n=2)	*0,0003*
	+ (n=92)	+ (n=28)	+ (n=5)	
	++ (n=22)	++ (n=9)	++ (n=7)	

TABLEAU 8 : EXPRESSION DE ZEB1, SK3, ORAI1 ET ORAI2 DANS LES TISSUS PROSTATIQUES.
(CLC : Cancer cliniquement localisé hormono naïf, CRPC : Cancer de la prostate résistant à la castration, adéno : adénocarcinome, NE : neuroendocrine). NA : Non disponible.

2) L'inhibition du RA par l'Enza induit la différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP.

Afin d'identifier les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie qui conduisent à l'apparition d'un phénotype NE, nous avons utilisé un inhibiteur non stéroïdien du RA, l'Enza qui est préconisé en clinique pour les CRPC métastatiques. Les cellules LNCaP ont été traitées avec de l'Enza pendant 24h, 72h et 1 semaine.

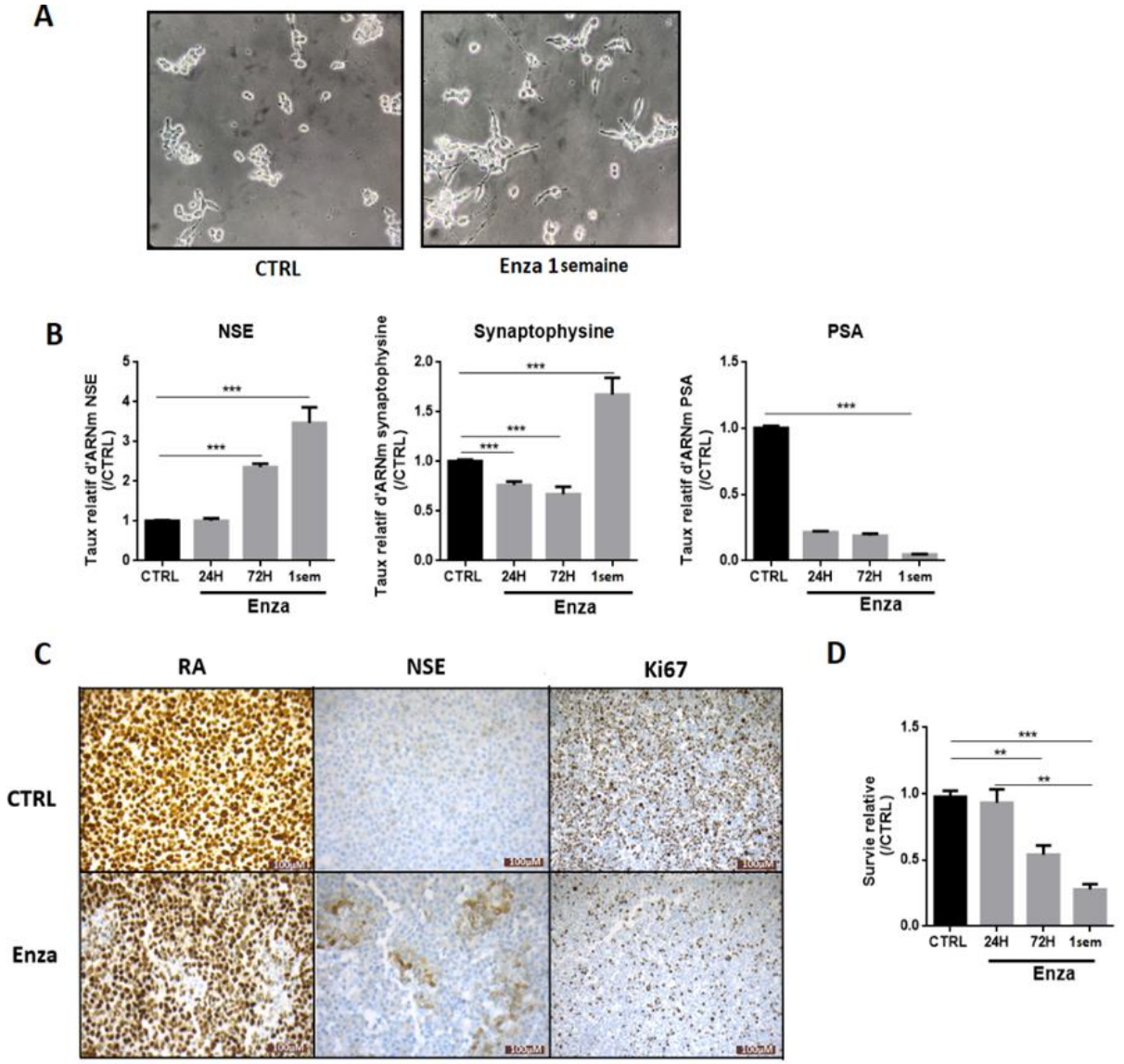


FIGURE 47 : L'INHIBITION DU RA INDUIT LA DIFFERENCIATION NE DES LNCAP.

*A : L'Enza favorise l'apparition de prolongements cytoplasmiques dans les cellules LNCaP. Les images ont été obtenues au microscope optique (grossissement x10). B : L'Enza induit dans un premier temps l'expression du marqueur neuronal NSE, plus tardivement le marqueur NE synaptophysine et inhibe l'expression du PSA. Les LNCaP ont été traitées pendant 24h, 72h et 1semaine avec l'Enza (10µM). Les résultats de qPCR ont été normalisés par rapport au contrôle et sont représentés en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques sont indiquées : *** p <0,001 (Kruskal-Wallis, post test : Dunn), n=3. C : L'Enza diminue l'expression du RA dans les foyers cellulaires exprimant la NSE et diminue drastiquement la prolifération des LNCaP. L'expression protéique du RA, NSE et Ki67 a été obtenue par immunohistochimie dans des LNCaP traitées ou non avec de l'Enza (10µM) pendant 1 semaine. D : L'Enza diminue la prolifération cellulaire des LNCaP. Un test de viabilité cellulaire MTT a été réalisé dans des LNCaP traitées ou non avec de l'Enza (10µM) pendant 24h, 72h et une semaine. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle et sont représentés en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques sont indiquées : **p < 0,01; ***p< 0,001 (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn) n = 3.*

Après avoir traité les cellules LNCaP avec de l'Enza pendant 1 semaine, nous avons observé un changement de phénotype des cellules avec l'apparition de prolongements cytoplasmiques similaires à des neurites qui sont caractéristiques des cellules NE (Fig. 47A). Nous avons étudié l'effet de l'Enza sur l'expression des marqueurs NE. Alors que le marqueur CgA est indétectable avec ou sans traitement, l'expression de la NSE augmente de 2,4 fois dès 72h et de 3,5 fois après une semaine de traitement. Après 24 et 72h, le traitement, n'a pas d'effet sur l'expression de la Syp. Ce n'est qu'après 1 semaine de traitement, que nous observons une augmentation de l'expression de la Syp de 1,75 fois par rapport aux LNCaP contrôles non traitées (Fig. 47B). L'Enza induit donc dans un premier temps l'expression du marqueur neuronal NSE puis plus tardivement l'expression du marqueur NE Syp.

De manière intéressante, les marquages immunohistochimiques présentés en Figure 47C, montrent que l'expression du RA est inhibée dans les foyers cellulaires qui surexpriment la NSE. En effet, la plupart des cellules NE n'expriment plus le RA et deviennent insensibles aux traitements hormonaux. L'ensemble de ces résultats montrent que l'inhibition du RA par l'Enza induit la différenciation NE des cellules LNCaP.

Comme attendu, l'inhibition du RA diminue fortement la prolifération cellulaire : -46% et -73% après respectivement 72h et 1semaine de traitement (Fig. 47D). Nous avons confirmé cette inhibition avec une nette diminution de l'intensité du marquage du marqueur de prolifération cellulaire, Ki67 (Fig. 47C). Afin de contrôler l'efficacité du traitement anti-androgénique, l'expression du PSA, gène cible du RA, a été étudiée. Comme attendu, son expression est fortement inhibée dès 24h de traitement par l'Enza (Fig. 47B).

Nous avons également étudié l'effet de l'Enza dans les C4-2 et C4-2B, deux lignées cellulaires hormono-dépendantes dérivant des LNCaP qui représentent des modèles de CRPC *in vitro*. Parmi les marqueurs NE, seule l'expression de la NSE est augmentée de 2 fois après une semaine de traitement dans les deux lignées (résultats supplémentaires). Ces résultats montrent que l'Enza est capable d'induire une différenciation NE à un stade plus avancé dans la lignée LNCaP comparée aux lignées dérivant des LNCaP. En effet, le marqueur Syp constitue un marqueur des tumeurs NE bien différenciées.

3) Le facteur de transcription Zeb1 est nécessaire pour l'induction du processus de différenciation NE par l'Enza.

Les traitements hormonaux sont capables d'induire le phénomène de TEM qui participe à l'agressivité des cellules cancéreuses. Nous avons donc étudié l'effet de l'Enza sur l'expression

des gènes impliqués dans la TEM et leur potentielle implication dans l'acquisition du phénotype NE.

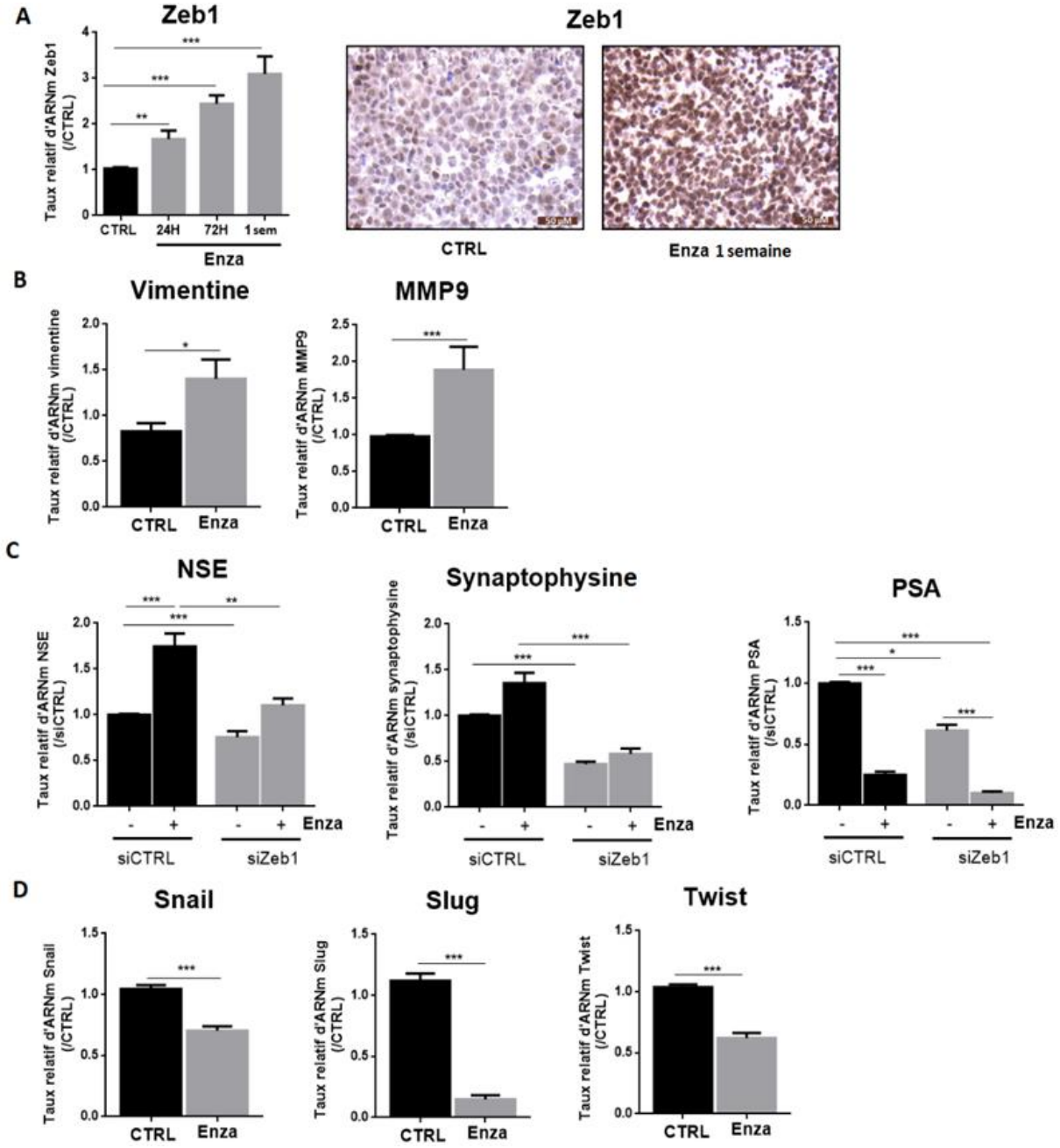


FIGURE 48 : LA DIFFERENCIATION NE INDUITE PAR L'ENZA DEPEND DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION CLE DE LA TEM, ZEB1.

*Les graphiques représentent les résultats de qPCR et les images représentent les résultats d'immunohistochimie. Tous les traitements avec l'Enza ont été réalisés pendant 1semaine sauf cas indiqués. A-B : L'Enza augmente l'expression de Zeb1 et de ses gènes cibles. C : Effets de l'Enza sur l'expression des marqueurs NE et du PSA. Les cellules LNCaP ont été traitées avec de l'Enza (10 uM) pendant 1 semaine, puis transfectées pendant 96h avec un siARN dirigé contre Zeb1. D: L'Enza diminue l'expression des facteurs de transcription de la TEM Snail, Slug et Twist. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle et sont représentés en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques sont indiquées: *p < 0,05; **p< 0,01; ***p < 0,001 (Mann–Whitney (B et D); Kruskal–Wallis; post-test: Dunn (A et C) n = 3 pour toutes les expériences hormis pour les transfections, n=6.*

L'Enza induit l'expression de Zeb1 de 1,7 fois à 24h, 2,4 fois à 72h et 3 fois à 1semaine (Fig. 48A). L'induction de Zeb1 est donc accentuée en fonction du temps de traitement. Le marquage immunohistochimique confirme cette induction de Zeb1, avec un marquage intense au niveau nucléaire (Fig. 48A).

Nous avons ensuite étudié l'expression de certains gènes cibles de Zeb1 tels que la vimentine et la MMP9. Nos résultats montrent que l'induction de Zeb1 par l'Enza a une conséquence sur l'expression de ses gènes cibles. En effet, l'expression de la vimentine et de la MMP9 est augmentée de respectivement 1,4 et 1,8 fois par rapport aux cellules contrôles (Fig.48B).

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de Zeb1 dans le maintien du phénotype NE acquis suite au traitement par l'Enza. Les cellules LNCaP neurodifférenciées, après une semaine de traitement par l'Enza, ont été transfectées avec un siARN dirigé contre Zeb1. Lorsque Zeb1 est inhibé, les marqueurs NE retrouvent leur niveau d'expression basal (Fig. 48C). L'inhibition de Zeb1 permet donc de réverser le phénotype NE induit par l'Enza. De plus, l'expression du PSA reste inhibée dans les LNCaP transfectées (Fig. 48C). Ainsi Zeb1 pourrait être une cible pour réverser la différenciation NE sans affecter l'inhibition de la voie de signalisation du RA.

Concernant les autres facteurs de transcription de la TEM, l'Enza diminue l'expression des ARNm des facteurs Snail (-30%), Slug (-85%) et Twist (-40%) (Fig. 48D).

Nous avons testé l'effet de l'Enza sur la migration des LNCaP (résultats supplémentaires). De manière intéressante, nos résultats montrent que l'Enza diminue la migration (-55%). L'implication de chaque facteur de transcription de la TEM dans la migration cellulaire n'est pas établie, néanmoins il semblerait que la diminution des facteurs Snail, Slug et Twist soit suffisante pour inhiber la migration malgré l'augmentation de l'expression de Zeb1.

4) L'Enza module l'expression des canaux SK3 et Orai : impact sur les entrées calciques

Le canal potassique SK3 est capable de former des complexes canalaires, en s'associant avec les canaux calciques Orai afin d'induire l'entrée de calcium qui participe à l'agressivité des cellules cancéreuses. Nous avons étudié l'effet de l'Enza sur l'expression des canaux SK3 et Orai et sur les entrées calciques.

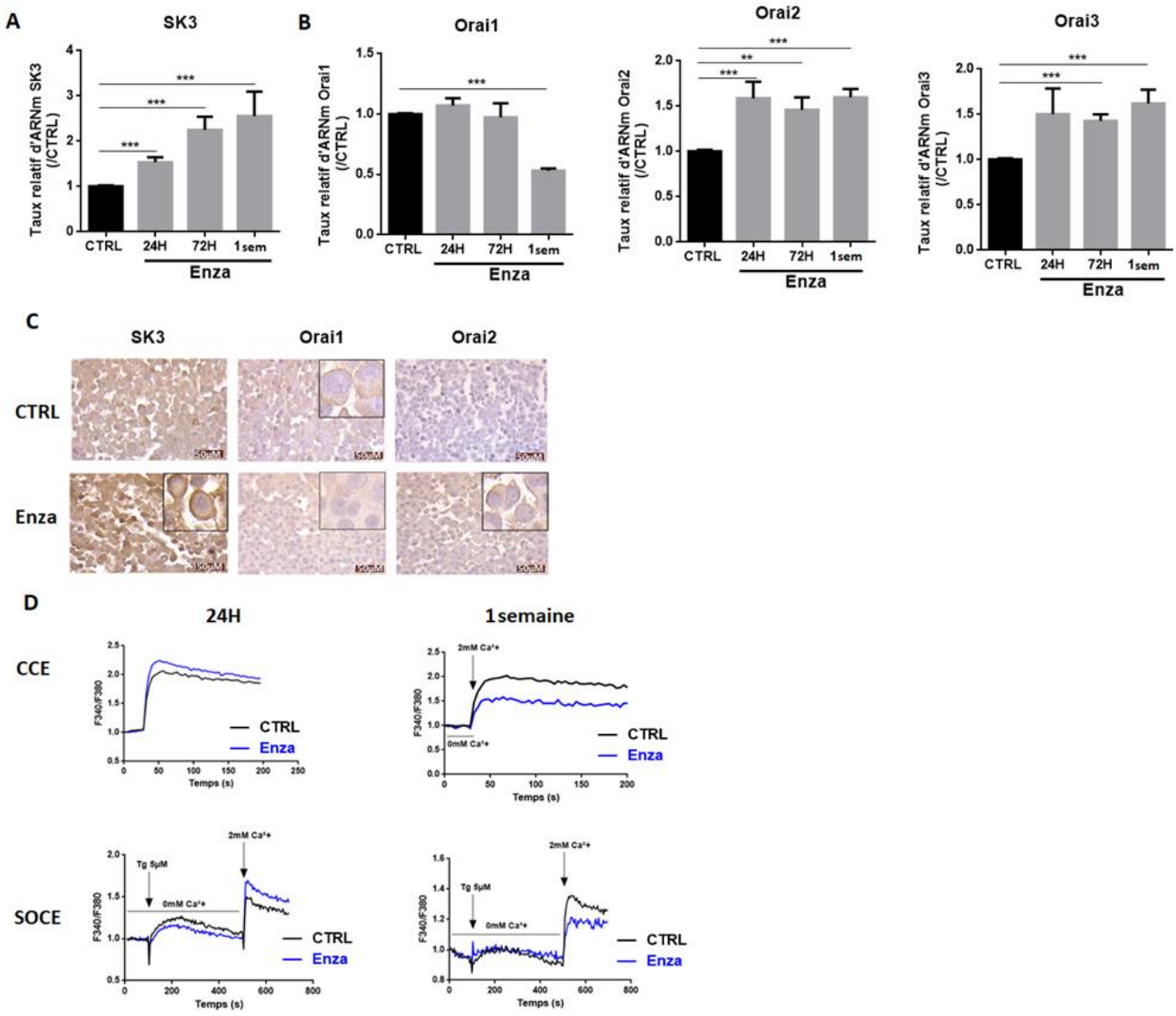


FIGURE 49 : L'INHIBITION DU RA DEREGULE LA SIGNALISATION CALCIQUE.
*A-B : L'Enza induit dans un premier temps l'expression de SK3, Orai2 et Orai3 et diminue l'expression de Orai1 après une semaine de traitement. Les cellules LNCaP ont été traitées pendant 24h, 72h et 1 semaine avec de l'Enza (10µM). Les résultats de qPCR ont été normalisés par rapport au contrôle et sont représentés en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques sont indiquées: ** p<0,01 ; *** p <0,001 (Kruskal-Wallis, post test : Dunn), n=3. C : Expression protéique de SK3, Orai1 et Orai2 obtenue par immunohistochimie dans des LNCaP traitées ou non pendant 1 semaine avec de l'Enza (10µM). D : Les variations de concentrations calciques intracellulaires ont été mesurées par spectrofluorimétrie avec le sonde calcique Fura-2AM. Les cellules LNCaP ont été traitées avec de l'Enza (10µM) pendant 24h et 1 semaine. Les résultats sont représentés par des illustrations du signal calcique.*

Comme observé pour Zeb1, l'expression de SK3 augmente en fonction du temps de traitement avec l'Enza, avec une augmentation de 1,5 fois à 24h, de 2,2 fois à 72h et de 2,5 fois à 1 semaine de traitement (Fig. 49A). Un marquage intense de la protéine SK3 a été observé au niveau membranaire après 1 semaine de traitement (Fig. 49C). De manière intéressante, une

augmentation de l'expression de Zeb1 et de SK3 a également été observée dans les cellules C4-2 et C4-2B traitées avec de l'Enza (résultats supplémentaires).

L'expression du canal calcique Orai1 est inhibée par l'Enza, avec une diminution de 50% du taux d'ARNm et une nette diminution de son expression membranaire après 1semaine de traitement. A l'inverse, l'expression des canaux Orai2 et Orai3 est augmentée de 1,5 fois dès 24h de traitement et perdure à 1 semaine (Fig.49B). De plus, le marquage membranaire du canal Orai2 est accentué dans les cellules traitées par l'Enza comparé aux cellules contrôles non traitées (Fig. 49C).

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux conséquences du traitement par l'Enza sur les entrées calciques. Nous avons étudié deux entrées calciques majoritaires dans les cellules non excitables, régulées par les canaux SK3 et Orai : l'entrée SOCE et l'entrée constitutive (CCE). Nos résultats montrent qu'après 24h de traitement avec l'Enza, l'entrée SOCE est augmentée de 20% ($p<0,01$) alors que l'entrée CCE est inchangée. Après une semaine de traitement, les entrées SOCE et CCE sont inhibées de -30% ($p<0,001$) et -32% ($p<0,001$) respectivement (Fig. 49D). L'ensemble de ces résultats suggèrent que i) l'induction de l'entrée SOCE peut être un évènement initial dans la voie de signalisation de la différenciation NE induite par l'Enza, et ii) la diminution des entrées calciques due à la perte d'expression d'Orai1, pourrait survenir dans des cellules avec un phénotype NE avancé.

5) La différenciation NE induite par l'Enza dépend de la voie Zeb1/SK3

Dans l'étude réalisée par *Figiel et al.* en 2019, nous avons précédemment mis en évidence l'existence d'une rétro-boucle positive entre les acteurs Zeb1 et SK3 qui participe à l'agressivité des cellules du CaP. Pour déterminer l'implication potentielle de cette voie Zeb1/SK3 dans la différenciation NE induite par l'Enza, les cellules LNCaP ont été traitées avec de l'Enza en présence d'un inhibiteur spécifique du canal SK3, l'Ohmline.

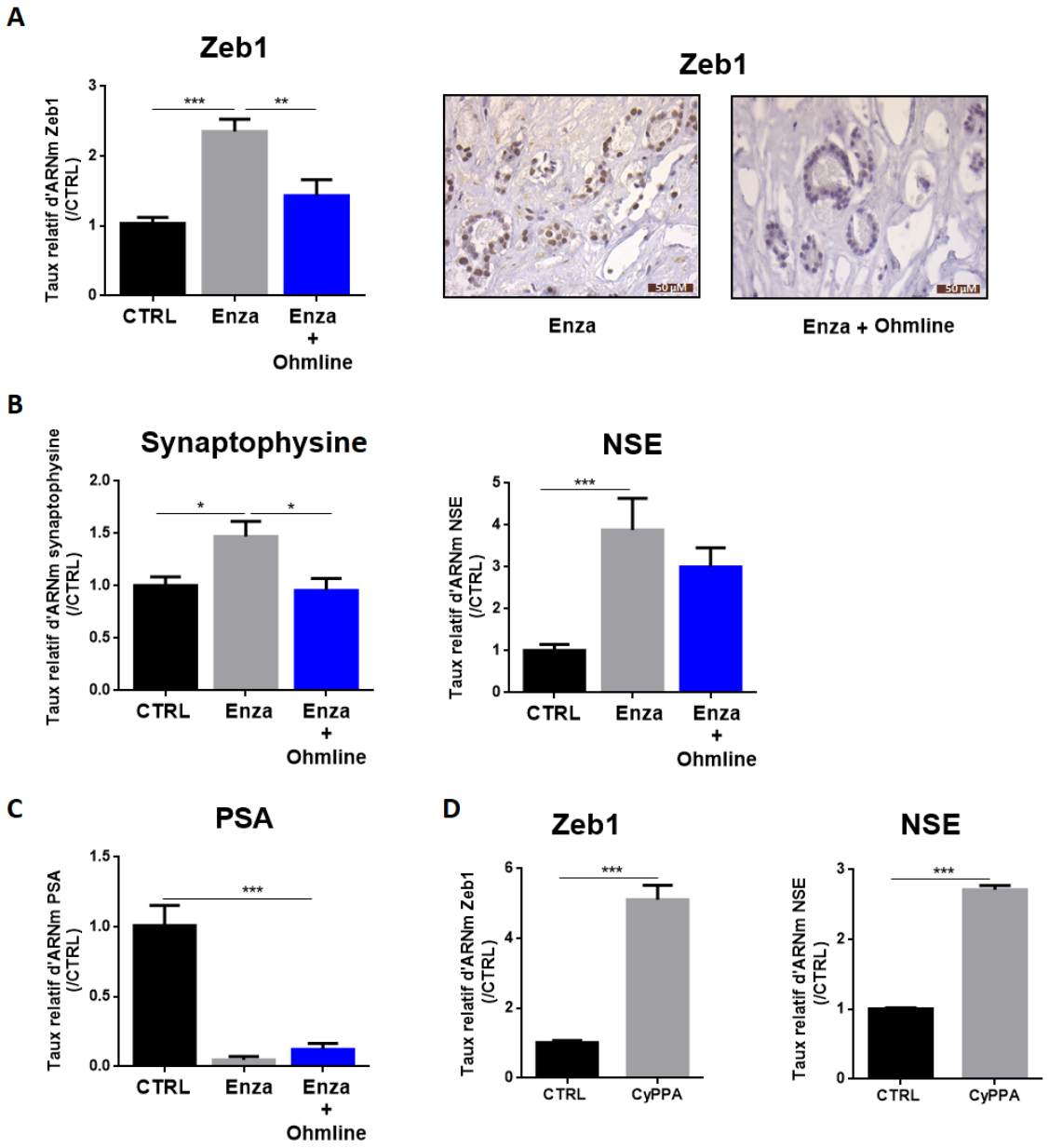


FIGURE 50 : LA DIFFERENCIATION NE INDUITE PAR L'ENZA DEPEND DU CANAL SK3
*Les graphiques représentent les résultats de qPCR et les images représentent les résultats d'immunohistochimie. A-C : Les cellules LNCaP ont été traitées pendant 1 semaine avec de l'Enza (10µM) seul ou co-traitées avec de l'Enza (10µM) et de l'Ohmline (1µM). Le marquage immunohistochimique de Zeb1 (A) a été réalisé à partir de tissus prostatiques tumoraux humains traités pendant 5 jours avec de l'Enza (10µM) seul ou co-traités avec de l'Enza (10µM) et de l'Ohmline (1µM). D : Les cellules LNCaP ont été traitées ou non avec le CyPPA (10µM) pendant 1 semaine. Les résultats de qPCR ont été normalisés par rapport au contrôle et sont représentés en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques sont indiquées : *p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p <0,001 (A,B,C: Kruskal–Wallis; post-test: Dunn) (D: Mann–Whitney), n = 3.*

Nos résultats montrent que l'inhibition de SK3 par l'Ohmline est capable de bloquer l'induction de Zeb1 (Fig. 50A) et de la Syp et tend à diminuer l'induction de la NSE par l'Enza (-20%) (Fig. 50B). L'Ohmline, utilisée en co-traitement avec l'Enza pendant 1 semaine, empêche donc la différenciation NE induite par l'Enza. De plus, même s'il est utilisé en co-

traitement avec l'Ohmline, l'Enza reste efficace en tant qu'inhibiteur du RA, en effet, l'expression du PSA est toujours inhibée (Fig. 50C).

Nous nous sommes ensuite interrogés si l'Ohmline était capable de réverser la différenciation NE induite par l'Enza. Nos résultats montrent que l'Ohmline n'est pas capable de réverser le processus lorsque les cellules sont bien neurodifférenciées après 1 semaine de traitement avec l'Enza (résultats supplémentaires). De plus, en utilisant un activateur pharmacologique des canaux SK (CyPPA), nous avons montré que l'expression de Zeb1 et du marqueur NSE est augmentée de 5 et 2,5 fois respectivement (Fig. 50D). Pour déterminer si *KCNN3* (gène codant pour SK3) est un gène cible de Zeb1, nous avons étudié l'effet de la surexpression de Zeb1 sur l'activité du promoteur du gène *KCNN3* en utilisant une construction promoteur *KCNN3* - gène rapporteur de la luciférase dans des cellules LNCaP transfectées avec le plasmide pCIneo-Zeb1, qui permet la transcription constitutive de Zeb1. Nos résultats montrent que la surexpression de Zeb1 augmente l'activité du promoteur du gène *KCNN3* de 2,5 fois (résultats supplémentaires). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la voie Zeb1/SK3 est impliquée dans les étapes initiales du processus de différenciation NE.

Pour confirmer ces résultats en clinique, nous avons utilisé un modèle de culture organotypique précédemment mis au point au laboratoire. Les échantillons de tissus cancéreux prostatiques (n=4 patients) ont été traités avec de l'Enza en présence ou non d'Ohmline pendant 5 jours. En effet, nous avons précédemment montré que les coupes tissulaires prostatiques peuvent être maintenues viables jusqu'à 5 jours sans nécrose et en préservant leurs propriétés physiologiques (351). Les résultats obtenus sont hétérogènes et l'induction de Zeb1 par l'Enza est observée dans 2 cas sur 4. Pour ces deux cas, le marquage de Zeb1 est très intense en condition Enza seul et il est considérablement diminué dans la condition Enza + Ohmline (Fig. 50A).

Résultats supplémentaires :

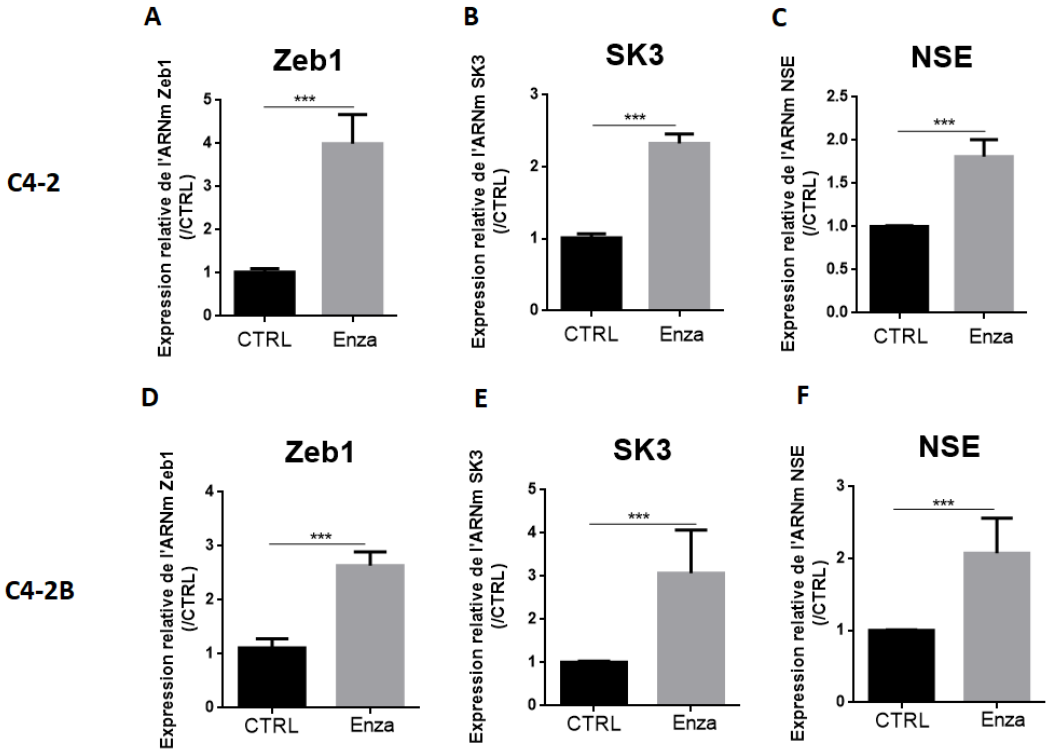


FIGURE 51 : EFFET DE L'ENZA SUR L'EXPRESSION DE ZEB1, SK3 ET NSE DANS LES C4-2 ET C4-2B
*Les cellules C4-2 et C4-2B ont été traitées pendant une semaine à l'Enza (10µM). Les résultats ont été normalisés par rapport à la condition CTRL et exprimés en moyenne +/- SEM. L'expression de l'ARNm des gènes codant pour Zeb1, SK3 et NSE a été analysée par qPCR. Les différences statistiques sont indiquées : *** p<0,001 (Mann-Whitney) n=3.*

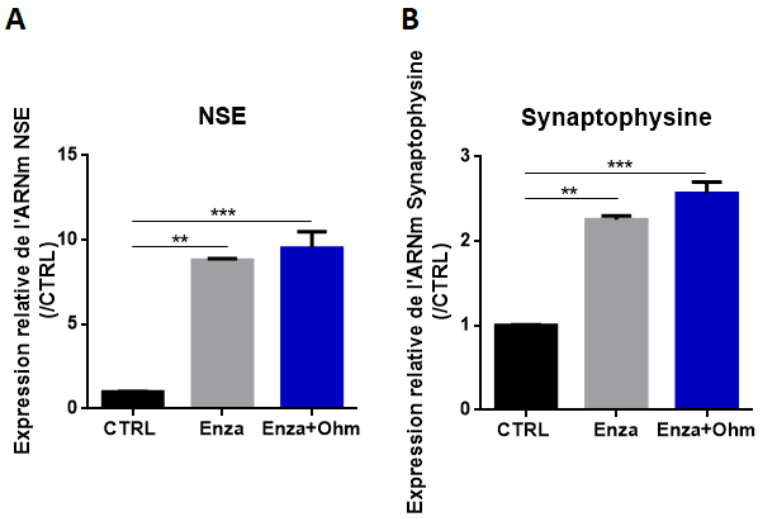


FIGURE 52 : L'OMHLINE N'EST PAS CAPABLE D'INHIBER L'EXPRESSION DES MARQUEURS NE LORSQUE LES CELLULES SONT A UN STADE AVANCE DE LA NEURODIFFERENCIATION.
*Les cellules LNCaP ont été traitées pendant 1 semaine avec l'Enza (10µM) puis co-traitées pendant 96h avec de l'Enza (10µM) + Ohmline (1µM). Les résultats ont été normalisés par rapport à la condition CTRL et exprimés en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques sont indiquées :**p<0,01 ; *** p<0,001 (Kruskal-Wallis, Post test Dunn) n=3.*

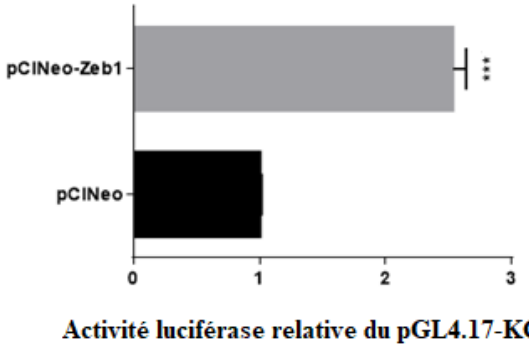


FIGURE 53 : LA SUREXPRESSION DE ZEB1 AUGMENTE L'ACTIVITE DU PROMOTEUR DU GENE KCNN3
*Les cellules LNCaP ont été transfectées avec les plasmides pGL4.17-KCNN3, pRL-TK et pCIneo (condition contrôle) ou pCIneoZeb1. L'activité luciférase a été quantifiée 48h après la transfection. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle et exprimés en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques sont indiquées : *** p < 0,001 (Mann-Whitney), n=4.*

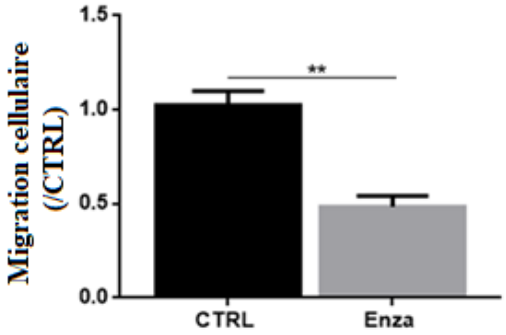


FIGURE 54 : EFFET DE L'ENZA SUR LA MIGRATION DES LNCAP.
*Les cellules LNCaP ont été traitées avec de l'Enza (10µM) pendant 1semaine puis utilisées pour la migration en chambre de Boyden pendant 24h. Les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle et exprimés en moyenne +/- SEM. Les différences statistiques sont indiquées : ** p < 0,01 (Mann-Whitney), n=3.*

Nous avons précédemment identifié le CaSR comme un marqueur des cellules NE dans le CaP et il pourrait jouer un rôle dans les évènements précoces de la différenciation NE. Nous avons donc étudié l'expression du CaSR dans les cellules LNCaP traitées avec de l'Enza pendant 1 semaine. Nous avons observé que le CaSR est faiblement exprimé de manière basale dans les LNCaP et nos résultats montrent que l'Enza n'augmente pas l'expression de l'ARNm du CaSR.

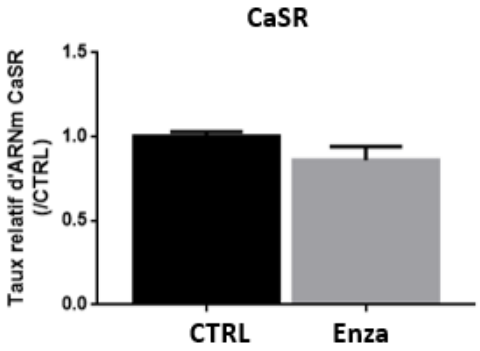


FIGURE 55 : EFFET DE L'ENZA SUR L'EXPRESSION DU CASR DANS LES LNCAP.
Les cellules LNCaP ont été traitées pendant une semaine avec de l'Enza (10µM). Les résultats ont été normalisés par rapport à la condition CTRL et exprimés en moyenne +/- SEM. L'expression de l'ARNm du gène codant pour le CaSR a été analysée par qPCR (Mann-Whitney) n=3.

Discussion

Durant ce travail de thèse, nous avons voulu approfondir le rôle de la signalisation calcique et de la TEM dans l'agressivité du CaP.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à une caractéristique majeure des tumeurs solides, l'hypoxie. En effet, la capacité d'adaptation des cellules cancéreuses en condition hypoxique leur permet de survivre et renforcer leur agressivité. **Nos résultats montrent que l'hypoxie favorise l'expression du facteur de transcription clé de la TEM Zeb1 par un mécanisme calcium-dépendant qui implique le canal potassique sensible au calcium SK3**.

Dans les tumeurs hypoxiques, le facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1α) favorise la survie, la prolifération et l'invasion des cellules tumorales en régulant plusieurs gènes cibles (352). HIF-1α est connu pour être un médiateur clé du processus de TEM (353) et de manière intéressante, un axe de signalisation HIF-1α / Zeb1 initié par l'hypoxie a été décrit. HIF-1α peut réguler directement Zeb1 en se fixant sur son promoteur au niveau de d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) (249).

Nous avons mis en évidence pour la première fois que l'expression du canal SK3 est favorisée par l'hypoxie. Certains éléments du microenvironnement tumoral tels que le TGFβ et l'hypoxie, sont capables de réguler l'expression du canal SK3 qui participe à l'agressivité du CaP (40,72). Dans différents types de cancers, des interactions entre l'hypoxie et des modulateurs calciques tels que les canaux, pompes, récepteurs et senseurs ont été décrites. En effet, le facteur HIF-1 peut réguler l'expression de ces modulateurs et à l'inverse ces protéines sont impliquées dans la régulation de l'activité de HIF-1. Dans le CaP, le canal calcique sensible au froid TRPM8 favorise la stabilisation de la protéine HIF-1 en inhibant son ubiquitination et sa dégradation (354).

Nous avons montré que le canal SK3 induit l'expression de Zeb1 et la migration des cellules du CaP sous hypoxie. Le rôle central du canal SK3 dans la migration des cellules cancéreuses et dans la formation de métastases a déjà été mis en évidence au laboratoire dans les cancers du sein et de la prostate (40,72). **De plus, nous avons démontré qu'en présence d'inhibiteurs pharmacologiques des canaux Orai (Synta66, GSK) et du canal SK3 (Ohmline), l'induction de Zeb1 par l'hypoxie est inhibée. L'Ohmline diminue également l'entrée calcique SOCE basale dans les cellules PC3.** Ces résultats démontrent que l'expression de Zeb1 induite par l'hypoxie se produit par le biais d'une entrée calcique. Le canal SK3 est capable de s'associer à des canaux calciques au sein de nano-domaines enrichis en

cholestérol afin de former des onco-complexes canalaires responsables d'une entrée de calcium exacerbée dans les cellules cancéreuses (40,264). Plusieurs études ont démontré que le processus de TEM est associé à un remodelage de l'influx calcique et/ou de l'expression des canaux calciques. Il est possible que l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire puisse activer des calmodulines kinases qui moduleraient, directement ou indirectement en agissant sur la voie Akt, l'expression de Zeb1. Dans le modèle du cancer gastrique, il a été montré que l'augmentation de la [Ca^{2+}] intracellulaire facilite la translocation nucléaire du facteur NFATc1 (Nuclear Factor activated-lymphocytes T) qui active la transcription de Zeb1 (355). Dans les cellules cancéreuses mammaires, les stimuli inducteurs de la TEM favorisent l'augmentation transitoire de la [Ca^{2+}] cytosolique (266). Nous avons montré au laboratoire que le TGFβ favorise l'expression de Zeb1 dépendante d'une entrée calcique SOCE dans les cellules PC3 et DU145 (72). De plus, l'induction du facteur Snail par le TGFβ requiert l'expression du canal calcique Orai3 et de la protéine STIM1 (356). Certains canaux calciques dont le TRPM7 (357) et le TRPM8 (268) sont surexprimés lors du processus de TEM.

Lors d'une précédente étude menée au laboratoire, nous avons montré que l'AL (n-6) et l'EPA (n-3), deux AGPI inversement associés à l'agressivité du CaP (37), sont capables d'inhiber la voie de signalisation Zeb1/SK3 initiée par le TGFβ (72). Nous avons donc étudié l'effet de l'AL et l'EPA sur notre voie Zeb1/SK3 induite par l'hypoxie. **Nos résultats montrent que ces deux AGPI sont capables d'inhiber l'expression de Zeb1 et SK3 induite sous hypoxie.**

De par leur localisation membranaire au sein de domaines appelées radeaux lipidiques, l'activité des onco-complexes canalaires est dépendante de l'environnement lipidique. Les lipides ont la capacité de moduler la fluidité membranaire et l'environnement lipidique d'un grand nombre de protéines intégrées dans les membranes, y compris les canaux ioniques.

Des études épidémiologiques montrent que certains AGPI peuvent agir en tant que facteur de risque ou facteur protecteur dans le cancer. Parmi les AGPI n-6, l'acide arachidonique (ARA) est décrit comme un « promoteur » du cancer. En effet, une alimentation enrichie en ARA serait associée à des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et certains cancers. A l'inverse, une alimentation riche en AGPI n-3, tels que l'EPA et le DHA, aurait un effet protecteur vis-à-vis de ces pathologies (358). Certains AGPI ont été corrélés à l'agressivité tumorale. Les cancers mammaires multifocaux sont associés à un faible taux d'EPA et/ou de DHA (359). Dans le CaP, les AGPI n-3 tels que l'EPA et le DHA sont qualifiés de

« protecteurs » par leurs effets pro-apoptotiques, anti-migratoires et anti-prolifératifs (360,361). Le DHA peut améliorer l'efficacité de certains traitements en sensibilisant les cellules cancéreuses prostatiques au docétaxel notamment (190). Une étude *in vivo* a montré que la transition d'un régime alimentaire enrichis en AGPI n-6 vers un régime enrichi en AGPI n-3 réduit la croissance tumorale dans le modèle du CaP (362).

La fonction des nano-domaines membranaires enrichis en cholestérol, dans lesquels SK3 est localisé, dépend de l'environnement lipidique. Ainsi, la modification de cet environnement pourrait permettre de réguler l'activité de SK3 impliqué dans l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques. En s'incorporant dans la membrane plasmique au niveau de nanodomaines enrichis en cholestérol, l'Ohmline (un éther lipide de synthèse inhibiteur spécifique du canal SK3) délocalise le complexe canalaire SK3/Orai1 hors des nanodomaines conduisant à la perte de leur activité (40). Nous émettons l'hypothèse que nos deux AG d'intérêt (AL et EPA) pourraient avoir le même mode d'action que l'Ohmline. Ils seraient capables de s'insérer dans la membrane plasmique au sein des nanodomaines. Leur incorporation induirait la délocalisation des onco-complexes canalaires *et in fine* l'inhibition de leur activité. Ce mode d'incorporation a été démontré dans le cancer du côlon. En effet, une supplémentation en AGPI n-3 modifie la composition des radeaux lipidiques dans des cellules colorectales résistantes conduisant à la délocalisation des pompes d'efflux P-gp et MRP hors des nanodomaines et à la diminution de leur activité d'efflux (363).

Nos AG d'intérêt pourraient être utilisés en clinique en tant qu'adjuvants aux traitements et suite à la rémission du patient afin de maintenir un environnement lipidique favorable. Contrairement au génome, le lipidome peut être directement modifié par une alternative diététique. Des modifications diététiques appropriées pourraient alors permettre de retarder la survenue ou la progression d'un cancer (364). Une étude clinique a d'ailleurs montré que l'administration d'AGPI chez l'homme ne présente pas d'effet toxique (358).

La supplémentation nutritionnelle permet notamment d'augmenter la concentration de l'AG d'intérêt dans le tissu adipeux. De par leur activité métabolique et sécrétoire, les adipocytes du tissu adipeux peuvent en libérant des adipokines et des AG libres influer sur la progression tumorale. En effet, il a été montré que la chimiokine CCL7 libérée par le tissu adipeux, en particulier chez les personnes obèses, stimule la migration des cellules cancéreuses prostatiques (365). De plus, près du site tumoral, un phénomène de lipolyse peut se produire permettant le relargage d'AG libres qui, directement ou par le biais de la circulation sanguine, vont agir sur les cellules tumorales (365).

Cette étude a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation médiée par un élément majeur du microenvironnement du CaP, l'hypoxie. Cette voie induit l'expression des acteurs Zeb1 et SK3 par le biais d'une entrée de calcium et participe à l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques. L'AL et l'EPA, deux AGPI « protecteurs », sont capables de réguler cette voie.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rôle du CaSR dans la différenciation NE du CaP, associée à des tumeurs agressives avec un très mauvais pronostic.

Notre étude clinique menée sur 467 patients répartis en quatre groupes (tissu prostatique sain, CLC, MCRPC et NEPC) a mis en évidence une augmentation de l'**expression du CaSR selon les stades évolutifs du CaP (CLC < MCRPC < NEPC).**

Nos expériences de colocalisation montrent que **dans le tissu prostatique, l'expression du CaSR est associée à la CgA**, un marqueur spécifique des cellules NE. De plus, **le CaSR est exprimé dans tous les cas de NEPC et la majorité des cellules exprimant le CaSR présentent un phénotype NE.** Néanmoins, **dans 6 cas sur 52 du groupe MCRPC**, **le CaSR est exprimé sans expression concomitante de la CgA ni d'autres marqueurs NE.** Ces résultats suggèrent que le CaSR est un marqueur précoce des cellules NE et pourrait être impliqué dans les mécanismes à l'origine de la différenciation NE des cellules du CaP.

L'exposition à l'hormonothérapie peut jouer un rôle dans l'expression des marqueurs NE. Il a été montré que plus la durée du traitement anti-androgénique est longue, plus l'expression de la CgA est importante (366). Des taux plasmatiques élevés de CgA peuvent être observés chez les patients présentant un CRPC (367).

Dans les MCRPC, contenant peu de cellules NE (médiane à 2%), **l'expression du CaSR est inversement associée à la prolifération cellulaire (Ki67).** D'autres études ont montré que les cellules NE ne prolifèrent pas et n'expriment pas le Ki67 (368). Malgré leur présence minoritaire, les cellules NE, bloquées en phase G0 du cycle cellulaire, sont capables d'exercer un effet paracrine sur les cellules adénocarcinomateuses avoisinantes et ainsi stopper leur prolifération (369).

Nous avons également montré que **le CaSR est associé à une diminution du taux de survie dans les MCRPC.** Le CaSR a été identifié comme un marqueur de mauvais pronostic du CaP, son expression est associée à un risque accru de mortalité du CaP (321).

Nous avons utilisé plusieurs lignées cancéreuses prostatiques : les NCI-H660, une lignée de cellules cancéreuses prostatiques NE dérivant de métastases des ganglions

lymphatiques, les 22RV1 issues d'une xénogreffe de cellules CWR22 androgéno- dépendantes et les PC3 issues de métastases osseuses. Nos résultats montrent que **les 22RV1 présentent un phénotype NE** comparable à celui des NCI-H660, avec une forte expression des marqueurs NE alors que **les PC3 ont un phénotype neuronal** avec un marquage positif uniquement pour le marqueur neuronal NSE. **Le CaSR est exprimé dans les trois lignées à la fois au niveau membranaire mais également en intracellulaire.** Le CaSR présent au niveau réticulaire peut être libéré vers le golgi, constituant ainsi un réservoir de CaSR glycosylé qui, en présence d'une forte concentration d'agoniste, sera réquisitionné et rapidement inséré dans la membrane plasmique (370).

La modulation de l'expression du CaSR par un inhibiteur (NPS21-43) et un activateur (R-568), nous a permis de mettre en évidence son implication dans le processus de différenciation NE. En effet, **l'inhibition du CaSR dans les cellules de phénotype NE (NCI-H660 et 22RV1) diminue significativement l'expression de l'ARNm des marqueurs NE.** A l'inverse, **l'activation du CaSR dans les PC3, induit l'expression de l'ARNm des marqueurs NE.** De plus, **l'inhibition du CaSR par siARN diminue l'expression de l'ARNm des marqueurs neuronaux dans les PC3 et l'expression de l'ARNm des marqueurs neuronaux et NE dans les 22RV1**. Le ciblage du CaSR pourrait donc être une stratégie pour prévenir la différenciation NE des cellules du CaP.

Plusieurs études ont démontré une dérégulation de l'homéostasie calcique dans les cellules cancéreuses prostatiques NE. Le canal calcique CaV3.2 est surexprimé dans les cellules NE du CaP (343). La déprivation androgénique, qui induit la différenciation NE, entraîne une diminution de l'expression du canal calcique Orai1 dans les LNCaP (296). La différenciation NE des LNCaP, inhibe l'expression des pompes SERCA réticulaires, responsable de la recapture du Ca^{2+} dans le RE, ce qui par conséquent inhibe l'entrée calcique SOCE (166). De plus, une surpolymérisation des filaments d'actine a été mise en évidence dans les LNCaP NE, modifiant l'internalisation des canaux calciques à la membrane (344).

Le CaSR joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie calcique en réponse aux ions calciques extracellulaires. Sa surexpression dans les cellules du CaP favorise l'entrée SOCE et augmente ainsi la [Ca^{2+}]intracellulaire (324). Cette augmentation de la [Ca^{2+}] intracellulaire, médiée par le CaSR, pourrait être indispensable au relargage de vésicule contenant des neuropeptides et ainsi amorcer la différenciation NE. Les cellules NE ont un cytoplasme enrichi en granules de sécrétion contenant des neuropeptides et facteurs de croissance. En libérant par exocytose le contenu de leurs granules, les cellules NE exercent un

effet paracrine sur les cellules avoisinantes. En effet, une étude *in vivo* chez la souris castrée a montré que la greffe de cellules NE sur un flanc favorise la prolifération et la croissance des cellules LNCaP inoculées sur l'autre flanc (371). Ainsi, la capacité sécrétoire des cellules NE androgéno-insensibles leur permet de modifier la sensibilité aux androgènes des cellules LNCaP androgéno-sensibles pour maintenir leur prolifération dans un environnement dépourvu en androgènes. Le calcium participe à diverses étapes du mécanisme d'exocytose: la mobilisation des granules, leur arrimage au site d'exocytose et la fusion des membranes vésiculaires et plasmique (372). De plus, il a été montré que la différenciation NE est associée à la sécrétion de peptides NE calcium dépendante qui repose sur l'activité du canal calcique CaV3.2 (339). Par ailleurs, le calcium intracellulaire pourrait réguler des facteurs de transcription responsables de la transcription des gènes NE. Il a notamment été démontré que le facteur de transcription de la TEM Snail, dont la transcription est régulée par le calcium, est impliqué dans l'acquisition du phénotype NE (274,373).

Le CaSR est donc un marqueur et inducteur de la différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques, son expression augmente dans les stades les plus agressifs de la maladie et il est associé à une diminution du taux de survie. Le CaSR représente donc une cible de choix pour les CaP NE.

Nous avons voulu ensuite approfondir davantage le rôle de la signalisation calcique et de la TEM dans la différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques. Face aux thérapies ciblant le RA, les cellules tumorales acquièrent une certaine plasticité et développent des réponses adaptatives, telles que la TEM et la différenciation NE, qui participent à l'échec des traitements (374). En effet, nous avons observé que **l'Enza, inhibiteur de RA couramment utilisé en clinique chez les patients atteints d'un CaP métastatique ou un CRPC, induit un changement phénotypique des cellules LNCaP avec l'apparition de prolongements cellulaires associé à l'expression des marqueurs NE, Syp et NSE**. Plusieurs études ont mis en évidence le lien entre la signalisation du RA et la différenciation NE. Il a été montré que la xénogreffe de cellules LNCaP androgéno-dépendantes chez des souris castrées augmente significativement le nombre de cellules NE dans la tumeur (375). De plus, l'inhibition du RA par siARN dans les LNCaP favorise l'apparition d'un phénotype neuronal avec induction de la NSE (376) .

Nous avons étudié l'effet de l'Enza sur l'expression du CaSR, que nous avons identifié comme un inducteur de la différenciation NE (résultats supplémentaires). Nos résultats montrent que l'expression de l'ARNm de CaSR n'est pas augmentée par l'Enza, de plus son expression basale

dans les LNCaP est très faible. **Dans les LNCaP, la différenciation NE induite par l'Enza semble emprunter une voie indépendante du CaSR.** Ce résultat montre la limite de notre modèle cellulaire. La différenciation NE induite par l'Enza dans les LNCaP pourrait être incomplète. En effet, le marqueur NE chromogranine n'est pas induit par l'Enza. Certains éléments du microenvironnement tumoral pourraient être indispensables pour induire une différenciation NE complète. Une étude a montré que l'Enza favorise le recrutement de mastocytes infiltrants ce qui participe à l'inhibition du RA et l'induction de la différenciation NE. En effet la co-culture de cellules LNCaP avec des mastocytes inhibe l'expression du RA et favorise l'expression de la NSE (377). L'hypoxie étant une caractéristique fréquente des tumeurs du CaP qui participe à leur agressivité, il serait intéressant de traiter les LNCaP avec de l'Enza en condition hypoxique pour se rapprocher des conditions physiopathologiques.

Nos résultats montrent que le facteur de transcription Zeb1, surexprimé dans les CRPC (adéno et NE), peut être induit *in vitro* par l'Enza et participe au maintien du phénotype NE. En effet, Zeb1 est un facteur de mauvais pronostic qui participe à la progression du CaP (202). **Son inhibition par siARN dans les LNCaP, réprime l'induction des marqueurs NE par l'Enza**. Il a été montré que la TEM participe à la progression du CaP vers l'hormono-résistance et favorise la différenciation NE des cellules du CaP (271,374). La surexpression de Snail dans les LNCaP induit l'expression des marqueurs NE. De plus, l'inhibition de REST, un répresseur transcriptionnel des gènes neuronaux, favorise la différenciation NE des LNCaP et induit Twist, facteur de transcription inducteur de la TEM (276). Contrairement à Zeb1, les autres facteurs de transcription de la TEM sont réprimés par l'Enza. Une telle réorganisation entre les facteurs de transcription de la TEM au profit de Zeb1 a déjà été décrit durant le développement du mélanome malin et associée à un mauvais pronostic (378).

Nous avons voulu déterminer si une dérégulation de l'expression d'acteurs participant à l'homéostasie calcique pouvait être impliquée dans ces phénomènes. En comparant les CLC et CRPC, nous avons observé **une diminution de l'expression du canal Orai1 associée à une augmentation de l'expression d'Orai2.** Une telle diminution du canal calcique Orai1 a déjà été rapportée dans les CRPC par rapport aux CLC (295), mais pour la première fois, nous l'avons démontré dans les CRPC-NE. Ce switch entre les canaux Orai1 et Orai2 a été également observé *in vitro* dans les cellules LNCaP traitées par l'Enza et associé à une diminution des entrées calciques SOCE et constitutive. La diminution de l'expression d'Orai1 est associée à

une diminution des entrées calciques (SOCE et constitutive) malgré l'induction de SK3. Ces résultats confirment le rôle crucial de l'interaction entre Orai1 et SK3 dans la régulation des flux calciques. Il a été montré que les canaux Orai sont capables de se multimériser pour adapter la réponse calcique en fonction de la concentration d'agoniste (379). La diminution de l'expression d'un seul canal Orai composant les onco-complexes est suffisante pour inhiber la boucle de régulation positive entre les canaux Orai1 et SK3 (40,264). De plus, l'augmentation du SOCE observée après 24h de traitement avec l'Enza peut être expliqué par l'augmentation de l'expression de SK3, Orai2 et Orai3. Une étude récente a montré que les canaux Orai2 et Orai3 se multimérisent avec Orai1 pour permettre un influx calcique en réponse à une faible concentration d'agoniste (379). Nos résultats concordent avec d'autres études qui ont rapporté une diminution de l'entrée SOCE dans les LNCaP neuro-différenciées (296). La dérégulation de l'influx calcique observée dans les cellules NE contribue à leur résistance à l'apoptose. En effet, la diminution de l'expression d'Orai1 associée à une inhibition du SOCE, protège les cellules cancéreuses prostatiques des signaux pro-apoptotiques (TNF-α, Tg, cisplatine) (296).

Cette étude nous a permis de mettre en évidence **une expression accrue du canal SK3 dans les CRPC notamment les CRPC-NE.** Il a été montré qu'en s'associant à des canaux calciques, le canal SK3 forme des complexes canalaires pour médier l'entrée de calcium dans les cellules cancéreuses et favoriser le développement métastatique (14). Nous avons précédemment montré que le canal SK3 est un gène cible du facteur de transcription Zeb1 (72) et ce résultat a été confirmé dans les LNCaP. **Nous avons mis en évidence une boucle de régulation positive Zeb1/SK3 impliquée dans la différenciation NE des cellules du CaP.** En effet, l'activation du canal SK3 par le CyPPA permet d'induire l'expression de Zeb1 et du marqueur NE NSE. A l'inverse, l'inhibition de SK3 par l'Ohmline prévient l'induction de Zeb1 et des marqueurs NE Syp et NSE. L'inhibition de SK3 n'est pas capable de réverser le processus lorsque les cellules sont bien différenciées après une semaine de traitement avec l'Enza. Ces résultats suggèrent que le canal SK3 joue un rôle dans l'inititation de la différenciation NE, il constitue donc une cible pour prévenir la différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques. L'Ohmline devrait être combinée aux thérapies anti-androgéniques dès le début du traitement. L'intérêt pré-clinique de l'Ohmline a déjà été démontré chez la souris avec des effets anti-métastatiques sans effet indésirable (40). En utilisant un modèle ex vivo d'explants prostatiques tumoraux préservant le microenvironnement tumoral et l'hétérogénéité des cellules cancéreuses (351), nous avons montré que l'Ohmline est capable de prévenir l'induction de

Zeb1 par l'Enza. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les CaP NE hautement agressifs.

Conclusions et perspectives

Ces travaux de thèse nous ont permis de montrer que le facteur de transcription Zeb1, impliqué dans la progression du CaP (202), est capable de réguler positivement l'expression du canal potassique sensible au calcium SK3. **Il existe une boucle de régulation positive Zeb1/SK3 qui participe à l'agressivité des cellules du CaP** (Figure 56). Des éléments du microenvironnement tumoral tels que le TGFβ (72) et l'hypoxie sont capables d'activer cette voie. Une fois adressé à la membrane, le canal SK3 s'associe à des canaux calciques pour former des onco-complexes canalaires capables d'amplifier le signal calcique impliqué dans la migration des cellules cancéreuses prostatiques.

Nous avons montré qu'il est possible de contrecarrer cette voie en utilisant l'AL et l'EPA, deux AG précédemment identifiés au laboratoire comme « protecteurs » dans la progression du CaP. **L'AL et l'EPA sont capables d'inhiber l'induction de Zeb1 et SK3 par l'hypoxie et le TGFβ, et ainsi réduire l'entrée de calcium dans les cellules** (Figure 56). Selon le mode d'action de l'Ohmline (40), en s'insérant dans la membrane plasmique, l'AL et l'EPA seraient capables de dissocier les complexes canalaires impliquant le canal SK3 et de les délocaliser hors des nanodomaines enrichis en cholestérol, altérant ainsi l'entrée calcique et la migration cellulaire dépendante de SK3.

Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'AL et l'EPA *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe de cellules cancéreuses prostatiques. Un régime alimentaire enrichi en AL et EPA pourrait être administré aux souris afin d'étudier l'effet sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique.

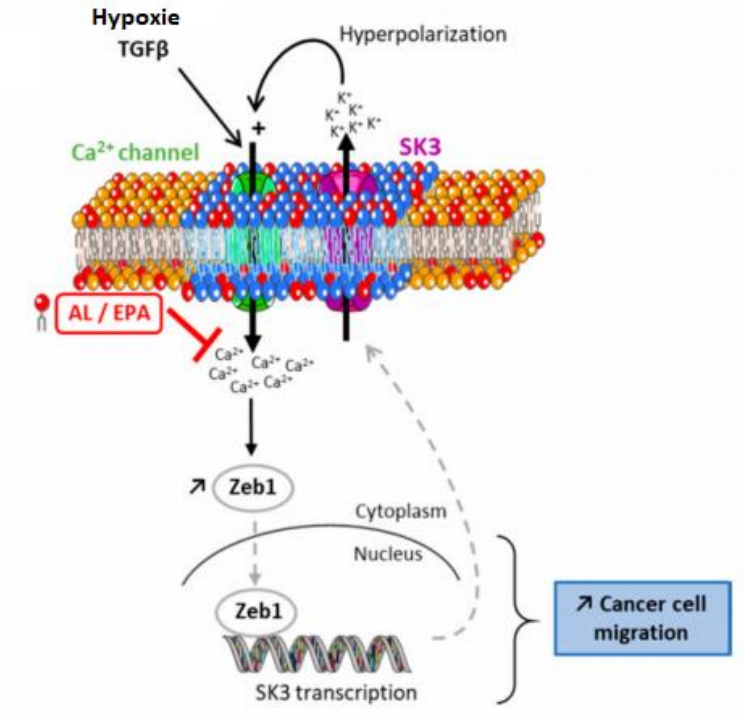


FIGURE 56 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE ZEB1/SK3 QUI PARTICIPE A L'AGRESSIVITE DES CELLULES CANCEREUSES PROSTATIQUES *(EXTRAIT ET MODIFIE A PARTIR DE FIGIEL ET AL. 2019).*
L'hypoxie et le TGFβ favorisent la boucle de régulation positive Zeb1/SK3 qui amplifie l'entrée calcique SOCE par hyperpolarisation de la membrane plasmique, induisant ainsi la migration des cellules cancéreuses prostatiques. En s'incorporant dans la membrane au niveau des nanodomaines enrichis an cholestérol, l'AL et l'EPA délocalisent les complexes canalaires impliquant SK3, conduisant à la perte de leur activité et in fine à la diminution de l'entrée calcique.

Nos résultats montrent que la signalisation calcique et la TEM jouent un rôle dans le processus de différenciation NE. En effet, nous avons démontré que le **CaSR est un marqueur et un activateur de la différenciation NE.** Son expression augmente selon les stades évolutifs du CaP et elle est associée à une diminution du taux de survie. Dans les CaP NE, la majorité des cellules exprimant le CaSR présente un phénotype NE. De plus, l'expression des marqueurs NE dépend du CaSR.

Le CaSR constitue donc une cible de choix pour les CaP NE. L'association d'inhibiteurs du CaSR tels que le NPS-2143 avec les thérapies anti-androgéniques pourrait être une stratégie judicieuse pour prévenir la différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques.

Nous avons également montré que Zeb1 et SK3 sont fortement exprimés *in vivo* dans la majorité des CRPC (adéno et NE) et *in vitro* dans des cellules du CaP neurodifférenciées après traitement par l'Enza. Nous avons démontré que le facteur de transcription Zeb1 est nécessaire pour l'induction des marqueurs NE par l'Enza. De plus, à des temps précoces, l'Enza favorise l'entrée calcique SOCE dans les cellules cancéreuses prostatiques.

Le canal SK3 joue un rôle majeur dans le processus de différenciation NE. En effet, l'activation de SK3 favorise l'expression des marqueurs NE et à l'inverse, son inhibition par l'Ohmline, permet de prévenir l'induction de Zeb1 et des marqueurs NE par l'Enza. De plus, le blocage de SK3 *ex vivo* sur des coupes d'explants prostatiques permet également de prévenir l'induction de Zeb1 par l'Enza. Ainsi, **l'initiation du processus de différenciation NE par l'Enza dépend d'une boucle de régulation positive Zeb1/ SK3 (Figure 57).**

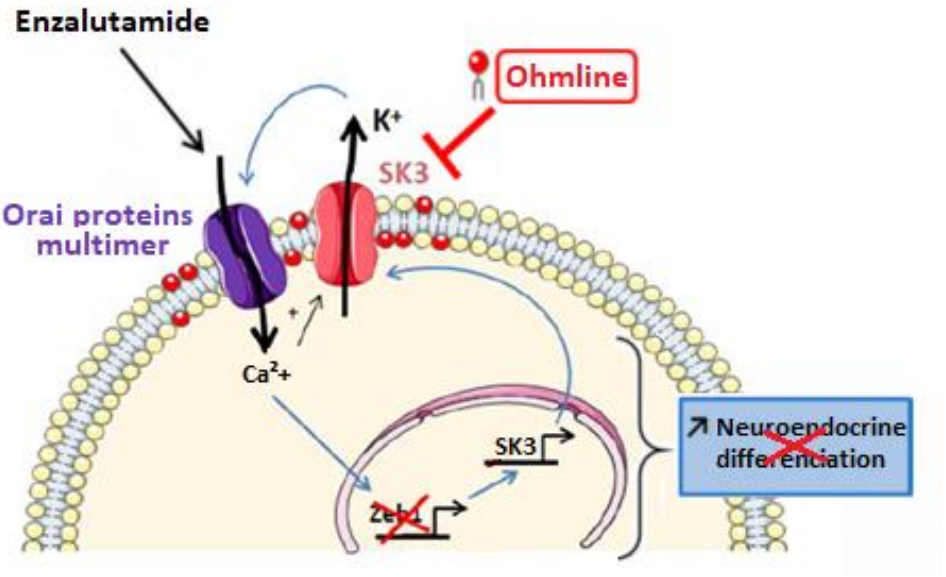


FIGURE 57 : SCHEMA HYPOTHETIQUE DE REGULATION DE LA DIFFERENCIATION NE PAR LA VOIE ZEB1/SK3.
L'Enza induit une entrée calcique favorisant l'expression de Zeb1 qui a pour gène cible le canal SK3. Une fois adressé à la membrane, SK3 s'associe à des canaux calciques pour médier l'entrée de calcium. Cette boucle de régulation positive Zeb1/SK3 favorise la différenciation NE des cellules cancéreuses prostatiques. Le ciblage du canal SK3 par l'Ohmline permet d'inhiber l'induction de Zeb1 et la neurodifférenciation induite par l'Enza.

Pour aller plus loin, nous pourrions étudier le signal calcique directement sur nos explants de tumeurs humaines traitée avec l'Enza par vidéomacroscopie. Cette technique nous permettra dans un premier temps de confirmer l'effet de l'Enza sur les entrées calciques en tenant compte de l'hétérogénéité du signal calcique sur l'ensemble de la coupe tissulaire. Il est possible de cartographier le signal calcique selon différentes zones de la coupe tissulaire pour ensuite le corréler à l'expression des acteurs calciques/potassiques et des marqueurs NE par marquage immunohistochimique.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier les conséquences biologiques de l'activation de la voie Zeb1/SK3 dans les cellules cancéreuses prostatiques NE, notamment leur sensibilité à l'apoptose. Il a été montré que la diminution de l'expression du canal Orai1 protège les cellules NE de divers signaux pro-apoptotiques (296).

Ces résultats montrent que le ciblage du canal SK3 pourrait avoir un intérêt clinique chez les patients atteints d'un CaP NE. L'Ohmline pourrait être utilisée en tant qu'adjuvant dès le début du traitement anti-androgénique pour prévenir la différenciation NE.

Il serait donc intéressant d'étudier *in vivo,* dans un modèle murin de xénogreffes de cellules LNCaP-luciférase, l'effet de l'Ohmline sur le développement de la tumeur primaire dans un premier temps, puis tester l'effet d'un co-traitement Enza/Ohmline pour déterminer si l'inhibition du canal SK3 permet d'optimiser l'efficacité de la déprivation androgénique.

Nous avons également initié des travaux pour mettre en parallèle ces mécanismes de résistance à l'hormonothérapie avec les mécanimes de chiomiorésistance dans le CaP. Nous avons traité des cellules PC3 pendant 1 an avec des doses croissantes de docétaxel, l'agent de chimiothérapie de référence dans le CaP. Suite à une exposition continue à l'agent de chimiothérapie, une sélection des clones résistants a lieu. Les PC3 traitées avec du docétaxel depuis 1 an sont 4 à 5 fois plus résistantes au docétaxel par rapport aux PC3 sensibles. Faits intéressants, nous avons observé une surexpression de Zeb1 et SK3 ainsi qu'une diminution de l'expression du canal Orai1 associée à une diminution des entrées calciques SOCE et CCE dans les PC3 résistantes au docétaxel comparées aux PC3 sensibles. Ces résultats montrent qu'il semble y avoir des mécanismes de résistances communs à l'hormonothérapie et chimiothérapie dans les cellules cancéreuses prostatiques.

Les possibilités thérapeutiques pour les cancers prostatiques agressifs et métastatiques restent limitées avec des phénomènes de résistance qui apparaissent rapidement. Ces travaux de thèse ont permis d'amorcer les recherches pour déterminer le rôle de la TEM et de la signalisation calcique dans l'agressivité et la différenciation NE du CaP. Nous avons identifié une boucle de régulation positive entre les acteurs Zeb1 et SK3 qui participe à l'agressivité des cellules tumorales et au processus de différenciation NE. Nos résultats suggèrent une régulation de cette voie par les lipides (AL, EPA, Ohmline). L'application thérapeutique des ces lipides pourrait permettre de mieux contrôler l'agressivité tumorale et la résistance aux traitements.

Annexes

The American Journal of Pathology, Vol. 189, No. 6, June 2019



The American Journal of
PATHOLOGY
ajp.amjpathol.org

METABOLIC, ENDOCRINE, AND GENITOURINARY PATHOBIOLOGY

Functional Organotypic Cultures of Prostate Tissues



A Relevant Preclinical Model that Preserves Hypoxia Sensitivity and Calcium Signaling

Sandy Figiel,* Côme Pasqualin,† Fanny Bery,* Veronique Maupoil,† Christophe Vandier,* Marie Potier-Cartereau,* Isabelle Domingo,* Roseline Guibon,*‡ Franck Bruyere,§ Karine Maheo,* and Gaelle Fromont*‡

From Inserm UMR U1069, Tours; the EA 7349 Universite de Tours, Tours†; the Department of Pathology,‡ and the Department of Urology,§ CHU-Universite de Tours, Tours, France*

Accepted for publication February 21, 2019.

Address correspondence to Gaelle Fromont, M.D., Ph.D., Service d'Anatomie Pathologique, Hopital Bretonneau, CHRU Tours, Blvd. Tonnelle, 37000 Tours, France. E-mail: gaelle.fromont-hankard@univ-tours.fr.

In prostate cancer research, there is a lack of valuable preclinical models. Tumor cell heterogeneity and sensitivity to microenvironment signals, such as hypoxia or extracellular calcium concentration, are difficult to reproduce. Here, we developed and characterized an *ex vivo* tissue culture model preserving these properties. Prostate tissue slices from 26 patients were maintained *ex vivo* under optimized culture conditions. The expression of markers associated with proliferation, androgen-receptor signaling, and hypoxia was assessed by immunostaining. A macroscope was used to achieve real-time calcium fluorescence optical imaging. Tissue morphology was maintained successfully without necrosis for 5 days. Compared with native tumors and tissue cultured with androgens, androgen deprivation in the medium led to decreased expression of both androgen receptor and its target gene products, prostate specific antigen (PSA) and ETS-related gene (ERG). *Ex vivo* cultured slices also were sensitive to hypoxia because carbonic anhydrase IX and zinc finger E-box binding homeobox 1 (Zeb1) protein levels increased in 1% oxygen. Exposure of slices to supraphysiological extracellular Ca^{2+} concentration induced a robust and rapid Ca^{2+} entry, with a greater response in tumor compared with nontumor tissue. This *ex vivo* model reproduces the morphologic and functional characteristics of human prostate cancer, including sensitivity to androgen deprivation and induced response to hypoxia and extracellular Ca^{2+}. It therefore could become an attractive tool for drug response prediction studies. *(Am J Pathol 2019, 189: 1268–1275; https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.02.017)*

Although prostate cancer (PCa) is the second leading cause of cancer-related death among men in developed countries, the transfer of scientific findings into medical progress is challenged by the lack of valuable preclinical models. Immortalized PCa cell lines have acquired several mutations in culture, and both their genotype and phenotype are different from those observed in native human cancer cells.[1] Moreover, *in vitro* studies with cell lines do not reproduce the interactions with the prostate microenvironment, which is critical for PCa development and progression. Xenografts and genetically engineered mice represent improved models but have inherent advantages and limitations regarding mimicking PCa in humans. These models have advanced our understanding of PCa behavior, but differences between species and donors may lead to difficulties in interpreting the results. In addition, their deviation from human physiology could result in inaccurate preclinical assessment.[2] To address these limitations, the use of *ex vivo* culture of human tissues has been described for different types of cancers.[3–6] Culture of tissue slices is a good representative model of the

Supported by the Region Center Val de Loire, Project ReSCaP Canceropole Grand Ouest, France.

Disclosures: None declared.

Copyright © 2019 American Society for Investigative Pathology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.02.017

in vivo situation in patients because it maintains both cancer cell heterogeneity and an intact microenvironment, which allows stromal-epithelial interactions. In the past, *in vitro* maintenance of prostate tissues has been challenged by rapid degradation and poor survival of epithelial cells.[7,8] However, the use of precision-cut slicing has led to more reproducible models, which have been reported by a few teams in preclinical studies.[9–12] However, in these previous studies, the culture conditions did not take into account the specific variations related to the tumor microenvironment.

Essential factors such as hypoxia and calcium signaling have been shown to influence tumor progression and resistance to treatment. Hypoxia is a feature characteristic of most solid tumors, is a major contributor to cancer progression and resistance to treatment, and it exerts its effects mainly through the process of epithelial to mesenchymal transition (EMT).[13–15] Prostate tumors are known to grow under a hypoxic microenvironment, which comprises oxygen concentrations lower than those found in the normal prostate.[16,17] In addition, Ca^{2+} signaling associated with variations in extracellular Ca^{2+} concentrations has been shown to play a major role in the regulation of cellular processes leading to tumor progression, including proliferation, migration, and apoptosis.[18–20] Extracellular calcium concentrations in the tumor microenvironment can reach levels between 8 and 40 mmol/L, and it has been implicated in the development of bone metastasis.[21] Moreover, altered expression of specific Ca^{2+} channels and pumps are characteristic features of most cancers including PCa.[22] Therefore, the sensitivity of human cancer samples to extracellular calcium concentrations is a major element that needs to be assessed to show the functional value of an *ex vivo* prostate tissue model. Here, we describe a relevant and functional model of cultured benign and malignant human prostate tissues that preserves hypoxia and calcium sensitivity. The development of this model will allow a better analysis of the intrinsic properties of PCa and, possibly, the rapid and accurate identification of targeted cancer treatment.

Materials and Methods

Patients and Tissues

Prostatic tissue samples, including malignant and normal tissues, were obtained from 26 patients undergoing radical prostatectomy for clinically localized PCa. Tumors were classified according to the International Society of UroPathology (ISUP) in groups 1 to 5, and according to the pTNM stage as pT2 or pT3 (Table 1). Written informed consent was received from all patients.

Preparation of Tissue Slices

Radical prostatectomy specimens were obtained immediately after surgery, and 4- to 5-mm samples were dissected aseptically from the peripheral zone within the putative benign or cancer areas (Figure 1). Tissue samples were glued against an agarose block (8% agarose) that was stair-step cut and were immersed in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. Briefly, the samples were cut immediately with a vibratome (Vibratome VT1200; Leica, Nanterre, France) at 200- to 300-μm thickness, with a total number of slices ranging from 6 to 10 per case. Slices were used for either *ex vivo* culture and biomarker expression (15 patients) or for *ex vivo* culture and intracellular Ca^{2+} measurements (11 patients).

Table 1 Characteristics of Patients and Tissues

Characteristic	Value
Age in years, median (range)	67 (51–76)
PSA, ng/mL (range)	9.4 (7–16)
pTNM, *n*	
pT2	15
pT3	11
ISUP group, *n*	
1	2
2	11
3	8
4–5	5

ISUP, International Society of UroPathology.

Ex Vivo Culture of Prostate Tissue Slices

Each slice was transferred into a 6-well cell culture plate containing Dulbecco's modified Eagle medium (Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 10% fetal

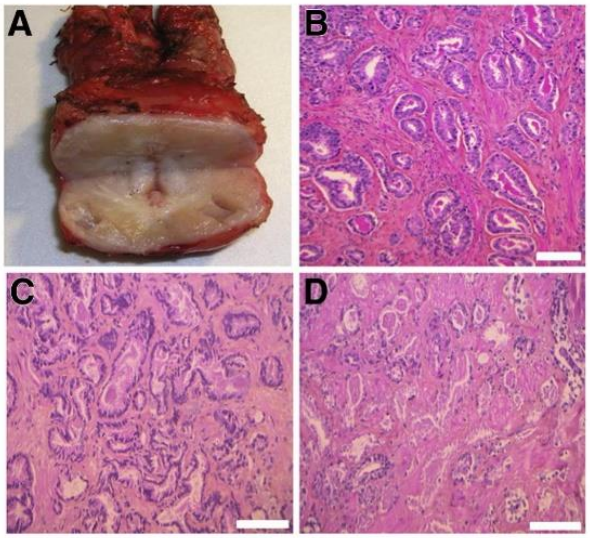


Figure 1 Tissue morphology and maintenance in culture. Radical prostatectomy specimen cut in a transverse plane. **A:** Tissue samples were taken from the peripheral zone in putative benign and cancer zones that were determined after palpation. **B–D:** Cancer samples from the same tumor before culture (**B**), after 5 days of culture with preservation of the tissue architecture and without necrosis (**C**), and after 7 days of culture, with areas of necrosis (**D**) (hematoxylin-eosin-saffron). Scale bars: 100 μm (**B–D**).

bovine serum and 1% penicillin-streptomycin, and incubated with or without 1 nmol/L dihydrotestosterone (DHT) (D073; Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Slices were incubated in a 37°C humidified incubator with 5% CO_2. Medium was changed daily.

Hypoxia experiments were performed in a hypoxia chamber (SCI-tive; Alliance Bio Expertise, Guipry, France) in 1% O_2 at 37°C in a 5% CO_2 humidified environment. Slices first were placed in normoxia for 24 hours, to avoid additional stress after cutting, and then were incubated for 24 hours in a hypoxia environment. The medium was replaced every day.

Slices were cultured between 3 and 7 days after tissue collection. Analysis of sections after hematoxylin-eosin-saffron and immunohistochemical staining was performed at baseline (day 0), and then for day 1 (D1) to D3, or D1 to D7, depending on the number of slices available. In four cases the number of slices was sufficient to analyze the morphology from D0 to D7. An analysis of biomarker expression was performed in 15 cases at D0 and after 48 hours of culture. The effects of DHT deprivation and hypoxia were measured in 15 samples for DHT deprivation and in 5 samples for hypoxia at D2.

Immunohistochemistry

After fixation in 10% formalin, tissue slices were embedded in paraffin and sections were serially cut at 5 μm with a microtome. Sections then were spread on a SuperFrost Plus slide (Fischer, Illkirch, France) and dried for 1 hour at 56°C. One section was stained with hematoxylin-eosin-saffron for morphologic analysis. The other slides, used for immunostaining, were deparaffinized (histosol and alcohol baths), rehydrated, and heated in citrate buffer at pH 6 (citric acid monohydrate and sodium citrate) for antigenic retrieval. After blocking for endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide, primary antibodies were incubated with the section. The panel of primary antibodies included p63 (clone 4A4, dilution 1/100, 30 min; Biocare, Concord, CA), p504S (clone 13H4, 1/200, 30 min; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), androgen receptor (AR) (clone 1G3, 1/500, 30 min; Abnova), prostate specific antigen (PSA; clone BSB7,1/250, 30 min; BioSB, Santa Barbara, CA), zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1; clone 4C4, 1/500, 1 h; Abnova), carbonic anhydrase IX (CAIX) (clone TH22, 1/100, 30 min; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), ETS-related gene (EGR; EPR 3864, 1/1, 30 min; Roche France, Meylan, France), and the proliferation marker Ki-67 (clone 39-9, 1/50, 30 min; DakoCytomation). Immunohistochemistry was performed with either the automated BenchMark XT slide stainer (Ventana Medical Systems, Inc., Orovalley, AZ) using the OptiView Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc.) or manually (for Zeb1) using the streptavidin-biotin-peroxidase method with diaminobenzidine as the chromogen (Kit LSAB; DakoCytomation). Slides were finally counterstained with hematoxylin. Negative controls were obtained after omission of the primary antibody or incubation with an irrelevant antibody.

Scoring of Antibody Staining

Staining for p63, p504, CAIX, and PSA was scored as positive or negative, and staining for AR, ERG, and Zeb1 was evaluated as follows: -, no stained cells; +, focal positivity; ++, diffuse positivity. The number of Ki-67–positive cells was expressed as the percentage of total epithelial cells.

Intracellular Ca^{2+} Measurements

Intracellular Ca^{2+} measurements were performed on tissue slices after 48 hours of *ex vivo* culture. Intracellular calcium variations were assessed with the rhod-2 calcium-sensitive dye. All of the next steps were performed in darkness. Briefly, human prostate slices were incubated for 30 minutes with 5 μmol/L Rhod-2 acetoxymethyl (AM) at room temperature. Slices were placed in the bath of a Macro Zoom System Microscope MVX10 (Olympus France, Rungis, France) and were washed for 20 minutes with a physiological saline solution before experiments, using a pump in an open circuit. The dye was excited at 545 ± 20 nm with light-emitting diode (LED) illumination (CoolLED pE-300

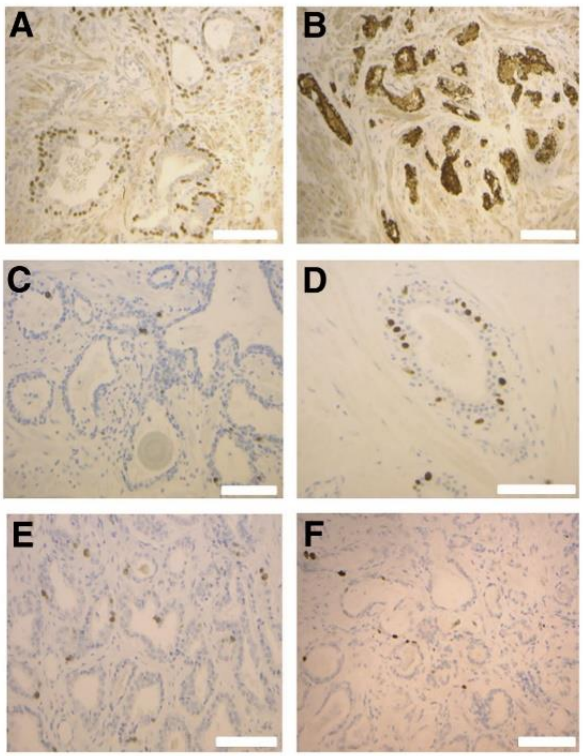


Figure 2 Biomarker expression in samples cultured for 2 days under normoxic conditions. **A** and **B:** Normal glands show preservation of the p63-positive basal cell layer (**A**), whereas cancer cells are positive for p504s (**B**). **C** and **D:** When compared with the baseline status (D0) (**C**), the proliferation rate (determined by Ki-67 staining) was increased in the basal cell layer of normal glands, with several positive cells per gland (**D**). **E** and **F:** In cancer cells, the proliferation rate remained identical after culture (**F**), when compared with D0 (**E**), with less than 3% positive cells. Scale bars: 100 μm (**A**–**F**).

white; CollLED, Andover, UK), and fluorescence was collected at 605 ± 40 nm with a sCMOS Zyla 4.2 PLUS camera (Oxford Instruments, Abingdon-on-Thames, UK) and a Macro Zoom System Microscope MVX10. The image acquisition rate was 0.1 Hz and exposure time was 600 ms. For each measurement, human prostate samples were incubated with 2 mmol/L $CaCl_2$ in physiological saline solution. After a stabilization time, $CaCl_2$ was added to the incubation bath to reach a final concentration of 5 mmol/L Ca^{2+}. Analyses were performed with ImageJ analysis software version 1.52a (NIH, Bethesda, MD; *https://imagej.nih.gov/ij*). The Ca^{2+} fluorescence signal was normalized with the initial fluorescence signal obtained at 2 mmol/L $CaCl_2$ to correct for differences in dye loading across the preparation. Variations of the Ca^{2+} signal then were determined by calculating the difference between the basal value, at 2 mmol/L $CaCl_2$, and the maximal Ca^{2+} value after addition of 5 mmol/L $CaCl_2$.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with StatView software version 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Comparison between groups was performed using the χ^2 test for categoric data and the nonparametric *U*-test for continuous data. Paired data were analyzed using the nonparametric Wilcoxon test.

Results

Tissue Morphology

Tissue morphology after culture under normoxic conditions was compared with the morphology of native tissues (baseline, at D0). For all of the tested tissues, the architecture was preserved in both benign and malignant tissues from D1 to D5. No necrosis was observed between D1 and D5, but at D6 tissue samples started showing some necrosis foci, and at D7 necrosis was extensive (Figure 1).

Biomarker Expression

The expression of biomarkers after culture under normoxic conditions for 2 days was compared with native tissues (baseline, at D0). Biomarkers included markers of normal basal epithelial cells (p63), prostate cancer cells (p504S), proliferation (Ki-67), EMT (Zeb1 transcription factor), hypoxia (CAIX), and the fusion gene *TMPRSS2-ERG* product (ERG).

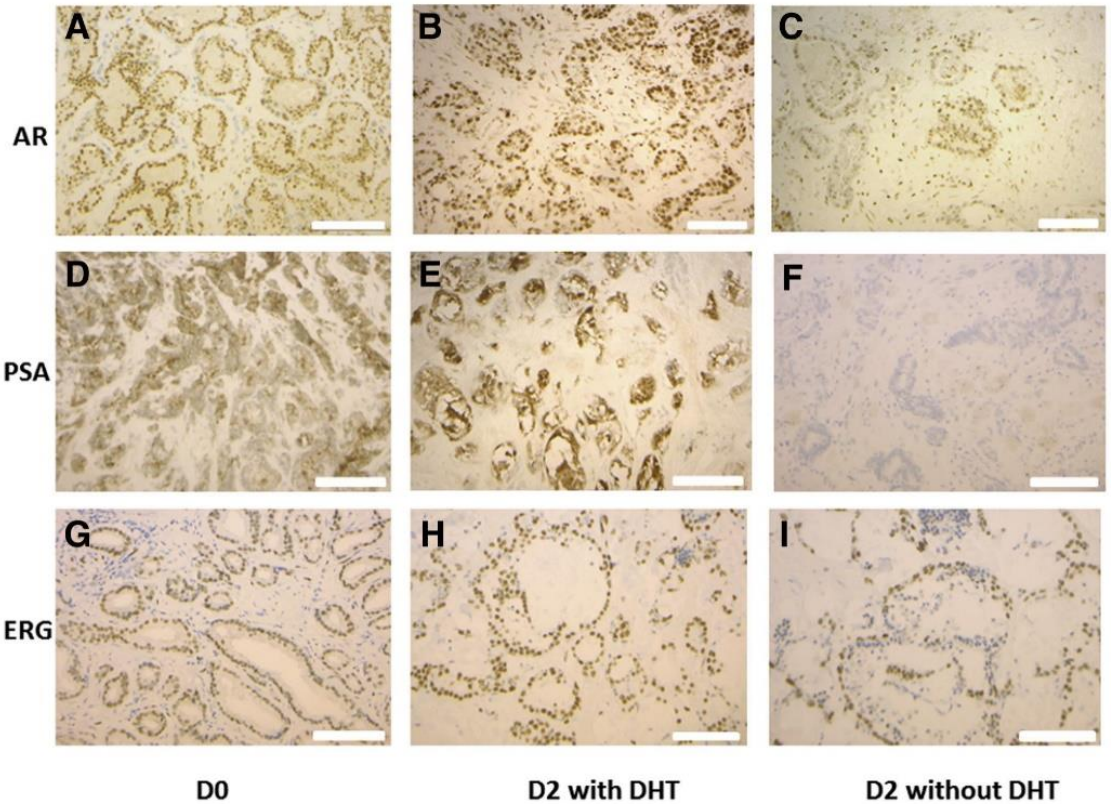


Figure 3 Expression of androgen receptor (AR) (**A**–**C**), PSA (**D**–**F**), and ERG (**G**–**I**) in native tumors (D0), and cancer samples cultured for 2 days with or without dihydrotestosterone (DHT). In the presence of DHT, AR, prostate specific antigen (PSA), and ETS-related gene (ERG) expression in cancer cells (**B**, **E**, and **H**) remains identical to that observed at baseline (D0) (**A**, **D**, and **G**). In contrast, DHT ablation lead to decreased expression of AR (**C**) and ERG (**I**), and PSA staining was abolished (**F**). Scale bars: 100 μm (**A**–**I**).

In nontumor tissues ($n = 7$), all benign glands showed preservation of the p63-positive basal cell layer (Figure 2A). In malignant tissue slices ($n = 8$), cancer cells expressed p504S (Figure 2B) in all cases, as observed in the native tumors.

In normal glands at D0, proliferation was limited and restricted to basal cells (median, 1% Ki-67–positive cells in the epithelial compartment; range, 1% to 3%). Basal cell proliferation increased after culture (median, 8% Ki-67–positive cells in the epithelial compartment; range, 6% to 15%) when compared with the baseline status ($P < 0.02$, Mann–Whitney test) (Figure 2, C and D). In tumor tissues, the proliferation rate was identical after culture (median, 3%; range, 2% to 5%) when compared with native tumors at D0 (median, 3%; range, 1% to 4%) ($P = 0.8$) (Figure 2, E and F).

At baseline (D0), prostate cancer cells expressed ERG in four of eight cases (50%). In all positive cases, ERG expression was preserved in the cultured slices, and ERG-negative tumors remained negative after tissue culture. ERG expression was negative in all normal glands at both baseline and after culture. PSA was expressed in all cases of both normal and cancer tissues both before and after culture. In normal tissues at D0, epithelial cells were negative for the Zeb1 transcription factor and for CAIX expression. In cultured slices obtained from normal tissues (DHT-supplemented or not), CAIX staining remained negative, and focal expression of Zeb1 (rare positive epithelial cells) was observed in two of seven cases (without a significant difference compared with baseline, $P = 0.4$). At D0, three of eight malignant samples showed focal Zeb1 expression in cancer cells, without CAIX staining. After culture under normoxic conditions, CAIX remained negative. Tumors with focal Zeb1 expression at baseline remained unchanged, whereas two of the five initially Zeb1-negative cases showed focal expression (without a significant difference compared with D0, $P = 0.6$).

Effects of DHT Deprivation

In both benign and malignant glands, the absence of DHT in the medium led to decreased expression of AR (from diffuse to focal staining) and its target, the PSA gene product (from positive to negative staining), when compared with slices cultured in medium supplemented with DHT ($P = 0.0001$) (Figure 3, A–F). In ERG-positive tumors, DHT ablation was associated with decreased ERG levels in cancer cells (from diffuse to focal staining) ($P < 0.03$) (Figure 3, G–I).

Hypoxia Effects

Hypoxic conditions were tested with DHT supplementation for five samples (two benign and three malignant). In normoxia, benign samples were negative for Zeb1 and CAIX, and malignant samples were negative for CAIX (Figure 4A), and focally positive for Zeb1 (Figure 4C). When cultured under hypoxic conditions, all samples (benign and malignant) showed intense and diffuse membranous staining for CAIX ($P = 0.001$ compared with normoxic conditions) (Figure 4B). In addition, in all cases, hypoxia also led to increased Zeb1 expression, with diffuse positive staining ($P = 0.007$ compared with normoxic conditions) (Figure 4D). In contrast, hypoxia did not modify ERG expression in cancer cells as well as AR and PSA staining that remained positive (because hypoxic conditions were tested with DHT supplementation). Cancer cell proliferation also was identical in hypoxic compared with normoxic conditions, with a proliferation rate of less than 3% (Figure 4, E and F).

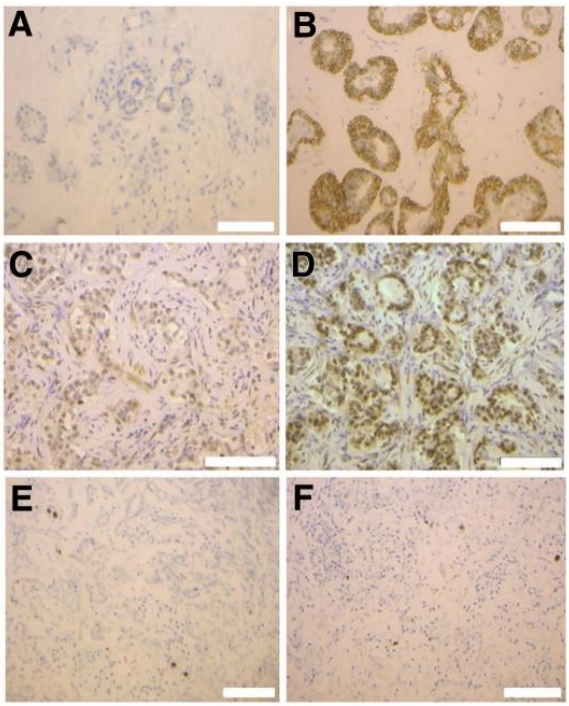


Figure 4 Effects of hypoxia on the expression of carbonic anhydrase IX (CAIX), zinc finger E-box binding homeobox 1 (Zeb1) transcription factor, and Ki-67. **A** and **C:** In cancer samples cultured in normoxic conditions, the hypoxia marker CAIX was negative (**A**), with negative to focal Zeb1 staining (**C**). **B** and **D:** After culture in hypoxia, cancer cells showed diffuse and membranous staining for CAIX (**B**), with diffuse nuclear staining for Zeb1 (**D**). **E** and **F:** In contrast, hypoxia does not modify cancer cell proliferation, with less than 3% of Ki-67–positive cells in both normoxic (**E**) and hypoxic (**F**) conditions. Scale bars: 100 μm (**A**–**F**).

Ex Vivo Functional Ca^{2+} Imaging

Finally, functional Ca^{2+} signaling was evaluated in prostate tissue slices obtained from tumor and adjacent nontumor tissues from 11 patients. This study was performed by measuring the variations in basal intracellular Ca^{2+} concentrations in response to variations of extracellular Ca^{2+} concentrations (from 2 to 5 mmol/L and 5 from 2 mmol/L). Interestingly, as observed in the graphic trace, exposure to supraphysiological extracellular Ca^{2+} concentration (5 mmol/L) induced a robust and rapid increase of basal cytosolic Ca^{2+} concentration, resulting from a Ca^{2+} entry followed by a sustained plateau.

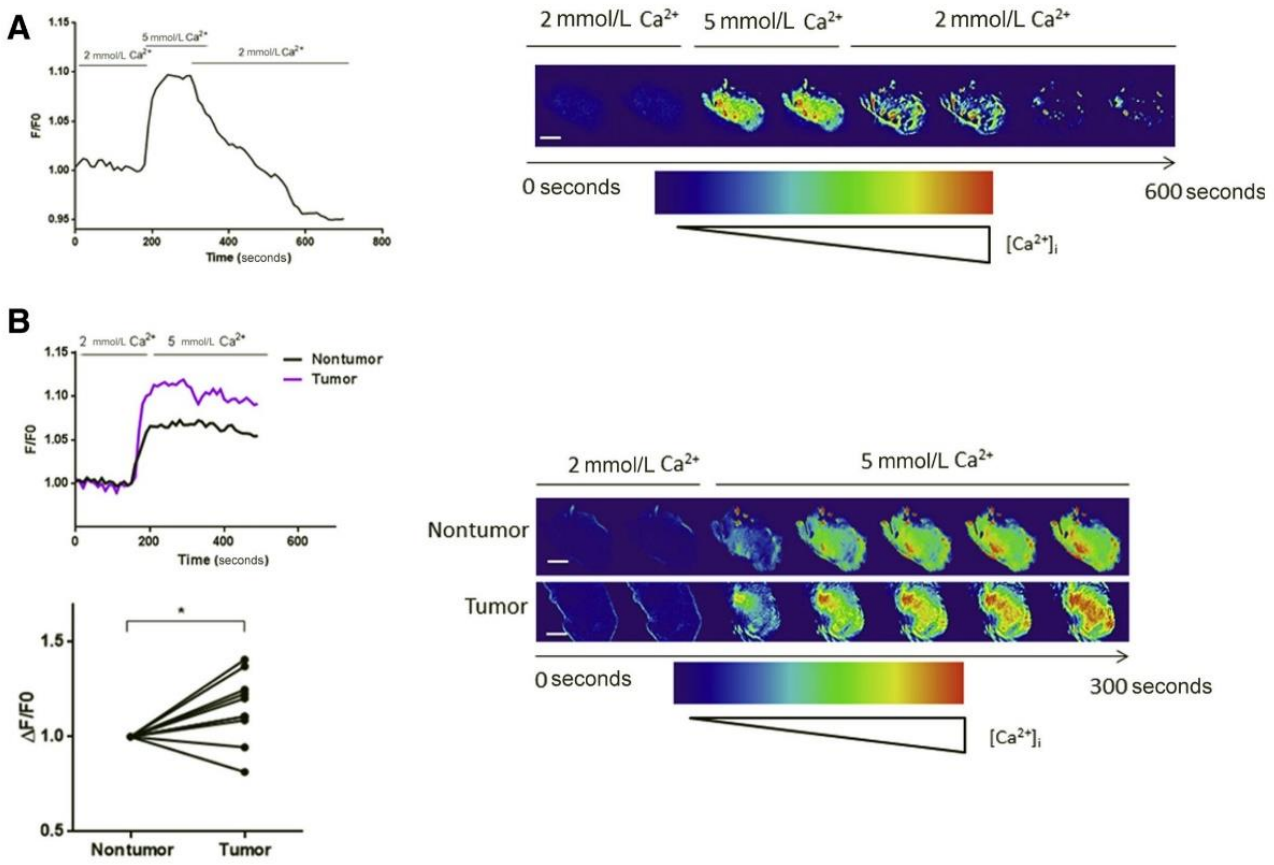


Figure 5 Variations in intracellular Ca^{2+} in human prostate slices. **A:** Exposure to supraphysiological extracellular Ca^{2+} concentrations (5 mmol/L) induced a robust and rapid Ca^{2+} entry followed by a sustained plateau and a slow return toward baseline by reducing extracellular Ca^{2+} concentration from 5 to 2 mmol/L. Real-time fluorescence images were collected every 80 seconds. **B:** Comparison of Ca^{2+} entry between tumor and adjacent nontumor prostate slices: in six of nine cases, Ca^{2+} entry was increased more in tumor compared with nontumor slices. Variations in Ca^{2+} signal were determined by calculating the differences between basal, at 2 mmol/L $CaCl_2$, and maximal Ca^{2+} value after addition of 5 mmol/L $CaCl_2$ (ΔF/F0). Real-time fluorescence images were collected every 10 seconds. $n = 11$ patients. $^*P < 0.05$ (Wilcoxon). Scale bars: 2 mm (**A** and **B**).

Interestingly, this increase could be reversed toward basal intracellular Ca^{2+} concentration when returning to a 2 mmol/L extracellular Ca^{2+} concentration (Figure 5A). The comparison of intracellular Ca^{2+} entry between tumor and adjacent nontumor prostate slices showed enhanced Ca^{2+} entry in malignant compared with benign tissues (for 9 of 11 cases) (Wilcoxon test, $P = 0.014$) (Figure 5B). In tumor tissues, intracellular Ca^{2+} entry was greater in PCa from patients at high risk of recurrence (ISUP group 4 or 5, and/or pT3) ($n = 5$), compared with PCa from patients at low or intermediate risk of recurrence (International Society of UroPathology groups 1 to 3, and pT2) ($n = 6$) (U-test, $P = 0.045$) (Table 2).

Discussion

This study showed that prostate tissue slices can be cultured for up to 5 days without necrosis with a preserved morphology and, more importantly, with unaffected physiological properties. This longevity of prostate tissue is obtained by using precision-cut slicing and daily replacement of medium complemented with DHT, and it is identical to that described previously.[4] The expression of classic cell type markers was maintained, and they included p63 for basal cells, and AR and PSA for luminal cells. The cancer cell–associated marker p504S was present in all malignant tissue slices. Moreover, ERG expression was maintained after tissue culture in initially positive ERG tumors. Importantly, this finding is in contrast with a previous study that reported a loss of ERG expression.[4] Because ERG-positive staining in prostate cancer cells is mediated by the action of androgens on the fusion gene *TMPRSS2-ERG*,[24] this result suggests a fully functional AR-dependent signaling pathway in our model.

Table 2 Differences in Calcium Entry

Risk of recurrence (d'Amico criteria[23])	Median ΔF/F0 (range)	P (U-test)
Low	1.08 (0.81–1.25)	0.045
High	1.30 (1.11–2.78)	

Increased proliferation of basal cells was observed in benign tissue slices after culture when compared with native tissues (D0). This finding, which likely reflects increased glandular regeneration after culture, also was observed in a previous study,[7] but not in another study.[4] However, in malignant samples, the proliferation rate remained identical in cancer cells after culture, as previously described.[4] Because one of the major potential interests of *ex vivo* models is the testing of therapeutic agents, the important point was to maintain an identical proliferation rate in cancer cells before and after culture.

When removing DHT from the medium, decreased levels of proteins encoded by androgen-regulated genes was observed. These proteins include AR, PSA, and ERG, in both malignant and benign tissues. This demonstration of androgen dependence has been reported in only one previous study,[4] but without effect on ERG, and it is mandatory to reproduce *ex vivo* the biology of human PCa cells. In fact, the AR is a key molecule that drives both normal prostate development and PCa. To date, the study of androgen action in the human prostate has been hampered by the lack of adequate models because most PCa cell lines used for *in vitro* studies are generated from long-term culture in the absence of androgens.[2] The present *ex vivo* model therefore would allow studying the physiological effects of androgens in either normal or malignant human prostate.

Some previous studies have reported the functionality of PCa organotypic culture. Vaira et al[3] used this model to show the effects of targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling on cancer cell proliferation and apoptosis. Other reports have shown that cytotoxic drugs and ionizing radiation can induce DNA damage in *ex vivo* culture of PCa slices,[9] and that inhibition of poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP-1) can lead to AR signaling alterations.[12] However, no previous studies to date have analyzed the ability of an *ex vivo* PCa model to respond to major signals of a cancer microenvironment, hypoxia, and extracellular calcium.

Because the Ca^{2+} signal is a phenomenon well suited for the rapid transfer of information from the microenvironment to cancer cells,[22] the functional value of *ex vivo* cultures also could be reflected by the ability of tissue slices to respond to variations in extracellular Ca^{2+} concentrations. We have developed an *ex vivo* organotypic culture method that for the first time is suitable for the evaluation of live Ca^{2+} signaling in both tumor and adjacent nontumor samples. This method allowed us to follow the variations of basal intracellular Ca^{2+} concentration dynamics in human prostate slices resulting from Ca^{2+} entry from the extracellular side of the plasma membrane. The functionality of our model was attested by the variations of intracellular Ca^{2+} concentrations in response to variations in extracellular Ca^{2+}. An increased Ca^{2+} entry in malignant compared with benign tissues also was shown. These data are in agreement with previous studies reporting alterations in Ca^{2+} homeostasis in cancer cells compared with normal cells.[25] This type of Ca^{2+} entry already was described in breast cancer cell lines as constitutive Ca^{2+} entry.[26] Here, we show for the first time the existence of a constitutive Ca^{2+} entry in PCa and, more interestingly, its differential level in tumor versus nontumor tissues. A greater intracellular Ca^{2+} entry also was found in tissues sampled from high-risk PCa compared with tumors with low or intermediate risk of recurrence, suggesting that Ca^{2+} entry may contribute to cancer progression. There is substantial evidence to suggest an important role for Ca^{2+} during tumorigenesis. Many mitogens and tumor growth factors elicit rapid increases of intracellular calcium. Furthermore, Ca^{2+} is involved in cellular events that regulate cell-cycle progression, cell migration, angiogenesis, and apoptosis in various cancer cells.[27] Our findings raise the possibility that PCa cells might be particularly susceptible to novel anticancer agents that target Ca^{2+} homeostasis. Elucidating the nature of Ca^{2+} channels involved in dysregulated constitutive Ca^{2+} entry therefore is essential to better understand the mechanisms contributing to malignant transformation and cancer progression.

Hypoxia is a common phenomenon observed in solid tumors, including PCa. In human tumors, the effects of hypoxia largely are mediated by the hypoxia-inducible factors—transcription factors that induce the expression of several proteins including CAIX.[28] Immunohistochemical staining of CAIX has been shown to be an endogenous surrogate marker for marked hypoxia in several types of solid tumors.[29–31] Here, we show for the first time that hypoxic conditions could induce the expression of CAIX in *ex vivo* cultures of human prostate, even in benign tissues. In PCa, EMT induced by hypoxia is involved in the resistance to both radiotherapy and chemotherapeutic treatment.[15,32] The key transcription factor of EMT, Zeb1, is associated in human PCa with cancer progression, metastases, and decreased survival.[33] Here, we showed that, together with CAIX induction, hypoxia led to increased expression of Zeb1 in epithelial cells. Because EMT is a reversible process driven mostly by epigenetic mechanisms,[34,35] the use of organotypic cultures therefore could represent a valuable preclinical model to study the effects of drugs targeting epigenetics, such as histone-modifying enzymes.

In conclusion, we report for the first time an *ex vivo* culture model of human PCa that remains sensitive to androgen ablation, hypoxia, and extracellular Ca^{2+}. This model could be used to test therapeutic agents in viable tumor samples, thereby allowing the development of a precision medicine in clinical practice.

References

1. Toivanen R, Taylor RA, Pook DW, Ellem SJ, Risbridger GP: Breaking through a roadblock in prostate cancer research: an update on human model systems. J Steroid Biochem Mol Biol 2012, 131:122–131
2. Chauchereau A: Experimental models for the development of new medical treatments in prostate cancer. Eur J Cancer 2011, 47 Suppl 3: S200–S214
3. Vaira V, Fedele G, Pyne S, Fasoli E, Zadra G, Bailey D, Snyder E, Faversani A, Coggi G, Flavin R, Bosari S, Loda M: Preclinical model

of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 2010, 107:8352–8356
4. Maund SL, Nolley R, Peehl DM: Optimization and comprehensive characterization of a faithful tissue culture model of the benign and malignant human prostate. Lab Invest 2014, 94:208–221
5. Carranza-Torres IE, Guzmán-Delgado NE, Coronado-Martínez C, Bañuelos-García JI, Viveros-Valdez E, Morán-Martínez J, Carranza-Rosales P: Organotypic culture of breast tumor explants as a multicellular system for the screening of natural compounds with antineoplastic potential. Biomed Res Int 2015, 2015:618021
6. Koerfer J, Kallendrusch S, Merz F, Wittekind C, Kubick C, Kassahun WT, Schumacher G, Moebius C, Gaßler N, Schopow N, Geister D, Wiechmann V, Weimann A, Eckmann C, Aigner A, Bechmann I, Lordick F: Organotypic slice cultures of human gastric and esophagogastric junction cancer. Cancer Med 2016, 5:1444–1453
7. Papini S, Rosellini A, Campani D, DeMatteis A, Selli C, Revoltella RP: Selective growth of epithelial basal cells from human prostate in a three-dimensional organ culture. Prostate 2004, 59:383–392
8. Bläuer M, Tammela TL, Ylikomi T: A novel tissue-slice culture model for non-malignant human prostate. Cell Tissue Res 2008, 332: 489–498
9. Jäämaa S, Af Hällström TM, Sankila A, Rantanen V, Koistinen H, Stenman UH, Zhang Z, Yang Z, De Marzo AM, Taari K, Ruutu M, Andersson LC, Laiho M: DNA damage recognition via activated ATM and p53 pathway in nonproliferating human prostate tissue. Cancer Res 2010, 70:8630–8641
10. Zhang Z, Yang Z, Jäämaa S, Liu H, Pellakuru LG, Iwata T, af Hällström TM, De Marzo AM, Laiho M: Differential epithelium DNA damage response to ATM and DNA-PK pathway inhibition in human prostate tissue culture. Cell Cycle 2011, 10:3545–3553
11. Centenera MM, Gillis JL, Hanson AR, Jindal S, Taylor RA, Risbridger GP, Sutherland PD, Scher HI, Raj GV, Knudsen KE, Yeadon T; Australian Prostate Cancer BioResource, Tilley WD, Butler LM: Evidence for efficacy of new Hsp90 inhibitors revealed by ex vivo culture of human prostate tumors. Clin Cancer Res 2012, 18: 3562–3570
12. Schiewer MJ, Goodwin JF, Han S, Brenner JC, Augello MA, Dean JL, Liu F, Planck JL, Ravindranathan P, Chinnaiyan AM, McCue P, Gomella LG, Raj GV, Dicker AP, Brody JR, Pascal JM, Centenera MM, Butler LM, Tilley WD, Feng FY, Knudsen KE: Dual roles of PARP-1 promote cancer growth and progression. Cancer Discov 2012, 2:1134–1149
13. Byrne NM, Nesbitt H, Ming L, McKeown SR, Worthington J, McKenna DJ: Androgen deprivation in LNCaP prostate tumour xenografts induces vascular changes and hypoxic stress, resulting in promotion of epithelial-to-mesenchymal transition. Br J Cancer 2016, 114:659–668
14. Rankin EB, Giaccia AJ: Hypoxic control of metastasis. Science 2016, 352:175–180
15. Montanari M, Rossetti S, Cavaliere C, D'Aniello C, Malzone MG, Vanacore D, Di Franco R, La Mantia E, Iovane G, Piscitelli R, Muscariello R, Berretta M, Perdonà S, Muto P, Botti G, Bianchi AAM, Veneziani BM, Facchini G: Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview. Oncotarget 2017, 8: 35376–35389
16. Vaupel P, Höckel M, Mayer A: Detection and characterization of tumor hypoxia using pO2 histography. Antioxid Redox Signal 2007, 9: 1221–1235
17. McKeown SR: Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. Br J Radiol 2014, 87:20130676
18. Roderick HL, Cook SJ: Ca2+ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca2+ for cancer cell proliferation and survival. Nat Rev Cancer 2008, 8:361–375
19. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y: Calcium in tumor metastasis: new roles for known actors. Nat Rev Cancer 2011, 11:609–618
20. Montheith GR, Prevarskaya N, Roberts-Thomson SJ: The calcium-cancer signalling nexus. Nat Rev Cancer 2017, 17:367–380
21. Breuksch I, Weinert M, Brenner W: The role of extracellular calcium in bone metastasis. J Bone Oncol 2016, 5:143–145
22. Montheith GR, Davis FM, Roberts-Thomson SJ: Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. J Biol Chem 2012, 287:31666–31673
23. Hernandez DJ, Nielsen ME, Han M, Partin AW: Contemporary evaluation of the D'amico risk classification of prostate cancer. Urology 2007, 70:931–935
24. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM: Recurrent gene fusions in prostate cancer. Nat Rev Cancer 2008, 8:497–511
25. Stewart TA, Yapa KT, Monteith GR: Altered calcium signaling in cancer cells. Biochim Biophys Acta 2015, 1848:2502–2511
26. Chantôme A, Potier-Cartereau M, Clarysse L, Fromont G, Marionneau-Lambot S, Guéguinou M, Pagès JC, Collin C, Oullier T, Girault A, Arbion F, Haelters JP, Jaffrès PA, Pinault M, Besson P, Joulin V, Bougnoux P, Vandier C: Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. Cancer Res 2013, 73:4852–4861
27. Clapham DE: Calcium signaling. Cell 2007, 131:1047–1058
28. Balamurugan K: HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. Int J Cancer 2016, 138:1058–1066
29. Russell J, Carlin S, Burke SA, Wen B, Yang KM, Ling CC: Immunohistochemical detection of changes in tumor hypoxia. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2009, 73:1177–1186
30. Forker L, Gaunt P, Sioletic S, Shenjere P, Potter R, Roberts D, Irlam J, Valentine H, Hughes D, Hughes A, Billingham L, Grimer R, Seddon B, Choudhury A, Robinson M, West CML: The hypoxia marker CAIX is prognostic in the UK phase III VorteX-Biobank cohort: an important resource for translational research in soft tissue sarcoma. Br J Cancer 2018, 118:698–704
31. Ambrosio MR, Di Serio C, Danza G, Rocca BJ, Ginori A, Prudovsky I, Marchionni N, Del Vecchio MT, Tarantini F: Carbonic anhydrase IX is a marker of hypoxia and correlates with higher Gleason scores and ISUP grading in prostate cancer. Diagn Pathol 2016, 11:45
32. Stark TW, Hensley PJ, Spear A, Pu H, Strup SS, Kyprianou N: Predictive value of epithelial-mesenchymal-transition (EMT) signature and PARP-1 in prostate cancer radioresistance. Prostate 2017, 77: 1583–1591
33. Figiel S, Vasseur C, Bruyere F, Rozet F, Maheo K, Fromont G: Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. Hum Pathol 2017, 61:26–32
34. Wang JQ, Wu KJ: Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition by hypoxia in cancer: targets and therapy. Curr Pharm Des 2015, 21:1272–1278
35. Lee JY, Kong G: Roles and epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors in cancer initiation and progression. Cell Mol Life Sci 2016, 73:4643–4660

cancers

MDPI

Article

A Novel Calcium-Mediated EMT Pathway Controlled by Lipids: An Opportunity for Prostate Cancer Adjuvant Therapy

Sandy Figiel [1], Fanny Bery [1], Aurélie Chantôme [1,2], Delphine Fontaine [1], Côme Pasqualin [2,3], Véronique Maupoil [2,3], Isabelle Domingo [1], Roseline Guibon [4], Franck Bruyère [4], Marie Potier-Cartereau [1], Christophe Vandier [1], Gaëlle Fromont [1,4,†] and Karine Mahéo [1,2,†,*]

1 Inserm N2C UMR1069, Université de Tours, F-37032 Tours cedex 1, France; sandy.figiel@gmail.com (S.F.); fannybery@hotmail.fr (F.B.); aurelie.chantome@med.univ-tours.fr (A.C.); delphine.fontaine@etu.univ-tours.fr (D.F.); isabelle.domingo@univ-tours.fr (I.D.); marie.potier-cartereau@univ-tours.fr (M.P.-C.); christophe.vandier@univ-tours.fr (C.V.); gaelle.fromont-hankard@univ-tours.fr (G.F.)

2 Faculté de Pharmacie, Université de Tours, F-37200 Tours, France; come.pasqualin@univ-tours.fr (C.P.); veronique.maupoil@univ-tours.fr (V.M.)

3 ERL CNRS 7003-EA 7349-Signalisation et transports ioniques membranaires (STIM), 37200 Tours, France

4 Departments of Pathology and Urology, CHRU Bretonneau, F-37044 Tours cedex 9, France; roseline.guibon@univ-tours.fr (R.G.); f.bruyere@chu-tours.fr (F.B.)

* Correspondence: karine.maheo@univ-tours.fr; Tel.: (+33)-2-47-36-62-13; Fax: (+33)-2-47-36-62-26

† These authors contributed equally to this work.

Received: 27 September 2019; Accepted: 12 November 2019; Published: 18 November 2019



Abstract: The composition of periprostatic adipose tissue (PPAT) has been shown to play a role in prostate cancer (PCa) progression. We recently reported an inverse association between PCa aggressiveness and elevated PPAT linoleic acid (LA) and eicosapentaenoic acid (EPA) content. In the present study, we identified a new signaling pathway with a positive feedback loop between the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) transcription factor Zeb1 and the Ca^{2+}-activated K^+ channel SK3, which leads to an amplification of Ca^{2+} entry and cellular migration. Using in vitro experiments and ex vivo cultures of human PCa slices, we demonstrated that LA and EPA exert anticancer effects, by modulating Ca^{2+} entry, which was involved in Zeb1 regulation and cancer cellular migration. This functional approach using human prostate tumors highlights the clinical relevance of our observations, and may allow us to consider the possibility of targeting cancer spread by altering the lipid microenvironment.

Keywords: prostate cancer; linoleic acid; eicosapentaenoic acid; Zeb1; calcium

1. Introduction

Prostate cancer (PCa), which is the most commonly diagnosed non cutaneous cancer in men, is a highly heterogeneous disease with variable clinical outcomes [1]. The prostate is surrounded by a rim of periprostatic adipose tissue (PPAT) that may be infiltrated by cancer cells at the locally advanced disease stage (pT3) stage. Previous studies have supported an important role for PPAT in the modulation of PCa progression, which may be mainly mediated through adipokine release [2,3]. However, others adipocyte mediators, such as fatty acids (FA), are also likely to interact with cancer cells.

We recently demonstrated an association between aggressive PCa and the FA PPAT composition. A specific FA profile was associated with PCa aggressiveness, characterized by low levels of both the essential n-6 polyunsaturated FA (PUFA) linoleic acid (LA) and the n-3 PUFA eicosapentaenoic

acid (EPA). Moreover, in vitro migration potential of PCa cell lines supplemented with FA extracts obtained from PPAT was inversely correlated with adipose tissue LA content [4]. Taken together, these data suggest a causal relationship between PPAT FA composition and PCa aggressiveness, but the mechanisms by which LA and EPA can impact cancer cell migration remain to be investigated.

Cancer progression is dependent on the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process, which allows the de-differentiation of epithelial cells to a mesenchymal-like phenotype and increases cancer cell invasion and migration. Zeb1 (zinc finger enhancer binding protein) is a key EMT driver that can be induced not only by microenvironmental factors, including TGFβ and hypoxia, but also by other EMT transcription factors such as Snail [5]. Zeb1 has been shown to induce EMT in PCa cell lines and promote cancer cell migration and invasion [6]. Importantly, we previously demonstrated that Zeb1 expression levels in human PCa increased with disease progression from localized (pT2) to locally advanced (pT3) tumors and metastases. Moreover, positive Zeb1 staining in metastatic tissues was significantly associated with decreased overall survival [7].

Calcium (Ca^{2+}) signaling plays a major role in several events driving cancer progression mainly by regulating cytosolic Ca^{2+} concentrations involved in cell migration [8]. Enhancement of Ca^{2+} entry has been associated with EMT in breast cancer cells [9]. Moreover, several Ca^{2+} channels have been shown to induce the expression of EMT markers [9] and are required for TGFβ-induced EMT [10]. In the PCa cell lines DU145 and PC3, the involvement of several Ca^{2+} channels has already been studied in different processes of tumor development and progression, including proliferation, differentiation, apoptosis and migration [11]. In non-excitable cells, Ca^{2+} entry from extracellular medium is mainly supported by a capacitive Ca^{2+} entry mechanism, also known as store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), which is mediated by store-operated Ca^{2+} channels [12]. We have previously demonstrated a pivotal role for the SK3 channel, which is a Ca^{2+} activated K^+ channel regulating Ca^{2+} entry and cancer cell migration [13]. SK3 has been shown to form complexes with Ca^{2+} channels, thereby leading to increased cytosolic Ca^{2+} concentrations in cancer cells and promoting metastases development [14]. Interestingly, SK3 is located in cholesterol-enriched membrane nanodomains (also known as lipid rafts), and its function is dependent on the lipid microenvironment [14].

The effects of PUFAs on intracellular Ca^{2+} concentration alterations mediated by ion channels have been studied in several pathologies, such as cardiovascular diseases and neurological disorders. For example, n-3 PUFAs have been shown to prevent arrhythmias by modulation of L-type Ca^{2+} channels and sodium–calcium exchanger activity [15,16]. These effects are likely to depend on the type of channel involved, the site of FAs interaction within the channel, and the type of PUFAs. Although in TRPV4 channels the amplitude of the current has been shown to increase following application of n-3 PUFAs, the stimulation of TRPM8 by cold or menthol is almost completely inhibited by the n-6 PUFA arachidonic acid [17].

In this study, we have investigated whether LA and EPA could impact PCa progression by modulating Ca^{2+} signaling and the EMT process. For this study, we used cell lines and human PCa slices, which is an adequate model that maintains both cancer cell heterogeneity and an intact microenvironment.

2. Results

2.1. Linoleic Acid and Eicosapentaenoic Acid Inhibit Cell Migration Induced by TGFβ and the Expression of Zeb1 and Its Target Genes

We first investigated whether the FA identified in our previous study to be inversely associated with PCa aggressiveness can directly regulate cell migration induced by TGFβ. Figure 1A shows that LA and EPA can abrogate TGFβ promigratory effect, as observed using two different cellular migration assays, whereas PA supplementation had no effect. In addition, FA had no effect on basal cellular migration in the absence of TGFβ treatment (Figure S1). We then investigated whether PCa cell migration induced by TGFβ is dependent on Zeb1. Suppression of Zeb1 strongly reduced the promigratory effect of TGFβ, indicating that Zeb1 is a key regulator of PCa cell migration (Figure 1B).

Western blot analysis shows the protein expression level of Zeb1 and E-cadherin (an epithelial target gene of Zeb1) in siZeb1-transfected DU145 cells. The strong decrease of Zeb1 was associated with an increase in E-cadherin protein level. Zeb1 suppression also increased basal and TGFβ-induced E-cadherin mRNA level (Figure 1C). By contrast, Zeb1 suppression tended to decrease TGFβ-induced MMP9 expression (a mesenchymal target gene of Zeb1).

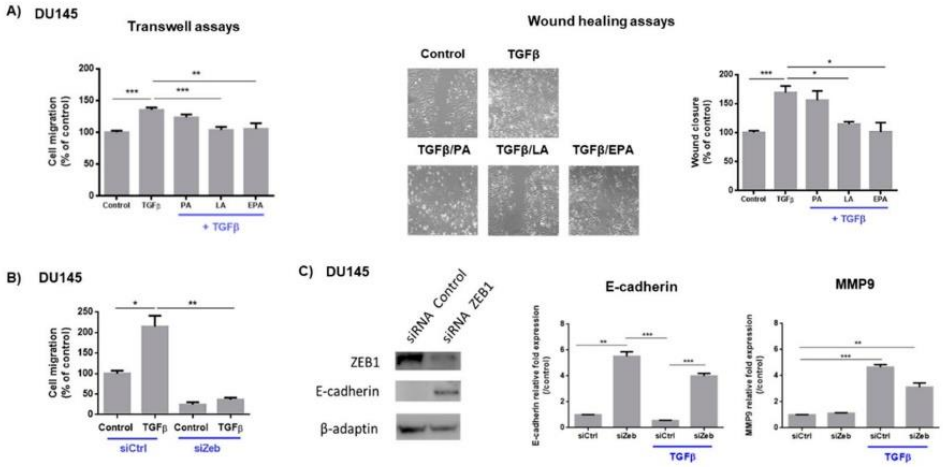


Figure 1. LA and EPA inhibit TGFβ-induced-migration, which is dependent of Zeb1. (**A**) LA and EPA inhibit TGFβ-induced cellular migration. DU145 cells were treated for 48 h with FA (LA, EPA, AP) (20 μM) and with TGFβ (10 ng/mL) and then used for transwell and wound healing migration assays performed for 24 h (in the presence of TGFβ and/or FA) ($N = 3$; $n = 2$). Results are expressed as mean ± SEM. Statistical differences are indicated: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn's test). The scale of the photos is ×200 magnification. (**B**) Zeb1 is required for promigratory effect of TGFβ. siRNA-transfected cells (siCtrl, siZeb1) were treated for 48 h with TGFβ (10 ng/mL) and then used for transwell migration assay performed for 24 h (in the presence of TGFβ) ($N = 3$; $n = 2$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn's test) (**C**) Effects of inhibition of Zeb1 expression on epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers. siRNA-transfected DU145 cells (siCtrl, siZeb1) were treated or not for 48 h with TGFβ (10 ng/mL). qPCR results (mean ± SEM) are expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$. ($N = 3$; $n = 3$). Statistical differences are indicated: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn's test).

As observed in Figure 2A, TGFβ treatment increased the expression of Zeb1 by 1.7-fold. This effect was abrogated in LA and EPA-supplemented cells, but not after supplementation by PA. In addition, LA inhibited TGFβ-induced N-cadherin and MMP9 expression, whereas EPA treatment affected only N-cadherin mRNA levels (Figure 2B). By contrast, FA had no effect on the expression of other EMT transcription factors such as Snail and Slug (Figure 2C). All FA tested had no effect on basal Zeb1 expression (without TGFβ treatment) (Figure S2). Figure 2D shows representative images of Zeb1 and E-Cadherin protein expression by immunohistochemistry in the DU145 cells. LA supplementation strongly decreased TGFβ-induced Zeb1 staining in cancer cells. The decrease in E-cadherin expression induced by TGFβ was clearly reversed by LA.

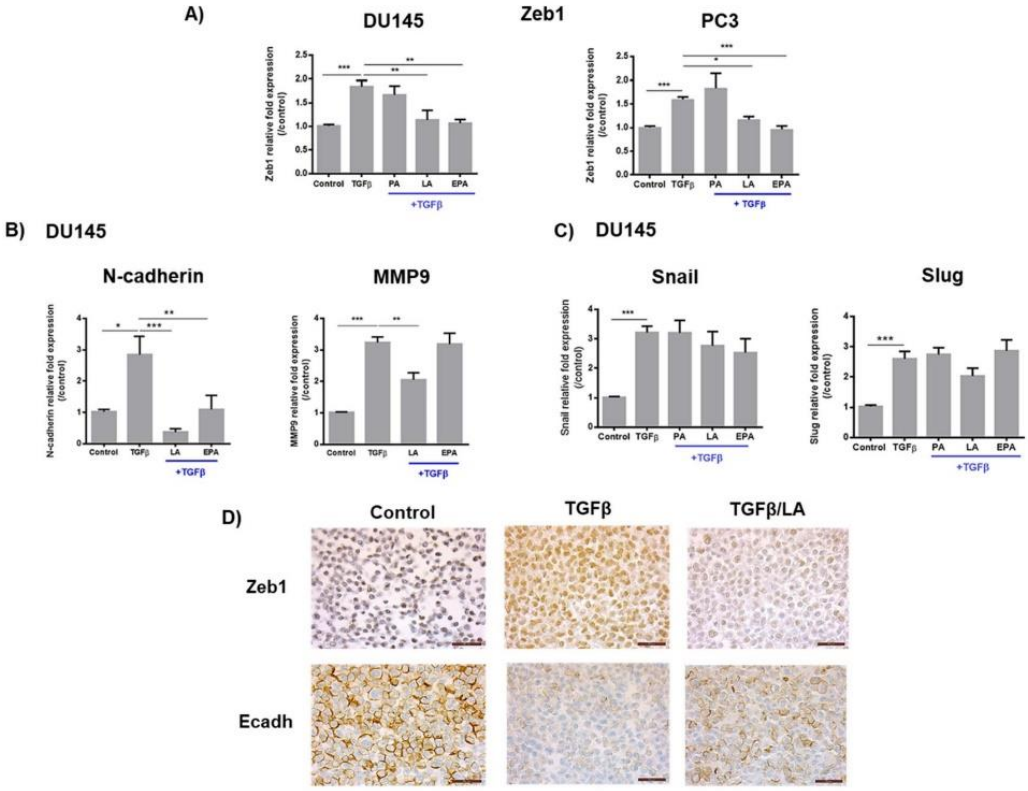


Figure 2. LA and EPA inhibit the TGFβ-induced Zeb1 and its target genes expression. (**A**–**C**) Zeb1, N-cadherin, MMP9, Snail, and Slug mRNA levels in the prostate cancer (PCa) cell line. Cells were treated for 48 h by TGFβ (10 ng/mL) ± FA (LA, EPA, AP) (20 µM). qPCR results (mean ± SEM) are expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$. ($N = 3$; $n = 3$). Statistical differences are indicated: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn's test). (**D**) Zeb1 and Ecadherin protein expression in DU145 PCa cells. Treatment with TGFβ (10 ng/mL) increased Zeb1 expression (from 30% to 100% positive cells) and decreased Ecadherin staining (from 90% to 25% positive cells). Addition of LA (60 µM) for 48 h led to decrease Zeb1 (40%) and to increase Ecadherin expression (70%), compared to TGFβ treatment alone ($N = 3$). Scale bars = 50 µm.

2.2. LA and EPA Inhibit SK3 Expression Induced by TGFβ, and SK3 is Dependent on Zeb1 Expression

We investigated whether SK3 channel could also be regulated by TGFβ and FA in PCa cell lines. As observed in Figure 3A, TGFβ increased the expression of the SK3 channel by ~2-fold. This effect was strongly reduced after incubation with LA and EPA. In contrast, FA supplementation had no effect on the expression of Ca^{2+} channels TRPC1, STIM1, Orai1, and Orai3 induced by TGFβ (Figure S3). No effect on SK3 basal expression was observed in the presence of FA (Figure S4).

We then investigated whether PCa cell migration induced by TGFβ is dependent on SK3. As observed in Figure 3B, suppression of SK3 strongly reduced the promigratory effect of TGFβ, indicating that SK3 is also a regulator of PCa cell migration. Similar results were obtained with a specific pharmacological inhibitor of SK3 (Ohmline, [14]).

To analyze the relationship between Zeb1 and SK3, we first used siZeb1-transfected cells. We observed that the suppression of Zeb1 expression reduced SK3 levels, and that TGFβ failed to induce SK3 expression in siZeb1-transfected cells. These data suggest that the induction of SK3 expression by TGFβ requires the presence of Zeb1 (Figure 3C). To determine whether SK3 is a target gene of Zeb1, we monitored gene transcription from a *KCNN3* (encoding SK3 channel) promoter–luciferase reporter constructs in PC3-transfected with the pCIneo-Zeb1 plasmid, which allows constitutive transcription of *Zeb1*. As predicted, overexpression of Zeb1 increased *KCNN3* promoter activity

(by 3-fold) (Figure 3D). These results showed for the first time that the transcription factor Zeb1 promotes the expression of the SK3 channel. Interestingly, SK3 extinction decreased Zeb1 expression, suggesting a positive feedback loop (Figure 3E).

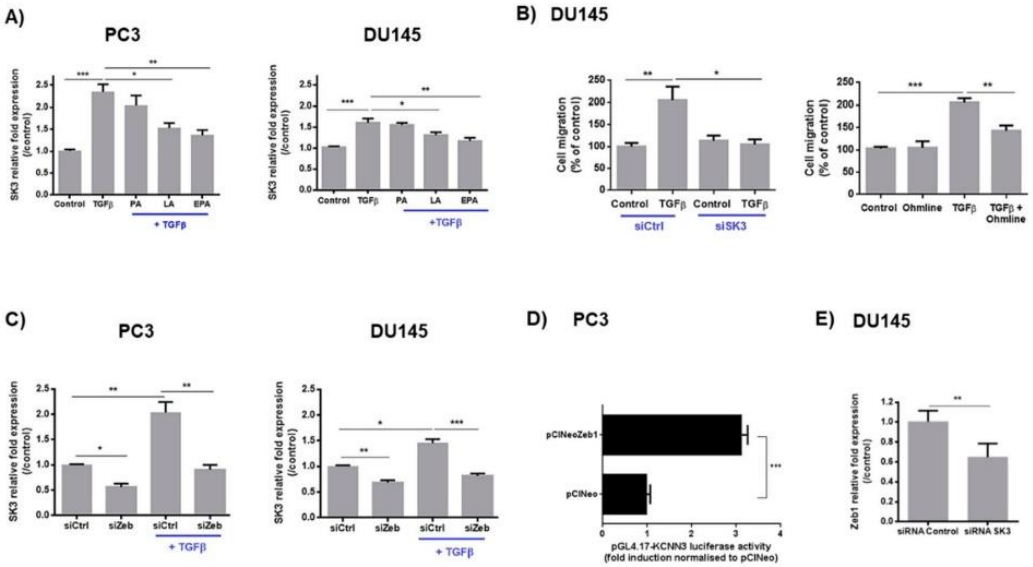


Figure 3. LA and EPA inhibit SK3 expression induced by TGFβ, and SK3 is dependent on Zeb1 expression. (**A**) LA and EPA inhibit TGFβ-induced SK3 mRNA level in PCa cells. Cells were treated for 48 h by TGFβ (10 ng/mL) ± FA (LA, EPA, AP) (20 μM). (N = 3; n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn's test) (**B**) SK3 is required for promigratory effect of TGFβ. siRNA-transfected (siCtrl, siSK3) and cells treated with TGFβ (10 ng/mL) ± Ohmline (1 μM) for 48 h were used for transwell migration assay performed for 24 h (in the presence of TGFβ) (N = 3; n = 2). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn's test) (**C**) Zeb1 regulates SK3 channel expression. SK3 mRNA levels in siCtrl and siZeb1-transfected cells and treated by TGFβ (10 ng/mL) for 48 h (qPCR analysis were performed 48 h post-transfection). Results are expressed as mean ± SEM. (N = 3; n = 3). Statistical differences are indicated: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn's test). (**D**) Overexpression of Zeb1 enhanced *KCNN3* gene transcription. PC3 cells were cotransfected with pGL4.17-KCNN3, pRL-TK, and pCIneo (control condition) or pCIneoZeb1. Dual-luciferase reporter assays were performed 72 h after transfection. Results are normalized to control conditions and expressed as mean ± SEM. Statistical differences are indicated: *** $p < 0.001$ (t-test one way ANOVA). (N = 3). (**E**) SK3 regulates Zeb1 channel expression. Zeb1 mRNA levels in siCtrl and siSK3- transfected-cells (qPCR analysis were performed 48 h post-transfection). Results are expressed as mean ± SEM. (N = 3; n = 3). Statistical differences are indicated: ** $p < 0.01$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn's test).

2.3. Ca^{2+} Entry Is Required for the Upregulation of Zeb1 Expression and Is Inhibited by LA and EPA In Vitro and Ex Vivo

Several studies have shown that EMT inducers may cause a transient increase in cytosolic Ca^{2+} concentration [10,18]. Figure 4A shows that Zeb1 upregulation by TGFβ was inhibited by either Ohmline (SK3 inhibitor) or the Ca^{2+} channel inhibitors GSK7975A and Synta66 (inhibitors of TRP and Orai channels, respectively). Ca^{2+} channel inhibitors had no effect on Zeb1 basal expression (Figure S5). As predicted, treatment with TGFβ increased the amplitude of SOCE. This effect was dramatically inhibited by LA and EPA, but not by PA (Figure 4B). A similar effect was obtained with Ohmline. This finding demonstrates that the TGFβ-induced SOCE is regulated by the SK3 channel.

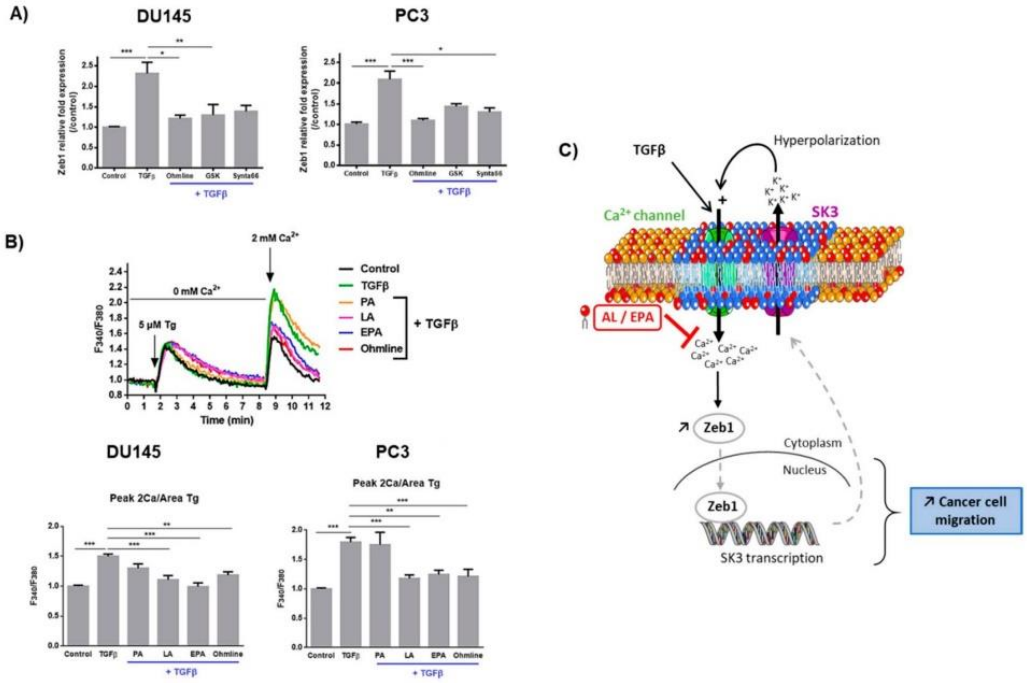


Figure 4. Ca^{2+} entry is required for TGFβ-induced Zeb1 expression, and TGFβ-induced SOCE is inhibited by LA and EPA. (**A**) Zeb1 expression is inhibited by an SK3 channel inhibitor and Ca^{2+} channel inhibitors. PCa cells were treated with TGFβ (10 ng/mL) ± GSK7975A (GSK in the figure), Synta66, or Ohmline (1 µM) for 48 h. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical differences are indicated: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn). ($N = 3$; $n = 3$). (**B**) TGFβ-induced SOCE is inhibited by LA, EPA, and Ohmline. Fluorescence measurements and relative fluorescence of Ca^{2+} entry after intracellular Ca^{2+} store depletion by thapsigargin (Tg) in PCa cells pretreated for 48 h by Ohmline (1 µM), TGFβ (10 ng/mL), FA (20 µM). Histograms showing relative fluorescence of Ca^{2+} variations. ($N = 3$; $n = 3$). Statistical differences are indicated: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Kruskal–Wallis; post-test: Dunn's test). Results are expressed as mean ± SEM. (**C**) Proposed model for a positive feedback loop leading to PCa cellular migration, and inhibited by LA and EPA: (1) TGFβ increases calcium entry in PCa cells. (2) This calcium influx promotes expression of the transcription factor Zeb1 that targets the SK3 channel gene. (3) At the plasma membrane, the SK3 channel allows an increase in calcium entry by hyperpolarization of the plasma membrane. By incorporating into the membrane, LA and EPA inhibit this signaling pathway induced by TGFβ. These FA inhibit calcium entry, Zeb1, and SK3 expression and PCa cell migration.

We next investigated whether these findings could also be observed in clinical samples. We previously developed a method to measure variations of intracellular Ca^{2+} dynamics in human prostate slices [19]. As observed in Figure 5, exposure of PCa slices to supraphysiological extracellular Ca^{2+} concentrations (from 2 to 5 mM) induced a robust and rapid increase of intracellular Ca^{2+} concentrations, which was followed by a plateau phase (curve control). As already observed in our previous study [19], Ca^{2+} entry was increased in tumor compared to nontumor prostate slices. Interestingly, PCa slices supplemented with LA and EPA exhibited a reduced responsiveness to extracellular Ca^{2+} variations to a level close to that observed in nontumor tissues. Accordingly, the increase of intracellular Ca^{2+} concentration was of a reduced amplitude in LA- and EPA-treated slices ($p = 0.019$ and 0.039, respectively; $N = 9$ for each condition) compared to vehicle alone-treated slices. In PA-treated slices, no significant change in Ca^{2+} entry was observed ($p = 0.43$, $N = 9$) (Figure 5). Figure 5B shows representative images of Zeb1 protein expression determined by immunohistochemistry in PCa slices treated with FA. In contrast to PA, LA and EPA supplementation strongly decreased Zeb1 staining.

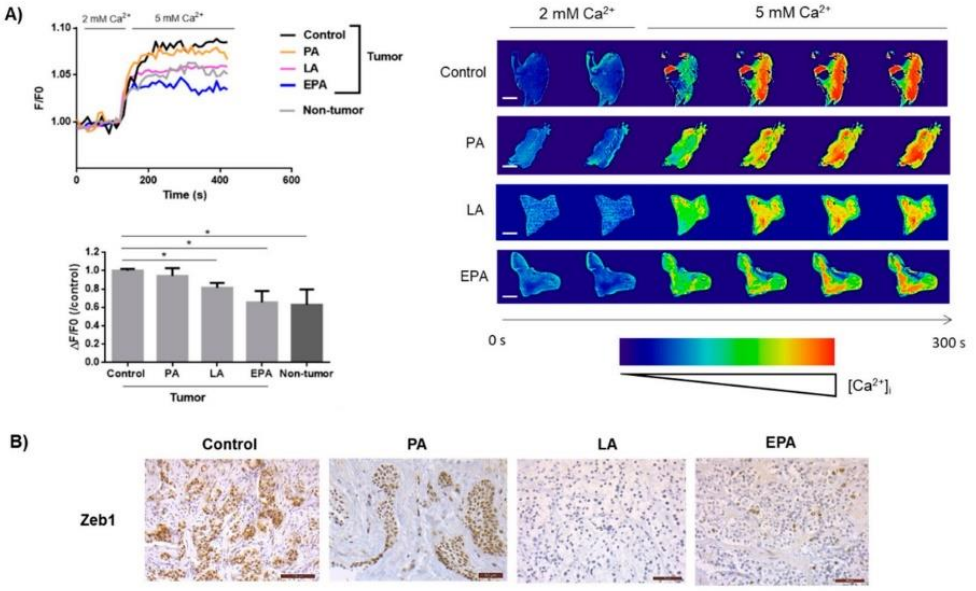


Figure 5. LA and EPA reduces Ca^{2+} entry in human PCa slices. (**A**) Human PCa slices (N = 9) and nontumor prostate slices (N = 4) were obtained from 11 patients, and were treated or not for 48 h by FA (60 µM). Slices were incubated with Rhod-2-AM in 2 mM $CaCl_2$ PSS. After a stabilization period, $CaCl_2$ was added to the bath to reach a final concentration of 5 mM Ca^{2+}. Analyses were performed with ImageJ 1.52a analysis software. The Ca^{2+} fluorescence traces were expressed as F/F0 (F0: basal fluorescence signal obtained in 2mM Ca^{2+}). Rate of real-time fluorescence images represented is 0.2 Hz. Scale bars = 2 mm. Diagrams represent the variations of Ca^{2+} signal expressed by ΔF/F0 (ΔF: maximal (5 mM Ca^{2+}) − basal fluorescence (2 mM Ca^{2+})). Statistical differences are indicated: * $p < 0.05$ (Wilcoxon test). Results are expressed as mean ± SEM. (**B**) Organotypic cultures of human PCa slices with initial Zeb1 expression were obtained from 3 patients, and were treated with PA, LA and EPA (60 µM) for 48 h. When compared to control (almost 100% positive cells), Zeb1 expression remained identical after PA treatment, whereas both LA and EPA treatment led to decrease Zeb1 staining, with, respectively, no and 10% positive cells.

3. Discussion

Expression levels of the key EMT transcription factor Zeb1 is increased with the stages of PCa progression, and is at its highest level in metastases. This factor has a major impact on patients' survival [7]. We showed that Zeb1 is an important mediator of TGFβ-induced PCa cell migration. However, little is known regarding the key signal transduction pathways that serve as cytosolic connections between cell surface receptors and EMT nuclear transcription factors. Several studies have recently shown a transient increase in cytosolic Ca^{2+} concentrations mediated by major EMT inducers such as hypoxia, EGF [18], TGFβ [10,20,21], or androgens [22]. In the present study, we provide evidence that Zeb1 expression after EMT induction occurs following an increase in intracellular Ca^{2+} concentration.

Several studies have reported a modulation of Ca^{2+} channel expression as a consequence of EMT induction in cancer cells [9]. We report for the first time that expression of the SK3 channel is increased by EMT inducers such as TGFβ. We show that TGFβ-induced SK3 expression required the presence of Zeb1, which suggests that *KCNN3* (SK3 encoding gene) could be a target gene for Zeb1. Experiments on promoter activity demonstrated a transcriptional control of the SK3 channel gene by Zeb1. This finding is novel, as, up until now, little was known about the transcriptional regulation of the SK3 channel gene. Previous studies had shown a regulation by members of the Sp transcription factor family and estrogens [23]. Taken together and as summarized on Figure 4C, our results suggest

a positive feedback loop between Zeb1 and the SK3 channel in a pathway that leads to increased Ca^{2+} entry that promotes PCa cell migration.

TGFβ can act as both activator and repressor of prostate cancer progression. TGFβ exerts a tumor suppressor role at the early stages. However, during tumor progression, TGFβ is involved in migration and invasion processes via the activation of EMT, which is involved in tumor progression and metastases [24,25]. In this study, we used TGFβ as an EMT inducer. As observed in the results section, TGFβ strongly induces the expression of EMT transcription factors (Zeb1, Snail, and Slug) and mesenchymal markers such as N-cadherin and metalloproteinase-9 (MMP-9) (Figure 2). These markers represent hallmark of the acquisition of an aggressive tumor phenotype. When Zeb1 is inactivated, we observed a decrease in mesenchymal marker and an increase of epithelial marker levels. These data show that Zeb1 is involved in the promoter effects of TGFβ. Among transcription factors, Snail is an important driver of EMT [5,26]. A strong induction of Snail by TGFβ was observed in PCa cells, but its expression was not regulated by LA and EPA. In a previous study, we have demonstrated that Zeb1 expression in human PCa tissues increased with disease progression from localized (pT2) to locally advanced (pT3) tumors and metastases [7]. In contrast, we did not observe any difference in Snail expression during tumor progression.

The present in vitro and ex vivo results suggest that LA and EPA exert their "anticancer" effects by reducing Ca^{2+} entry involved in Zeb1 regulation. This finding is crucial as *SK3* is a target gene of Zeb1. Indeed, we reported in a previous study a pivotal role for the SK3 channel in human cancer cell migration and bone metastases [14]. The mechanism by which LA and EPA inhibit SOCE remains to be determined. We hypothesize that these FA, through their incorporation into the plasma membrane, could disrupt lipid raft SK3- Ca^{2+} channels complexes, and this disruption may lead to decreased SK3-dependent Ca^{2+} entry and cell migration.

No clinical trial has reported the use of FA as adjuvant treatment in PCa. We have previously showed that, by analyzing FA profile of periprostatic adipose tissue (PPAT) obtained from PCa patients, the least aggressive tumors were those with the highest levels of LA and EPA [4]. FA concentrations used in the present study are consistent with those observed in PPAT. A clinical trial with n-3 FA dietary supplementation of metastatic breast cancer patients has reported that FA administration during chemotherapy was well-tolerated and safe, with an even slightly lower toxicity of the chemotherapy with respect to anemia and thrombopenia compared to control patients [27]. This observation is in agreement with our previous results obtained in experimental animal models in which we showed no significant difference in blood composition and animal weight in the group treated by a mix of n-3 FA [28]. Nutritional supplementation with LA of rodents does not have any toxic effect but have rather beneficial cardiovascular effects [29]. In human prospective observational studies, dietary LA intake is inversely associated with coronary heart disease risk in a dose-dependent manner [30]. Among n-6 FA, the effect of arachidonic acid (AA) is better documented, as AA and its related bioactive inflammatory mediators are rather considered as cancer promoters [31]. In the present study, we did not observe a rise in AA in membrane phospholipids from PCa cells after LA treatment. In addition, no difference in AA content was observed in human PPAT according to the LA level [4].

As animal models do not perfectly reproduce the clinical situations of PCa, we developed ex vivo tissue cultures of human PCa slices, which preserve both tumor microenvironment and cancer cell heterogeneity. We reported that this model reproduces the characteristics of human PCa, including its sensitivity to androgen deprivation and response to hypoxia and extracellular Ca^{2+} [19]. In our previous work, we compared intracellular Ca^{2+} concentrations between tumor and adjacent nontumor prostate slices and reported increased intracellular Ca^{2+} concentrations in malignant compared to benign tissues (about 20% increase). We also found greater intracellular Ca^{2+} concentrations in tissues sample obtained from aggressive PCa compared to indolent tumors. This finding suggested that Ca^{2+} entry may contribute to cancer progression [19]. Importantly, there is extensive evidence suggesting an important role for Ca^{2+} during tumorigenesis and cancer progression [32]. In the present study, we have demonstrated that LA and EPA can reduce Ca^{2+} entry not only in vitro, but also ex vivo,

in human PCa slices. As these FA may reduce PCa aggressiveness through "normalization" of Ca^{2+} entry in cancer cells, they could therefore be used for therapeutic applications.

4. Materials and Methods

4.1. Human Tissue Slices

Prostatic tissue samples were obtained from 14 patients undergoing radical prostatectomy for PCa. The characteristics of patients and tissues are summarized in Table 1. Written informed consent was obtained from patients in accordance with the requirements of the medical ethic committee of our institute (ethic code DC-2014-2045). Immediately after surgery, 4–5 mm samples were dissected aseptically and cut with a vibratome into 6–10 slices per sample, as previously described [19]. Slices were incubated with DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin–streptomycin, 1 nM dihydrotestosterone, and placed in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO_2. Slices were incubated in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO_2, and treated or not with fatty acids, LA, EPA, and PA (60 µM) for 48 h. Slices were used for either ex vivo culture and immunohistochemistry (3 patients) or for ex vivo culture and intracellular Ca^{2+} measurements (11 patients).

Table 1. Characteristics of patients and tissues.

Age (y), Median (Range)		**63 (51–75)**
PSA (ng/mL), Median (Range)		**7.2 (4.5–35)**
pTNM stage	**pT3**	n = 7
	pT2	n = 7
ISUP score	1	n = 1
	2	n = 4
	3	n = 5
	4	n = 2
	5	n = 2

4.1.1. Immunohistochemistry

Tissue slices or cells were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and cut in serial 3 µm sections. One section was stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES), and the other sections were deparaffinized, rehydrated, and heated in citrate buffer pH 6 for antigenic retrieval. After blocking for endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide, Zeb1 primary antibody (Abnova, Taoyuan Taiwan, dilution 1/500) was incubated 1 h. Immunohistochemistry was then performed using the streptavidin–biotin–peroxydase method with diaminobenzidine (DAB) as the chromogen (Kit LSAB, Dakocytomation, Glostrup, Denmark). Slides were finally counterstained with haematoxylin. Positive staining was expressed as a percentage of total cancer cells.

4.1.2. Ex Vivo Intracellular Ca^{2+} Measurements

Intracellular calcium variations were assessed with rhod-2 calcium-sensitive dye. Briefly, human prostate slices were incubated for 30 min with 5 µM of Rhod-2 AM (at room temperature). Then, slices were washed for 20 min with a physiological saline solution (PSS) before experiments. The PSS had the following composition (in mM); NaCl 140, $MgCl_2$ 2, KCl 4, D-glucose 11.1, HEPES 10, and $CaCl_2$ 2, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The dye was excited at 545 ± 20 nm with LED illumination (CoolLED pE-300 white) and fluorescence was collected at 605 ± 40 nm with a sCMOS Zyla 4.2 PLUS camera and a Macro Zoom System Microscope MVX10. Image acquisition rate was 0.1 Hz, and exposure time was 600 ms. For measurement, human prostate samples were incubated in 2 mM $CaCl_2$ PSS. After a stabilizing time (~100 s), $CaCl_2$ was added to the bath to reach a final concentration of 5 mM Ca^{2+}. Analyses were performed with ImageJ Software. The Ca^{2+} fluorescence signal was normalized

by the initial fluorescence signal obtained in the 2 mM (CaCl) to correct differences of dye loading across the preparation, and then the variations of the Ca^{2+} signal was determined by calculating the difference between the basal, at 2 mM $CaCl_2$, and the maximal Ca^{2+} fluorescence value after 5 mM $CaCl_2$ application.

4.2. Cell Lines and Products

Human PCa DU145 (HTB-81) and PC3 (CRL-1435) cell lines was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and was received on 2016/2018. This cell line has been tested and authenticated by DNA fingerprinting by the ATCC. After reception, cells were amplified in order to make a large reserve of cryopreserved cells. Every 3 months, a new cryopreserved bulb was thawed and used for this study. DU145 and PC3 cell lines were grown in RPMI medium (BE12-702F, Lonza, Levallois-Perret, France), supplemented with 5% FBS (CVFSVF0001, Eurobio, Les Ulis, France) and 1% (v/v) penicillin–streptomycin in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO_2. All experiments were performed with mycoplasma-free cells. DU145 and PC3 PCa cell lines have been chosen for their high migration capacity.

LA (L1876), EPA (17266), palmitic acid (PA) (P5177), and TGFβ1 (H8541) were from Sigma-Aldrich. GSK7975A (GLXC03243) and Synta66 (GLXC03244) were from GLXX Lab IMC. 1-Ohexadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-lactose (Ohmline) was synthetized as previously described [33].

4.3. Cytosolic Ca^{2+} Measurements in Cell Lines

Cytosolic Ca^{2+} concentrations were studied using the ratiometric fluorescent dye Fura-2-AM (Molecular Probes) (1 h, 5 μM). For SOCE measurement, free-Ca^{2+} PSS (composition in Supplementary Methods) was added and, after a stabilizing time (around 100 s), cells were treated with thapsigargin (Tg 5 μM). After total endoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion (~500 s), PSS with 2 mM $CaCl_2$ (2Ca), was added. Fluorescence emission was measured at 510 nm with an excitation light at 340 and 380 nm. Analyses were performed using the SoftMax Pro Software. Results were expressed by the value at the peak 2Ca normalized by the value of the area of the Ca^{2+} Tg responses.

4.4. Reporter Gene Constructs and Luciferase Assay

KCNN3 promoter sequence has been delineated following publication of Sun et al. that described limits of functional promoter (2540 bp) [34]. Transfection was performed with TransIT-2020 reagent (Mirus, Madison, WI, USA), 10ng of pRL-TK (Promega Madison, WI, USA), 50ng of pGL4.17-KCNN3, and 100ng of pCIneo-ZEB1 or pCIneo vector control (kindly provided by Marc Stemmler, Alexander University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany). Cells were lysed 72 h after transfection with passive lysis buffer (Promega) and reporter assays were measured with Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega).

4.5. Migration Assays

Transwell assays were performed in cell culture inserts with 8μm pore size (353097, Falcon, France). Migrated cells to the bottom side were fixed, stained, and automatically counted. Wound healing was performed with a sterile 2-mm-wide tip on confluent cells. Phase-contrast images were performed on a Nikon microscope coupled to a Nikon camera (DS Qi2). The system included a cage incubator (Okolab, Pozzuoli, Italy) that controlled temperature and levels of CO_2 and O_2. Analyses were performed using the NIS Element AR software. Results were analyzed by measuring the area of the injured area to 0 h and 48 h after injury. Values were plotted as the percentage of wound closure.

4.6. siRNA Assays

Cells seeded at a density of 250,000 cells/well were incubated with a mix of siRNA and PepMute (SL100566, TebuBio, Le Perray-en-Yvelines, France) in medium for 6h. SiRNA used in this study have

been validated in previous reports and are available in Supplementary Data [35,36]. Experiments were performed 48 h after transfection.

4.7. Quantitative Real-Time PCR.

Total RNAs from cultured cells were extracted using the Nucleopsin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). RNA was reverse-transcribed with an RT kit (PrimeScriptTM RT Reagent, Perfect Real-time, Takara, Saint Germain en Laye, France). mRNA levels were quantified using LightCycler 480 (Roche Applied Science, Meylan, France). For each reaction, SYBR Green mix (RR420L, Takara) was mixed with specific primers (0.5 μM, Supplementary Methods) and cDNA at 50 ng/μL. Relative levels of mRNA were calculated according to the ΔΔCT method relative to the housekeeping gene HPRT and Cyclophilin A.

4.8. Western-Blot

Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris (pH 7.4), 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, and 10% glycerol) with phosphatase inhibitors (P2714, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) and protease inhibitors (Thermo Scientific, Illkirch, France). Protein concentration was determined by BCA protein assay kit (23225, Thermo Scientific). Proteins were separated by denaturating SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (IPVH00010, Millipore, Molsheim, France). Primary antibodies were incubated overnight. The antibodies used were rabbit anti-Zeb1 (3396P; Ozyme, Saint Cyr l'Ecole, France), mouse anti-Ecadherin (5296S, Ozyme), and goat anti-β-adaptin (sc 6425, Santa Cruz, Dallas, TX, USA). Antibody binding was revealed with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit, anti-mouse, and anti-goat antibodies (Santa Cruz). The bands were detected with the Amersham ECL SelectTM Western Blotting Detection Reagent kit (RPN 2235, GE Healthcare, Sigma, St. Quentin Fallavier, France), visualized with a CDD camera (DNR Bio-imaging Systems MF-ChemiBis 3.2.) and quantified using Multi Gauge software.

4.9. Statistics

Analyses were made using the Mann–Whitney test and Kruskal–Wallis one-way ANOVA, followed by Dunn's test and the nonparametric Wilcoxon (as indicated in figure legends).

5. Conclusions

The present study identified in PCa a signaling pathway leading to Zeb1 and SK3 induction through increased Ca^{2+} entry, and this pathway is associated with increased disease aggressiveness. Several steps of this process are strongly inhibited by LA and EPA supplementation. This observation underlines the therapeutic potential of these PUFAs as adjuvant for cancer treatments.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2072-6694/11/11/1814/s1. Table S1: Ca^{2+}-free PSS composition; Table S2: siRNA sequences; Table S3: qPCR Primers; Figure S1: Effect of fatty acids on basal migration; Figure S2: Effect of fatty acids on basal Zeb1 expression; Figure S3: Effect of LA on the expression of TRPC1, STIM1, Orai1, and Orai3; Figure S4: Effect of fatty acids on basal SK3 expression; and Figure S5: Effect of Ca^{2+} channel inhibitors on Zeb1 basal expression.

Author Contributions: Designed research, K.M., G.F., and C.V.; performed most of the experiments, S.F. and F.B. (Fanny Bery); performed the luciferase reporter assays with KCNNN3 and Zeb1 plasmids, A.C.; performed and analyzed immunohistochemical experiments, R.G. and G.F.; supervised all the pathology experiments performance, G.F.; provided human tissues and clinical data, F.B. (Franck Bruyère); helped to carry out the ex vivo experiments and validation of calcium signaling by fluorescence imaging on prostate slices, C.P., V.M., and M.P.-C.; helped for cell culture, I.D.; helped to carry out the cytosolic Ca^{2+} concentration measurements in prostate cell lines, C.V., M.P.-C., and D.F.; wrote the paper, K.M., G.F., and S.F.; read and approved the manuscript, S.F., F.B. (Fanny Bery), A.C., D.F., C.P., V.M., I.D., R.G., and F.B. (Franck Bruyère), Ma.P.-C., C.V., G.F., and K.M.

Funding: This work was supported by grants from the Region Centre, Ligue Nationale contre le Cancer comités 37, 49, 56, and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Cancéropôle Grand Ouest. Sandy Figiel was the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition
EPA	Eicosapentaenoic acid
FA	Fatty acid
LA	Linoleic acid
PA	Palmitic acid
AA	Arachidonic acid
PPAT	Periprostatic adipose tissue
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
PCa	Prostate cancer
SOCE	Store-operated Ca^{2+} entry

References

1. Damber, J.-E.; Aus, G. Prostate cancer. *Lancet* **2008**, *371*, 1710–1721. [CrossRef]
2. Finley, D.S.; Calvert, V.S.; Inokuchi, J.; Lau, A.; Narula, N.; Petricoin, E.F.; Zaldivar, F.; Santos, R.; Tyson, D.R.; Ornstein, D.K. Periprostatic adipose tissue as a modulator of prostate cancer aggressiveness. *J. Urol.* **2009**, *182*, 1621–1627. [CrossRef] [PubMed]
3. Laurent, V.; Guérard, A.; Mazerolles, C.; Le Gonidec, S.; Toulet, A.; Nieto, L.; Zaidi, F.; Majed, B.; Garandeau, D.; Socrier, Y.; et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10230. [CrossRef] [PubMed]
4. Figiel, S.; Pinault, M.; Domingo, I.; Guimaraes, C.; Guibon, R.; Besson, P.; Tavernier, E.; Blanchet, P.; Multigner, L.; Bruyère, F.; et al. Fatty acid profile in peri-prostatic adipose tissue and prostate cancer aggressiveness in African-Caribbean and Caucasian patients. *Eur. J. Cancer* **2018**, *91*, 107–115. [CrossRef]
5. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–196. [CrossRef]
6. Graham, T.R.; Zhau, H.E.; Odero-Marah, V.A.; Osunkoya, A.O.; Kimbro, K.S.; Tighiouart, M.; Liu, T.; Simons, J.W.; O'Regan, R.M. Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2479–2488. [CrossRef]
7. Figiel, S.; Vasseur, C.; Bruyere, F.; Rozet, F.; Maheo, K.; Fromont, G. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. *Hum. Pathol.* **2017**, *61*, 26–32. [CrossRef]
8. Monteith, G.R.; Prevarskaya, N.; Roberts-Thomson, S.J. The calcium-cancer signalling nexus. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 367–380. [CrossRef]
9. Azimi, I.; Monteith, G.R. Plasma membrane ion channels and epithelial to mesenchymal transition in cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* **2016**, *23*, R517–R525. [CrossRef]
10. Schaar, A.; Sukumaran, P.; Sun, Y.; Dhasarathy, A.; Singh, B.B. TRPC1-STIM1 activation modulates transforming growth factor β-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget* **2016**, *7*, 80554–80567. [CrossRef]
11. Shapovalov, G.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. Calcium channels and prostate cancer. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2013**, *8*, 18–26. [CrossRef] [PubMed]
12. Prevarskaya, N.; Skryma, R.; Shuba, Y. Calcium in tumour metastasis: New roles for known actors. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 609–618. [CrossRef] [PubMed]
13. Guéguinou, M.; Harnois, T.; Crottes, D.; Uguen, A.; Deliot, N.; Gambade, A.; Chantôme, A.; Haelters, J.P.; Jaffrès, P.A.; Jourdan, M.L.; et al. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: A novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline. *Oncotarget* **2016**, *7*, 36168–36184. [CrossRef] [PubMed]

14. Chantôme, A.; Potier-Cartereau, M.; Clarysse, L.; Fromont, G.; Marionneau-Lambot, S.; Guéguinou, M.; Pagès, J.-C.; Collin, C.; Oullier, T.; Girault, A.; et al. Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4852–4861. [CrossRef]
15. Mozaffarian, D.; Wu, J.H.Y. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *58*, 2047–2067. [CrossRef]
16. Endo, J.; Arita, M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Cardiol.* **2016**, *67*, 22–27. [CrossRef]
17. Elinder, F.; Liin, S.I. Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 43. [CrossRef]
18. Davis, F.M.; Azimi, I.; Faville, R.A.; Peters, A.A.; Jalink, K.; Putney, J.W.; Goodhill, G.J.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* **2014**, *33*, 2307–2316. [CrossRef]
19. Figiel, S.; Pasqualin, C.; Bery, F.; Maupoil, V.; Vandier, C.; Potier-Cartereau, M.; Domingo, I.; Guibon, R.; Bruyere, F.; Maheo, K.; et al. Functional Organotypic Cultures of Prostate Tissues: A Relevant Preclinical Model that Preserves Hypoxia Sensitivity and Calcium Signaling. *Am. J. Pathol.* **2019**, *189*, 1268–1275. [CrossRef]
20. Cheng, H.; Wang, S.; Feng, R. STIM1 plays an important role in TGF-β-induced suppression of breast cancer cell proliferation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 16866–16878. [CrossRef]
21. Mahdi, S.H.A.; Cheng, H.; Li, J.; Feng, R. The effect of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition on the expression of intracellular calcium-handling proteins in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *583*, 18–26. [CrossRef] [PubMed]
22. Asuthkar, S.; Velpula, K.K.; Elustondo, P.A.; Demirkhanyan, L.; Zakharian, E. TRPM8 channel as a novel molecular target in androgen-regulated prostate cancer cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 17221–17236. [CrossRef] [PubMed]
23. Pierce, S.L.; England, S.K. SK3 channel expression during pregnancy is regulated through estrogen and Sp factor-mediated transcriptional control of the KCNN3 gene. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *299*, E640–E646. [CrossRef] [PubMed]
24. Massagué, J. TGFbeta in Cancer. *Cell* **2008**, *134*, 215–230. [CrossRef]
25. Ikushima, H.; Miyazono, K. TGFbeta signalling: A complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 415–424. [CrossRef]
26. Gudey, S.K.; Sundar, R.; Heldin, C.-H.; Bergh, A.; Landström, M. Pro-invasive properties of Snail1 are regulated by sumoylation in response to TGFβ stimulation in cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 97703–97726. [CrossRef]
27. Bougnoux, P.; Hajjaji, N.; Ferrasson, M.N.; Giraudeau, B.; Couet, C.; Le Floch, O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 1978–1985. [CrossRef]
28. Kornfeld, S.; Goupille, C.; Vibet, S.; Chevalier, S.; Pinet, A.; Lebeau, J.; Tranquart, F.; Bougnoux, P.; Martel, E.; Maurin, A.; et al. Reducing endothelial NOS activation and interstitial fluid pressure with n-3 PUFA offset tumor chemoresistance. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 260–267. [CrossRef]
29. Mulligan, C.M.; Sparagna, G.C.; Le, C.H.; De Mooy, A.B.; Routh, M.A.; Holmes, M.G.; Hickson-Bick, D.L.; Zarini, S.; Murphy, R.C.; Xu, F.Y.; et al. Dietary linoleate preserves cardiolipin and attenuates mitochondrial dysfunction in the failing rat heart. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *94*, 460–468. [CrossRef]
30. Farvid, M.S.; Ding, M.; Pan, A.; Sun, Q.; Chiuve, S.E.; Steffen, L.M.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Dietary linoleic acid and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation* **2014**, *130*, 1568–1578. [CrossRef]
31. Wang, D.; Dubois, R.N. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 181–193. [CrossRef] [PubMed]
32. Stewart, T.A.; Yapa, K.T.D.S.; Monteith, G.R. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 2502–2511. [CrossRef] [PubMed]
33. Girault, A.; Haelters, J.-P.; Potier-Cartereau, M.; Chantome, A.; Pinault, M.; Marionneau-Lambot, S.; Oullier, T.; Simon, G.; Couthon-Gourvès, H.; Jaffrès, P.-A.; et al. New alkyl-lipid blockers of SK3 channels reduce cancer cell migration and occurrence of metastasis. *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 1111–1125. [CrossRef] [PubMed]

34. Sun, G.; Tomita, H.; Shakkottai, V.G.; Gargus, J.J. Genomic organization and promoter analysis of human KCNN3 gene. *J. Hum. Genet.* **2001**, *46*, 463–470. [CrossRef] [PubMed]
35. Potier, M.; Joulin, V.; Roger, S.; Besson, P.; Jourdan, M.-L.; Leguennec, J.-Y.; Bougnoux, P.; Vandier, C. Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2946–2953. [CrossRef] [PubMed]
36. Lacher, M.D.; Shiina, M.; Chang, P.; Keller, D.; Tiirikainen, M.I.; Korn, W.M. ZEB1 limits adenoviral infectability by transcriptionally repressing the coxsackie virus and adenovirus receptor. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 91. [CrossRef] [PubMed]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Références bibliographiques

1. Costello L, Franklin R. Prostatic fluid electrolyte composition for the screening of prostate cancer: a potential solution to a major problem. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2009;12(1):17-24.

2. Dubé J, Tremblay R. Rôle des enzymes protéolytiques du sperme dans la fertilité masculine. Med Sci (Paris). 1988;4(2):96.

3. Kaprara A, Huhtaniemi IT. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. Metab Clin Exp. 2018;86:3-17.

4. Tilbrook AJ, Clarke IJ. Negative feedback regulation of the secretion and actions of GnRH in male ruminants. J Reprod Fertil Suppl. 1995;49:297-306.

5. Schreyer E, Barthélémy P, Cottard F, Ould Madi-Berthélémy P, Schaff-Wendling F, Kurtz J-E, et al. Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate. Med Sci (Paris). août 2017;33(8-9):758-64.

6. l'Urologie M de. Physiologie des androgènes chez l'homme adulte [Internet]. 2018 [cité 2 avr 2020]. Disponible sur: https://www.urofrance.org/base-bibliographique/physiologie-des-androgenes-chez-lhomme-adulte

7. Mowszowicz I, Lee HJ, Chen HT, Mestayer C, Portois MC, Cabrol S, et al. A point mutation in the second zinc finger of the DNA-binding domain of the androgen receptor gene causes complete androgen insensitivity in two siblings with receptor-positive androgen resistance. Mol Endocrinol. 1 juill 1993;7(7):861-9.

8. Dehm SM, Tindall DJ. Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. Mol Endocrinol. 1 déc 2007;21(12):2855-63.

9. Zhou ZX, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM. A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. J Biol Chem. 6 mai 1994;269(18):13115-23.

10. Housley PR, Sanchez ER, Danielsen M, Ringold GM, Pratt WB. Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. A two-site model for hsp90 binding to the steroid binding domain. J Biol Chem. 5 août 1990;265(22):12778-81.

11. Zhou ZX, Lane MV, Kemppainen JA, French FS, Wilson EM. Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. Mol Endocrinol. 1 févr 1995;9(2):208-18.

12. The Expanding Cosmos of Nuclear Receptor Coactivators - PubMed [Internet]. [cité 6 avr 2020]. Disponible sur: https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/16678083/?from_term=Lonard+and+O%27Malley+2006&from_pos=1

13. Nantermet PV, Xu J, Yu Y, Hodor P, Holder D, Adamski S, et al. Identification of Genetic Pathways Activated by the Androgen Receptor during the Induction of Proliferation in the Ventral Prostate Gland. J Biol Chem. 1 sept 2004;279(2):1310-22.

14. Guo Z, Dai B, Jiang T, Xu K, Xie Y, Kim O, et al. Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. Cancer Cell. oct 2006;10(4):309-19.

15. Leung JK, Sadar MD. Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. Front Endocrinol (Lausanne) [Internet]. 17 janv 2017 [cité 6 avr 2020];8. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5239799/

16. Asim M, Siddiqui IA, Hafeez BB, Baniahmad A, Mukhtar H. Src kinase potentiates androgen receptor transactivation function and invasion of androgen-independent prostate cancer C4-2 cells. Oncogene. juin 2008;27(25):3596-604.

17. Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H, Cato AC. Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. Oncogene. 4 nov 1999;18(46):6322-9.

18. Unni E, Sun S, Nan B, McPhaul MJ, Cheskis B, Mancini MA, et al. Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. Cancer Res. 1 oct 2004;64(19):7156-68.

19. Castoria G, D'Amato L, Ciociola A, Giovannelli P, Giraldi T, Sepe L, et al. Androgen-induced cell migration: role of androgen receptor/filamin A association. PLoS ONE. 16 févr 2011;6(2):e17218.

20. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and physiological relevance of lipid rafts. Nat Rev Mol Cell Biol. juin 2017;18(6):361-74.

21. Lu ML, Schneider MC, Zheng Y, Zhang X, Richie JP. Caveolin-1 Interacts with Androgen Receptor A POSITIVE MODULATOR OF ANDROGEN RECEPTOR MEDIATED TRANSACTIVATION. J Biol Chem. 20 avr 2001;276(16):13442-51.

22. Heinlein CA, Chang C. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. Mol Endocrinol. 1 oct 2002;16(10):2181-7.

23. Liao RS, Ma S, Miao L, Li R, Yin Y, Raj GV. Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. Transl Androl Urol. sept 2013;2(3):187-96.

24. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. World J Urol. 1 avr 2012;30(2):143-8.

25. Brandt A, Bermejo JL, Sundquist J, Hemminki K. Age-Specific Risk of Incident Prostate Cancer and Risk of Death from Prostate Cancer Defined by the Number of Affected Family Members. European Urology. 1 août 2010;58(2):275-80.

26. Cozar JM, Robles-Fernandez I, Martinez-Gonzalez LJ, Pascual-Geler M, Rodriguez-Martinez A, Serrano MJ, et al. Genetic markers a landscape in prostate cancer. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 1 janv 2018;775:1-10.

27. Smith ZL, Eggener SE, Murphy AB. African-American Prostate Cancer Disparities. Curr Urol Rep. 14 août 2017;18(10):81.

28. Akaza H, Kanetake H, Tsukamoto T, Miyanaga N, Sakai H, Masumori N, et al. Efficacy and Safety of Dutasteride on Prostate Cancer Risk Reduction in Asian Men: The Results from the REDUCE Study. Jpn J Clin Oncol. 1 mars 2011;41(3):417-23.

29. Okobia MN, Zmuda JM, Ferrell RE, Patrick AL, Bunker CH. Chromosome 8q24 variants are associated with prostate cancer risk in a high risk population of African ancestry. Prostate. juill 2011;71(10):1054-63.

30. Karakas C, Wang C, Deng F, Huang H, Wang D, Lee P. Molecular mechanisms involving prostate cancer racial disparity. Am J Clin Exp Urol. 2017;5(3):34-48.

31. Robbins CM, Hooker S, Kittles RA, Carpten JD. EphB2 SNPs and sporadic prostate cancer risk in African American men. PLoS ONE. 2011;6(5):e19494.

32. Koochekpour S, Buckles E, Shourideh M, Hu S, Chandra D, Zabaleta J, et al. Androgen receptor mutations and polymorphisms in African American prostate cancer. Int J Biol Sci. 2014;10(6):643-51.

33. Jingwi EY, Abbas M, Ricks-Santi L, Winchester D, Beyene D, Day A, et al. Vitamin D receptor genetic polymorphisms are associated with PSA level, Gleason score and prostate cancer risk in African-American men. Anticancer Res. mars 2015;35(3):1549-58.

34. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. The Lancet. 8 mars 2003;361(9360):859-64.

35. Labbé DP, Zadra G, Yang M, Reyes JM, Lin CY, Cacciatore S, et al. High-fat diet fuels prostate cancer progression by rewiring the metabolome and amplifying the MYC program. Nat Commun [Internet]. 25 sept 2019 [cité 17 avr 2020];10. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6761092/

36. Hill P, Wynder EL, Garbaczewski L, Garnes H, Walker AR. Diet and urinary steroids in black and white North American men and black South African men. Cancer Res. déc 1979;39(12):5101-5.

37. Figiel S, Pinault M, Domingo I, Guimaraes C, Guibon R, Besson P, et al. Fatty acid profile in peri-prostatic adipose tissue and prostate cancer aggressiveness in African–Caribbean and Caucasian patients. European Journal of Cancer. mars 2018;91:107-15.

38. Wilson KM, Shui IM, Mucci LA, Giovannucci E. Calcium and phosphorus intake and prostate cancer risk: a 24-y follow-up study. The American Journal of Clinical Nutrition. 1 janv 2015;101(1):173-83.

39. Mitrou PN, Albanes D, Weinstein SJ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, et al. A prospective study of dietary calcium, dairy products and prostate cancer risk (Finland). Int J Cancer. 1 juin 2007;120(11):2466-73.

40. Chantome A, Potier-Cartereau M, Clarysse L, Fromont G, Marionneau-Lambot S, Gueguinou M, et al. Pivotal Role of the Lipid Raft SK3-Orai1 Complex in Human Cancer Cell Migration and Bone Metastases. Cancer Research. 1 août 2013;73(15):4852-61.

41. Tappel A. Heme of consumed red meat can act as a catalyst of oxidative damage and could initiate colon, breast and prostate cancers, heart disease and other diseases. Med Hypotheses. 2007;68(3):562-4.

42. Zhang X, Zhou G, Sun B, Zhao G, Liu D, Sun J, et al. Impact of obesity upon prostate cancer-associated mortality: A meta-analysis of 17 cohort studies. Oncol Lett. mars 2015;9(3):1307-12.

43. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. World J Oncol. avr 2019;10(2):63-89.

44. Ferro M, Terracciano D, Buonerba C, Lucarelli G, Bottero D, Perdonà S, et al. The emerging role of obesity, diet and lipid metabolism in prostate cancer. Future Oncol. févr 2017;13(3):285-93.

45. Halpern JA, Oromendia C, Shoag JE, Mittal S, Cosiano MF, Ballman KV, et al. Utility of Digital Rectal Examination (DRE) as an Adjunct to Prostate Specific Antigen (PSA) in the Detection of Clinically Significant Prostate Cancer. J Urol. avr 2018;199(4):947-53.

46. Rozet F, Hennequin C, Beauval J-B, Beuzeboc P, Cormier L, Fromont-Hankard G, et al. Recommandations françaises du Comité de Cancérologie de l'AFU – Actualisation 2018–2020 : cancer de la prostate. Progrès en Urologie. 1 nov 2018;28:R81-132.

47. Karakiewicz PI, Aprikian AG. Prostate cancer: 5. Diagnostic tools for early detection. CMAJ. 3 nov 1998;159(9):1139-46.

48. Coric J, Mujic J, Kucukalic E, Ler D. Prostate-Specific Antigen (PSA) and Prostate Volume: Better Predictor of Prostate Cancer for Bosnian and Herzegovina Men. Open Biochem J. 2015;9:34-6.

49. Rozet F, Hennequin C, Beauval J-B, Beuzeboc P, Cormier L, Fromont G, et al. Recommandations en onco-urologie 2016-2018 du CCAFU : Cancer de la prostate. Progrès en Urologie. 1 nov 2016;27:S95-143.

50. Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. European Urology. avr 2018;73(4):560-9.

51. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol. mars 1992;23(3):273-9.

52. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. Am J Surg Pathol. févr 2016;40(2):244-52.

53. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. JAMA. 16 sept 1998;280(11):969-74.

54. Bostwick DG, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. Mod Pathol. mars 2004;17(3):360-79.

55. Sun M, Sammon JD, Becker A, Roghmann F, Tian Z, Kim SP, et al. Radical prostatectomy vs radiotherapy vs observation among older patients with clinically localized prostate cancer: a comparative effectiveness evaluation. BJU Int. févr 2014;113(2):200-8.

56. Pasticier G, Rietbergen JB, Guillonneau B, Fromont G, Menon M, Vallancien G. Robotically assisted laparoscopic radical prostatectomy: feasibility study in men. Eur Urol. juill 2001;40(1):70-4.

57. Bladou F, Salem N, Simonian-Sauve M, Rosello R, Ternier F, Resbeut M, et al. [Permanent iodine 125 implant brachytherapy in localized prostate cancer: results of the first 4 years of experience]. Prog Urol. juin 2004;14(3):345-52.

58. He Y, Hooker E, Yu E-J, Cunha GR, Liao L, Xu J, et al. ANDROGEN SIGNALING IS ESSENTIAL FOR DEVELOPMENT OF PROSTATE CANCER INITIATED FROM PROSATIC BASAL CELLS. Oncogene. mars 2019;38(13):2337-50.

59. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. Nat Rev Cancer. avr 2004;4(4):253-65.

60. Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. Cancer Res. 15 avr 1996;56(8):1851-4.

61. Darshan MS, Loftus MS, Thadani-Mulero M, Levy BP, Escuin D, Zhou XK, et al. Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. Cancer Res. 15 sept 2011;71(18):6019-29.

62. 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. 7 oct 2004;351(15):1502-12.

63. Laurent V, Nieto L, Valet P, Muller C. Tissu adipeux et cancer: Une association à haut risque. Med Sci (Paris). avr 2014;30(4):398-404.

64. Uehara H, Kobayashi T, Matsumoto M, Watanabe S, Yoneda A, Bando Y. Adipose tissue:Critical contributor to the development of prostate cancer. J Med Invest. 2018;65(1.2):9-17.

65. Xu L, Shen M, Chen X, Zhu R, Yang D-R, Tsai Y, et al. Adipocytes affect castration-resistant prostate cancer cells to develop the resistance to cytotoxic action of NK cells with alterations of PD-L1/NKG2D ligand levels in tumor cells. Prostate. 2018;78(5):353-64.

66. Ribeiro R, Monteiro C, Catalán V, Hu P, Cunha V, Rodríguez A, et al. Obesity and prostate cancer: gene expression signature of human periprostatic adipose tissue. BMC Med. 25 sept 2012;10:108.

67. Gazi E, Gardner P, Lockyer NP, Hart CA, Brown MD, Clarke NW. Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. J Lipid Res. 8 janv 2007;48(8):1846-56.

68. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 18 févr 1972;175(4023):720-31.

69. Williams CD, Whitley BM, Hoyo C, Grant DJ, Iraggi JD, Newman KA, et al. A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer. Nutr Res. janv 2011;31(1):1-8.

70. Locke JA, Guns EST, Lehman ML, Ettinger S, Zoubeidi A, Lubik A, et al. Arachidonic acid activation of intratumoral steroid synthesis during prostate cancer progression to castration resistance. The Prostate. 2010;70(3):239-51.

71. Liang P, Henning SM, Schokrpur S, Wu L, Doan N, Said J, et al. Effect of dietary omega-3 fatty acids on tumor-associated macrophages and prostate cancer progression. Prostate. oct 2016;76(14):1293-302.

72. Figiel S, Bery F, Chantôme A, Fontaine D, Pasqualin C, Maupoil V, et al. A Novel Calcium-Mediated EMT Pathway Controlled by Lipids: An Opportunity for Prostate Cancer Adjuvant Therapy. Cancers (Basel). 18 nov 2019;11(11).

73. Gevariya N, Besançon M, Robitaille K, Picard V, Diabaté L, Alesawi A, et al. Omega-3 fatty acids decrease prostate cancer progression associated with an anti-tumor immune response in eugonadal and castrated mice. Prostate. 2019;79(1):9-20.

74. Pouessel D, Hennequin C, Mongiat-Artus P, Quero L, Culine S. La résistance à la castration: mécanismes physiopathologiques et applications thérapeutiques. Oncologie. 1 févr 2012;14(2):109-12.

75. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. Hum Mutat. mai 2012;33(5):887-94.

76. McPhaul MJ, Marcelli M, Tilley WD, Griffin JE, Wilson JD. Androgen resistance caused by mutations in the androgen receptor gene. FASEB J. nov 1991;5(14):2910-5.

77. Han D, Gao S, Valencia K, Owiredu J, Han W, de Waal E, et al. A novel nonsense mutation in androgen receptor confers resistance to CYP17 inhibitor treatment in prostate cancer. Oncotarget. 24 janv 2017;8(4):6796-808.

78. Taplin M-E, Bubley GJ, Ko Y-J, Small EJ, Upton M, Rajeshkumar B, et al. Selection for Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancers Treated with Androgen Antagonist. Cancer Res. 1 juin 1999;59(11):2511-5.

79. Haapala K, Hyytinen E-R, Roiha M, Laurila M, Rantala I, Helin HJ, et al. Androgen Receptor Alterations in Prostate Cancer Relapsed during a Combined Androgen Blockade by Orchiectomy and Bicalutamide. Laboratory Investigation. déc 2001;81(12):1647-51.

80. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. N Engl J Med. 25 mai 1995;332(21):1393-8.

81. Montgomery JS, Price DK, Figg WD. The androgen receptor gene and its influence on the development and progression of prostate cancer. J Pathol. sept 2001;195(2):138-46.

82. Gregory CW, Johnson RT, Mohler JL, French FS, Wilson EM. Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. Cancer Res. 1 avr 2001;61(7):2892-8.

83. Linja MJ, Savinainen KJ, Saramäki OR, Tammela TLJ, Vessella RL, Visakorpi T. Amplification and Overexpression of Androgen Receptor Gene in Hormone-Refractory Prostate Cancer. Cancer Res. 1 mai 2001;61(9):3550-5.

84. Yin L, Hu Q. CYP17 inhibitors--abiraterone, C17,20-lyase inhibitors and multi-targeting agents. Nat Rev Urol. janv 2014;11(1):32-42.

85. Nishiyama T, Hashimoto Y, Takahashi K. The Influence of Androgen Deprivation Therapy on Dihydrotestosterone Levels in the Prostatic Tissue of Patients with Prostate Cancer. Clin Cancer Res. 1 nov 2004;10(21):7121-6.

86. Titus MA, Gregory CW, Ford OH, Schell MJ, Maygarden SJ, Mohler JL. Steroid 5alpha-reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. Clin Cancer Res. 15 juin 2005;11(12):4365-71.

87. Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS, et al. A Mechanism for Androgen Receptor-mediated Prostate Cancer Recurrence after Androgen Deprivation Therapy. Cancer Res. 1 juin 2001;61(11):4315-9.

88. Yeh S, Sampson ER, Lee DK, Kim E, Hsu CL, Chen YL, et al. Functional analysis of androgen receptor N-terminal and ligand binding domain interacting coregulators in prostate cancer. J Formos Med Assoc. déc 2000;99(12):885-94.

89. Yeh S, Chang C. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. Proc Natl Acad Sci USA. 28 mai 1996;93(11):5517-21.

90. Kang HY, Yeh S, Fujimoto N, Chang C. Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor. J Biol Chem. 26 mars 1999;274(13):8570-6.

91. Lamoureux F, Thomas C, Yin M-J, Fazli L, Zoubeidi A, Gleave ME. Suppression of heat shock protein 27 using OGX-427 induces endoplasmic reticulum stress and potentiates heat shock protein 90 inhibitors to delay castrate-resistant prostate cancer. Eur Urol. juill 2014;66(1):145-55.

92. Stope MB, Schubert T, Staar D, Rönnau C, Streitbörger A, Kroeger N, et al. Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. World J Urol. 1 juin 2012;30(3):327-31.

93. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, et al. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. Cancer Res. 15 déc 2000;60(24):7099-105.

94. Andrieu C, Taieb D, Baylot V, Ettinger S, Soubeyran P, De-Thonel A, et al. Heat shock protein 27 confers resistance to androgen ablation and chemotherapy in prostate cancer cells through eIF4E. Oncogene. 1 avr 2010;29(13):1883-96.

95. Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. J Mol Med. juin 1998;76(7):469-79.

96. Haile S, Sadar MD. Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. Cell Mol Life Sci. déc 2011;68(24):3971-81.

97. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, et al. Ligand-independent Androgen Receptor Variants Derived from Splicing of Cryptic Exons Signify Hormone Refractory Prostate Cancer. Cancer Res. 1 janv 2009;69(1):16-22.

98. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Nakazawa M, et al. Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. JAMA Oncol. 1 août 2015;1(5):582-91.

99. Kohli M, Ho Y, Hillman DW, Van Etten JL, Henzler C, Yang R, et al. Androgen Receptor Variant AR-V9 Is Coexpressed with AR-V7 in Prostate Cancer Metastases and Predicts Abiraterone Resistance. Clin Cancer Res. 15 août 2017;23(16):4704-15.

100. Hörnberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, Widmark A, et al. Expression of Androgen Receptor Splice Variants in Prostate Cancer Bone Metastases is Associated with Castration-Resistance and Short Survival. PLoS One [Internet]. 28 avr 2011 [cité 30 avr 2020];6(4). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3084247/

101. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, et al. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. Cancer Res. 15 oct 1994;54(20):5474-8.

102. Gregory CW, Fei X, Ponguta LA, He B, Bill HM, French FS, et al. Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. J Biol Chem. 20 févr 2004;279(8):7119-30.

103. Hobisch A, Eder IE, Putz T, Horninger W, Bartsch G, Klocker H, et al. Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. Cancer Res. 15 oct 1998;58(20):4640-5.

104. Denduluri SK, Idowu O, Wang Z, Liao Z, Yan Z, Mohammed MK, et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. Genes & Diseases. 1 mars 2015;2(1):13-25.

105. Lyons LS, Rao S, Balkan W, Faysal J, Maiorino CA, Burnstein KL. Ligand-Independent Activation of Androgen Receptors by Rho GTPase Signaling in Prostate Cancer. Mol Endocrinol. mars 2008;22(3):597-608.

106. Fan W, Yanase T, Morinaga H, Okabe T, Nomura M, Daitoku H, et al. Insulin-like Growth Factor 1/Insulin Signaling Activates Androgen Signaling through Direct Interactions of Foxo1 with Androgen Receptor. J Biol Chem. 3 sept 2007;282(10):7329-38.

107. Sharma J, Gray KP, Evan C, Nakabayashi M, Fichorova R, Rider J, et al. Elevated insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) in men with metastatic prostate cancer starting androgen deprivation therapy (ADT) is associated with shorter time to castration resistance and overall survival. The Prostate. 2014;74(3):225-34.

108. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. Nat Med. mars 1999;5(3):280-5.

109. Ueda T, Bruchovsky N, Sadar MD. Activation of the Androgen Receptor N-terminal Domain by Interleukin-6 via MAPK and STAT3 Signal Transduction Pathways. J Biol Chem. 1 mars 2002;277(9):7076-85.

110. Ueda T, Mawji NR, Bruchovsky N, Sadar MD. Ligand-independent Activation of the Androgen Receptor by Interleukin-6 and the Role of Steroid Receptor Coactivator-1 in Prostate Cancer Cells. J Biol Chem. 10 nov 2002;277(41):38087-94.

111. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, et al. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. Nature. 20 avr 1995;374(6524):733-6.

112. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 27 août 1993;74(4):609-19.

113. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol. janv 1994;124(1-2):1-6.

114. Raffo AJ, Perlman H, Chen M-W, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. Overexpression of bcl-2 Protects Prostate Cancer Cells from Apoptosis in Vitro and Confers Resistance to Androgen Depletion in Vivo. Cancer Res. 1 oct 1995;55(19):4438-45.

115. McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. Cancer Res. 15 déc 1992;52(24):6940-4.

116. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, Nichols WW, et al. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. J Natl Cancer Inst. 20 oct 1993;85(20):1657-69.

117. Schweizer L, Rizzo CA, Spires TE, Platero JS, Wu Q, Lin T-A, et al. The androgen receptor can signal through Wnt/β-Catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens. BMC Cell Biol. 24 janv 2008;9:4.

118. Pak S, Park S, Kim Y, Park J-H, Park C-H, Lee K-J, et al. The small molecule WNT/β-catenin inhibitor CWP232291 blocks the growth of castration-resistant prostate cancer by activating the endoplasmic reticulum stress pathway. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 6 août 2019;38(1):342.

119. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, et al. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. Cancer Cell. 17 mai 2011;19(5):575-86.

120. Edlind MP, Hsieh AC. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. Asian J Androl. 2014;16(3):378-86.

121. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell. 13 juill 2010;18(1):11-22.

122. Lotan TL, Gurel B, Sutcliffe S, Esopi D, Liu W, Xu J, et al. PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. Clin Cancer Res. 15 oct 2011;17(20):6563-73.

123. Jiao J, Wang S, Qiao R, Vivanco I, Watson PA, Sawyers CL, et al. Murine cell lines derived from Pten null prostate cancer show the critical role of PTEN in hormone refractory prostate cancer development. Cancer Res. 1 juill 2007;67(13):6083-91.

124. Murillo H, Huang H, Schmidt LJ, Smith DI, Tindall DJ. Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. Endocrinology. nov 2001;142(11):4795-805.

125. Pelley RP, Chinnakannu K, Murthy S, Strickland FM, Menon M, Dou QP, et al. Calmodulin-androgen receptor (AR) interaction: calcium-dependent, calpain-mediated breakdown of AR in LNCaP prostate cancer cells. Cancer Res. 15 déc 2006;66(24):11754-62.

126. Sivanandam A, Murthy S, Chinnakannu K, Bai VU, Kim S-H, Barrack ER, et al. Calmodulin protects androgen receptor from calpain-mediated breakdown in prostate cancer cells. J Cell Physiol. juill 2011;226(7):1889-96.

127. Libertini SJ, Tepper CG, Rodriguez V, Asmuth DM, Kung H-J, Mudryj M. Evidence for calpain-mediated androgen receptor cleavage as a mechanism for androgen independence. Cancer Res. 1 oct 2007;67(19):9001-5.

128. Rokhlin O, Taghiyev AF, Bayer KU, Bumcrot D, Kotelianski VE, Glover RA, et al. Calcium/calmodulin-dependent kinase II plays an important role in prostate cancer cell survival. Cancer Biology & Therapy. 30 mai 2007;6(5):732-42.

129. Mousses S, Bubendorf L, Wagner U, Hostetter G, Kononen J, Cornelison R, et al. Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays. Cancer Res. 1 mars 2002;62(5):1256-60.

130. Soekmadji C, Rockstroh A, Ramm GA, Nelson CC, Russell PJ. Extracellular Vesicles in the Adaptive Process of Prostate Cancer during Inhibition of Androgen Receptor Signaling by Enzalutamide. Proteomics. déc 2017;17(23-24).

131. di Sant'Agnese PA, De Mesy Jensen KL. Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra: an ultrastructural study. Hum Pathol. nov 1984;15(11):1034-41.

132. di Sant'Agnese PA, de Mesy Jensen KL, Ackroyd RK. Calcitonin, katacalcin, and calcitonin gene-related peptide in the human prostate. An immunocytochemical and immunoelectron microscopic study. Arch Pathol Lab Med. juill 1989;113(7):790-6.

133. Aprikian AG, Han K, Guy L, Landry F, Begin LR, Chevalier S. Neuroendocrine differentiation and the bombesin/gastrin-releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer. Prostate Suppl. 1998;8:52-61.

134. Chevalier S, Defoy I, Lacoste J, Hamel L, Guy L, Bégin LR, et al. Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis. Molecular and Cellular Endocrinology. 28 mars 2002;189(1):169-79.

135. Hansson J, Abrahamsson P-A. Neuroendocrine pathogenesis in adenocarcinoma of the prostate. Annals of Oncology. 1 janv 2001;12:S145-52.

136. Epstein JI, Amin MB, Beltran H, Lotan TL, Mosquera J-M, Reuter VE, et al. Proposed morphologic classification of prostate cancer with neuroendocrine differentiation. Am J Surg Pathol. juin 2014;38(6):756-67.

137. Parimi V, Goyal R, Poropatich K, Yang XJ. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. Am J Clin Exp Urol. 2014;2(4):273-85.

138. Bonkhoff H. Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. Annals of Oncology. 1 janv 2001;12:S141-4.

139. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The Chromogranin–Secretogranin Family. New England Journal of Medicine. 20 mars 2003;348(12):1134-49.

140. Aunis D, Metz-Boutigue M. Chromogranines : de la découverte à la fonction. Med Sci (Paris). 2001;17(4):418.

141. Marotta V, Zatelli MC, Sciammarella C, Ambrosio MR, Bondanelli M, Colao A, et al. Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: more flaws than fame. Endocr Relat Cancer. janv 2018;25(1):R11-29.

142. Parimi V, Goyal R, Poropatich K, Yang XJ. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. Am J Clin Exp Urol. 9 déc 2014;2(4):273-85.

143. Heck MM, Thaler MA, Schmid SC, Seitz A-K, Tauber R, Kübler H, et al. Chromogranin A and neurone-specific enolase serum levels as predictors of treatment outcome in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer undergoing abiraterone therapy. BJU Int. janv 2017;119(1):30-7.

144. Sl B, V C, C M, E C, L R, E B, et al. Chromogranin A predicts outcome in prostate cancer patients treated with abiraterone [Internet]. Vol. 21, Endocrine-related cancer. Endocr Relat Cancer; 2014 [cité 2 oct 2020]. Disponible sur: https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/24741024/

145. Chapman ER, Jahn R. Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. J Biol Chem. 25 févr 1994;269(8):5735-41.

146. Arthur CP, Stowell MHB. Structure of synaptophysin: A hexameric MARVEL domain channel protein. Structure. juin 2007;15(6):707-14.

147. Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology. avr 2004;26(4):445-53.

148. Pal SK, He M, Chen L, Yang L, Pillai R, Twardowski P, et al. Synaptophysin expression on circulating tumor cells (CTCs) in patients with castration resistant prostate cancer (CRPC) undergoing treatment with abiraterone acetate or enzalutamide. Urol Oncol. avr 2018;36(4):162.e1-162.e6.

149. Landers KA, Burger MJ, Tebay MA, Purdie DM, Scells B, Samaratunga H, et al. Use of multiple biomarkers for a molecular diagnosis of prostate cancer. International Journal of Cancer. 10 mai 2005;114(6):950-6.

150. Ploussard G, Terry S, Maillé P, Allory Y, Sirab N, Kheuang L, et al. Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. Cancer Res. nov 2010;70(22):9253-64.

151. Terry S, Beltran H. The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. Front Oncol. 2014;4:60.

152. Cox ME, Deeble PD, Lakhani S, Parsons SJ. Acquisition of Neuroendocrine Characteristics by Prostate Tumor Cells Is Reversible: Implications for Prostate Cancer Progression. :11.

153. De Marzo AM, Meeker AK, Epstein JI, Coffey DS. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. Am J Pathol. sept 1998;153(3):911-9.

154. Bluemn EG, Coleman IM, Lucas JM, Coleman RT, Hernandez-Lopez S, Tharakan R, et al. Androgen Receptor Pathway-Independent Prostate Cancer Is Sustained through FGF Signaling. Cancer Cell. 9 oct 2017;32(4):474-489.e6.

155. Formaggio N, Rubin MA, Theurillat J-P. Loss and revival of androgen receptor signaling in advanced prostate cancer. Oncogene. févr 2021;40(7):1205-16.

156. Bishop JL, Thaper D, Vahid S, Davies A, Ketola K, Kuruma H, et al. The Master Neural Transcription Factor BRN2 Is an Androgen Receptor-Suppressed Driver of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. Cancer Discov. janv 2017;7(1):54-71.

157. Lee GT, Rosenfeld JA, Kim WT, Kwon YS, Palapattu G, Mehra R, et al. TCF4 induces enzalutamide resistance via neuroendocrine differentiation in prostate cancer. Saleem M, éditeur. PLoS ONE. 19 sept 2019;14(9):e0213488.

158. Rotinen M, You S, Yang J, Coetzee SG, Reis-Sobreiro M, Huang W-C, et al. ONECUT2 is a targetable master regulator of lethal prostate cancer that suppresses the androgen axis. Nat Med. déc 2018;24(12):1887-98.

159. Sotomayor P, Godoy A, Smith GJ, Huss WJ. Oct4A is expressed by a subpopulation of prostate neuroendocrine cells. Prostate. 1 mars 2009;69(4):401-10.

160. Lapuk AV, Wu C, Wyatt AW, McPherson A, McConeghy BJ, Brahmbhatt S, et al. From sequence to molecular pathology, and a mechanism driving the neuroendocrine phenotype in prostate cancer. J Pathol. juill 2012;227(3):286-97.

161. Zou M, Toivanen R, Mitrofanova A, Floch N, Hayati S, Sun Y, et al. Transdifferentiation as a mechanism of treatment resistance in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. Cancer Discov. juill 2017;7(7):736-49.

162. Dardenne E, Beltran H, Benelli M, Gayvert K, Berger A, Puca L, et al. N-Myc Induces an EZH2-Mediated Transcriptional Program Driving Neuroendocrine Prostate Cancer. Cancer Cell. 10 oct 2016;30(4):563-77.

163. Beltran H, Rickman DS, Park K, Chae SS, Sboner A, MacDonald TY, et al. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. Cancer Discov. nov 2011;1(6):487-95.

164. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. Prostate. 1 oct 2002;53(2):118-23.

165. Xing N, Qian J, Bostwick D, Bergstralh E, Young CY. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. Prostate. 15 juin 2001;48(1):7-15.

166. Vanoverberghe K, Vanden Abeele F, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL, et al. Ca2+ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. Cell Death Differ. mars 2004;11(3):321-30.

167. Dayon A, Brizuela L, Martin C, Mazerolles C, Pirot N, Doumerc N, et al. Sphingosine Kinase-1 Is Central to Androgen-Regulated Prostate Cancer Growth and Survival. PLoS One [Internet]. 26 nov 2009 [cité 13 mai 2020];4(11). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2779655/

168. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, et al. EZH2 Oncogenic Activity in Castration Resistant Prostate Cancer Cells is Polycomb-Independent. Science. 14 déc 2012;338(6113):1465-9.

169. Shan J, Al-Muftah MA, Al-Kowari MK, Abuaqel SWJ, Al-Rumaihi K, Al-Bozom I, et al. Targeting Wnt/EZH2/microRNA-708 signaling pathway inhibits neuroendocrine differentiation in prostate cancer. Cell Death Discovery. 30 sept 2019;5(1):1-13.

170. Zhang Y, Zheng D, Zhou T, Song H, Hulsurkar M, Su N, et al. Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers. Nat Commun. déc 2018;9(1):4080.

171. Nolan KD, Franco OE, Hance MW, Hayward SW, Isaacs JS. Tumor-secreted Hsp90 Subverts Polycomb Function to Drive Prostate Tumor Growth and Invasion *. Journal of Biological Chemistry. 27 mars 2015;290(13):8271-82.

172. Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, Benelli M, Puca L, Cyrta J, et al. Divergent clonal evolution of castration resistant neuroendocrine prostate cancer. Nat Med. mars 2016;22(3):298-305.

173. Davies A, Zoubeidi A, Selth LA. The epigenetic and transcriptional landscape of neuroendocrine prostate cancer. Endocr Relat Cancer. févr 2020;27(2):R35-50.

174. Park JW, Lee JK, Sheu KM, Wang L, Balanis NG, Nguyen K, et al. Reprogramming normal human epithelial tissues to a common, lethal neuroendocrine cancer lineage. Science. 5 oct 2018;362(6410):91-5.

175. Puca L, Bareja R, Prandi D, Shaw R, Benelli M, Karthaus WR, et al. Patient derived organoids to model rare prostate cancer phenotypes. Nat Commun. déc 2018;9(1):2404.

176. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell. 16 mai 2008;133(4):704-15.

177. Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. Front Med. août 2018;12(4):361-73.

178. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. juill 2009;10(7):445-57.

179. Deep G, Jain AK, Ramteke A, Ting H, Vijendra KC, Gangar SC, et al. SNAI1 is critical for the aggressiveness of prostate cancer cells with low E-cadherin. Mol Cancer. 24 févr 2014;13:37.

180. Wang W, Wang L, Mizokami A, Shi J, Zou C, Dai J, et al. Down-regulation of E-cadherin enhances prostate cancer chemoresistance via Notch signaling. Chin J Cancer [Internet]. 29 mars 2017 [cité 2 juill 2020];36. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372329/

181. Whiteland H, Spencer-Harty S, Thomas DH, Davies C, Morgan C, Kynaston H, et al. Putative prognostic epithelial-to-mesenchymal transition biomarkers for aggressive prostate cancer. Exp Mol Pathol. oct 2013;95(2):220-6.

182. Drake JM, Barnes JM, Madsen JM, Domann FE, Stipp CS, Henry MD. ZEB1 Coordinately Regulates Laminin-332 and β4 Integrin Expression Altering the Invasive Phenotype of Prostate Cancer Cells. J Biol Chem. 29 oct 2010;285(44):33940-8.

183. Huang RY-J, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. J Cell Sci. 1 oct 2012;125(Pt 19):4417-22.

184. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J Clin Invest. juin 2009;119(6):1429-37.

185. Ridley AJ. Life at the leading edge. Cell. 24 juin 2011;145(7):1012-22.

186. Jin H, Yu Y, Zhang T, Zhou X, Zhou J, Jia L, et al. Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma. Int J Cancer. 1 mai 2010;126(9):2102-11.

187. Cardillo MR, Di Silverio F, Gentile V. Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. Anticancer Res. avr 2006;26(2A):973-82.

188. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? Nat Rev Cancer. juin 2007;7(6):415-28.

189. Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, Wuytens G, Collart C, Verschueren K, et al. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. EMBO J. 15 sept 1999;18(18):5073-84.

190. Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. EMBO J. 15 mai 2003;22(10):2453-62.

191. Anose BM, Sanders MM. Androgen Receptor Regulates Transcription of the ZEB1 Transcription Factor. Int J Endocrinol [Internet]. 2011 [cité 4 juin 2020];2011. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3235469/

192. Sun Y, Wang B-E, Leong KG, Yue P, Li L, Jhunjhunwala S, et al. Androgen Deprivation Causes Epithelial-Mesenchymal Transition in the Prostate: Implications for Androgen-Deprivation Therapy. Cancer Research. 15 janv 2012;72(2):527-36.

193. Graham TR, Yacoub R, Taliaferro-Smith L, Osunkoya AO, Odero-Marah VA, Liu T, et al. Reciprocal regulation of ZEB1 and AR in triple negative breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. août 2010;123(1):139-47.

194. Jacob S, Nayak S, Fernandes G, Barai RS, Menon S, Chaudhari UK, et al. Androgen receptor as a regulator of ZEB2 expression and its implications in epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. Endocr Relat Cancer. juin 2014;21(3):473-86.

195. Takayama K-I, Misawa A, Inoue S. Significance of microRNAs in Androgen Signaling and Prostate Cancer Progression. Cancers (Basel). 7 août 2017;9(8).

196. Mooney SM, Parsana P, Hernandez JR, Liu X, Verdone JE, Torga G, et al. The presence of androgen receptor elements regulates ZEB1 expression in the absence of androgen receptor. J Cell Biochem. janv 2015;116(1):115-23.

197. Cottard F, Asmane I, Erdmann E, Bergerat J-P, Kurtz J-E, Céraline J. Constitutively Active Androgen Receptor Variants Upregulate Expression of Mesenchymal Markers in Prostate Cancer Cells. PLoS One [Internet]. 2 mai 2013 [cité 5 juin 2020];8(5). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3642121/

198. Li P, Wang J, Chu M, Zhang K, Yang R, Gao W-Q. Zeb1 promotes androgen independence of prostate cancer via induction of stem cell-like properties. Exp Biol Med (Maywood). juill 2014;239(7):813-22.

199. Caramel J, Ligier M, Puisieux A. Pleiotropic Roles for ZEB1 in Cancer. Cancer Res. 1 janv 2018;78(1):30-5.

200. Ren D, Wang M, Guo W, Huang S, Wang Z, Zhao X, et al. Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells. Cell Tissue Res. déc 2014;358(3):763-78.

201. Krebs AM, Mitschke J, Lasierra Losada M, Schmalhofer O, Boerries M, Busch H, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. Nat Cell Biol. 2017;19(5):518-29.

202. Figiel S, Vasseur C, Bruyere F, Rozet F, Maheo K, Fromont G. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. Human Pathology. mars 2017;61:26-32.

203. Anose BM, LaGoo L, Schwendinger J. Characterization of androgen regulation of ZEB-1 and PSA in 22RV1 prostate cancer cells. Adv Exp Med Biol. 2008;617:541-6.

204. Hanrahan K, O'Neill A, Prencipe M, Bugler J, Murphy L, Fabre A, et al. The role of epithelial-mesenchymal transition drivers ZEB1 and ZEB2 in mediating docetaxel-resistant prostate cancer. Mol Oncol. mars 2017;11(3):251-65.

205. Zhang X, Zhang Z, Zhang Q, Zhang Q, Sun P, Xiang R, et al. ZEB1 confers chemotherapeutic resistance to breast cancer by activating ATM. Cell Death Dis [Internet]. 19 janv 2018 [cité 8 juin 2020];9(2). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5833408/

206. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. Mol Cell Biol. janv 2004;24(1):306-19.

207. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. Development. juill 2005;132(14):3151-61.

208. Emadi Baygi M, Soheili ZS, Schmitz I, Sameie S, Schulz WA. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. Cell Biol Toxicol. déc 2010;26(6):553-67.

209. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. Nat Cell Biol. oct 2004;6(10):931-40.

210. Miao L, Yang L, Li R, Rodrigues DN, Crespo M, Hsieh J-T, et al. Disrupting Androgen Receptor Signaling Induces Snail-Mediated Epithelial–Mesenchymal Plasticity in Prostate Cancer. Cancer Res. 1 juin 2017;77(11):3101-12.

211. Ware KE, Somarelli JA, Schaeffer D, Li J, Zhang T, Park S, et al. Snail promotes resistance to enzalutamide through regulation of androgen receptor activity in prostate cancer. Oncotarget. 2 août 2016;7(31):50507-21.

212. Wen Y-C, Chen W-Y, Lee W-J, Yang S-F, Lee L-M, Chien M-H. Snail as a potential marker for predicting the recurrence of prostate cancer in patients at stage T2 after radical prostatectomy. Clin Chim Acta. 20 avr 2014;431:169-73.

213. Chien M-H, Lin Y-W, Wen Y-C, Yang Y-C, Hsiao M, Chang J-L, et al. Targeting the SPOCK1-snail/slug axis-mediated epithelial-to-mesenchymal transition by apigenin contributes to repression of prostate cancer metastasis. J Exp Clin Cancer Res [Internet]. 10 juin 2019 [cité 12 juin 2020];38. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6558790/

214. Henderson V, Smith B, Burton LJ, Randle D, Morris M, Odero-Marah VA. Snail promotes cell migration through PI3K/AKT-dependent Rac1 activation as well as PI3K/AKT-independent pathways during prostate cancer progression. Cell Adh Migr. 24 juill 2015;9(4):255-64.

215. Cabrera Je E. The Role of Transcription Factor TWIST in Cancer Cells. J Genet Syndr Gene Ther [Internet]. 2013 [cité 22 juin 2020];04(01). Disponible sur: https://www.omicsonline.org/the-role-of-transcription-factor-twist-in-cancer-cells-2157-7412.1000124.php?aid=11464

216. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell. 25 juin 2004;117(7):927-39.

217. Yang Z, Zhang X, Gang H, Li X, Li Z, Wang T, et al. Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. Biochem Biophys Res Commun. 6 juill 2007;358(3):925-30.

218. Cao J, Wang X, Dai T, Wu Y, Zhang M, Cao R, et al. Twist promotes tumor metastasis in basal-like breast cancer by transcriptionally upregulating ROR1. Theranostics. 9 avr 2018;8(10):2739-51.

219. Nuti SV, Mor G, Li P, Yin G. TWIST and ovarian cancer stem cells: implications for chemoresistance and metastasis. Oncotarget. 3 sept 2014;5(17):7260-71.

220. Terauchi M, Kajiyama H, Yamashita M, Kato M, Tsukamoto H, Umezu T, et al. Possible involvement of TWIST in enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. Clin Exp Metastasis. 2007;24(5):329-39.

221. Yuen H-F, Chua C-W, Chan Y-P, Wong Y-C, Wang X, Chan K-W. Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. Histopathology. avr 2007;50(5):648-58.

222. Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, Frias À, Beltran M, Peiró S, et al. Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. J Biol Chem. 8 avr 2011;286(14):12024-32.

223. Siemens H, Jackstadt R, Hünten S, Kaller M, Menssen A, Götz U, et al. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. Cell Cycle. 15 déc 2011;10(24):4256-71.

224. Moes M, Le Béchec A, Crespo I, Laurini C, Halavatyi A, Vetter G, et al. A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition. PLoS ONE. 2012;7(4):e35440.

225. Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, et al. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. Cancer Res. 1 oct 2008;68(19):7846-54.

226. Sekhon K, Bucay N, Majid S, Dahiya R, Saini S. MicroRNAs and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. Oncotarget. 30 août 2016;7(41):67597-611.

227. Shkreta L, Bell B, Revil T, Venables JP, Prinos P, Elela SA, et al. Cancer-Associated Perturbations in Alternative Pre-messenger RNA Splicing. Cancer Treat Res. 2013;158:41-94.

228. Aparicio LA, Abella V, Valladares M, Figueroa A. Posttranscriptional regulation by RNA-binding proteins during epithelial-to-mesenchymal transition. Cell Mol Life Sci. 2013;70(23):4463-77.

229. Braeutigam C, Rago L, Rolke A, Waldmeier L, Christofori G, Winter J. The RNA-binding protein Rbfox2: an essential regulator of EMT-driven alternative splicing and a mediator of cellular invasion. Oncogene. 27 févr 2014;33(9):1082-92.

230. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. Genes Dev. janv 1994;8(2):133-46.

231. Hao Y, Baker D, ten Dijke P. TGF-β-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. Int J Mol Sci [Internet]. 5 juin 2019 [cité 7 juill 2020];20(11). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600375/

232. Massagué J, Gomis RR. The logic of TGFβ signaling. FEBS Letters. 22 mai 2006;580(12):2811-20.

233. Javelaud D, Mauviel A. Transforming growth factor-βs : signalisation et rôles physiopathologiques. Pathologie Biologie. janv 2004;52(1):50-4.

234. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell. 13 juin 2003;113(6):685-700.

235. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. Curr Opin Cell Biol. avr 2007;19(2):176-84.

236. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. mars 2014;15(3):178-96.

237. Vincent T, Neve EPA, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-β mediated epithelial-mesenchymal transition. Nat Cell Biol. août 2009;11(8):943-50.

238. Fan Q, Qiu M-T, Zhu Z, Zhou J-H, Chen L, Zhou Y, et al. Twist induces epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinogenesis by regulating the TGF-β/Smad3 signaling pathway. Oncol Rep. oct 2015;34(4):1787-94.

239. Mu Y, Gudey SK, Landström M. Non-Smad signaling pathways. Cell Tissue Res. janv 2012;347(1):11-20.

240. Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. Mol Cancer [Internet]. 11 nov 2019 [cité 21 juill 2020];18. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6844052/

241. Zhong H, Semenza GL, Simons JW, De Marzo AM. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is an early event in prostate carcinogenesis. Cancer Detect Prev. 2004;28(2):88-93.

242. Huang M, Du H, Zhang L, Che H, Liang C. The association of HIF-1α expression with clinicopathological significance in prostate cancer: a meta-analysis. Cancer Manag Res. 21 août 2018;10:2809-16.

243. VEGF: Médiateur de l'angiogénèse hypoxique.pdf [Internet]. [cité 23 juill 2020]. Disponible sur: http://ipubli-inserm.inist.fr/bitstream/handle/10608/480/MS_1997_6-7_886.pdf

244. Darrington E, Zhong M, Vo B-H, Khan SA. Vascular endothelial growth factor A, secreted in response to transforming growth factor-β1 under hypoxic conditions, induces autocrine effects on migration of prostate cancer cells. Asian J Androl. sept 2012;14(5):745-51.

245. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene. :9.

246. Qian J, Shen S, Chen W, Chen N. Propofol Reversed Hypoxia-Induced Docetaxel Resistance in Prostate Cancer Cells by Preventing Epithelial-Mesenchymal Transition by Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor 1α. Biomed Res Int. 2018;2018:4174232.

247. Joseph JP, Harishankar MK, Pillai AA, Devi A. Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. Oral Oncol. 2018;80:23-32.

248. Chen S, Chen J, Zhang J, Chen H, Yan M, Huang L, et al. Hypoxia induces TWIST-activated epithelial–mesenchymal transition and proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in nude mice. Cancer Letters. 28 sept 2016;383.

249. Zhang W, Shi X, Peng Y, Wu M, Zhang P, Xie R, et al. HIF-1α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. PLoS ONE. 2015;10(6):e0129603.

250. Zhu J, Huang Z, Zhang M, Wang W, Liang H, Zeng J, et al. HIF-1α promotes ZEB1 expression and EMT in a human bladder cancer lung metastasis animal model. Oncology Letters. 1 mars 2018;15(3):3482-9.

251. Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, et al. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1α–ZEB1 axis. Cancer Letters. 1 avr 2015;359(1):107-16.

252. McMahon S, Charbonneau M, Grandmont S, Richard DE, Dubois CM. Transforming Growth Factor β1 Induces Hypoxia-inducible Factor-1 Stabilization through Selective Inhibition of PHD2 Expression. J Biol Chem. 25 août 2006;281(34):24171-81.

253. Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, Pollet I, et al. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. J Exp Med. 26 nov 2007;204(12):2935-48.

254. Li G-Q, Zhang Y, Liu D, Qian Y-Y, Zhang H, Guo S-Y, et al. PI3 kinase/Akt/HIF-1α pathway is associated with hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis. Mol Cell Biochem. janv 2013;372(1-2):221-31.

255. Zhu M-L, Kyprianou N. Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells. FASEB J. mars 2010;24(3):769-77.

256. Zhu M-L, Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. Endocr Relat Cancer. déc 2008;15(4):841-9.

257. Kang H-Y, Huang K-E, Chang SY, Ma W-L, Lin W-J, Chang C. Differential Modulation of Androgen Receptor-mediated Transactivation by Smad3 and Tumor Suppressor Smad4. J Biol Chem. 15 nov 2002;277(46):43749-56.

258. Xu G, Wu J, Zhou L, Chen B, Sun Z, Zhao F, et al. Characterization of the small RNA transcriptomes of androgen dependent and independent prostate cancer cell line by deep sequencing. PLoS ONE. 30 nov 2010;5(11):e15519.

259. Park S-M, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. Genes Dev. 1 avr 2008;22(7):894-907.

260. Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, Shimomura T, et al. Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. Nat Med. déc 2010;16(12):1414-20.

261. Azimi I, Monteith GR. Plasma membrane ion channels and epithelial to mesenchymal transition in cancer cells. Endocr Relat Cancer. 2016;23(11):R517-25.

262. Schaar A, Sukumaran P, Sun Y, Dhasarathy A, Singh BB. TRPC1-STIM1 activation modulates transforming growth factor β-induced epithelial-to-mesenchymal transition. Oncotarget. 6 déc 2016;7(49):80554-67.

263. Mahdi SHA, Cheng H, Li J, Feng R. The effect of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition on the expression of intracellular calcium-handling proteins in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. Arch Biochem Biophys. 1 oct 2015;583:18-26.

264. Guéguinou M, Harnois T, Crottes D, Uguen A, Deliot N, Gambade A, et al. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline. Oncotarget [Internet]. 14 juin 2016 [cité 18 mars 2020];7(24). Disponible sur: http://www.oncotarget.com/fulltext/8786

265. Zhang P, Yang X, Yin Q, Yi J, Shen W, Zhao L, et al. Inhibition of SK4 Potassium Channels Suppresses Cell Proliferation, Migration and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple-Negative Breast Cancer Cells. PLoS One [Internet]. 28 avr 2016 [cité 27 juill 2020];11(4). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4849628/

266. Davis FM, Azimi I, Faville RA, Peters AA, Jalink K, Putney JW, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. Oncogene. 1 mai 2014;33(18):2307-16.

267. Davis FM, Peters AA, Grice DM, Cabot PJ, Parat M-O, Roberts-Thomson SJ, et al. Non-stimulated, agonist-stimulated and store-operated Ca2+ influx in MDA-MB-468 breast cancer cells and the effect of EGF-induced EMT on calcium entry. PLoS ONE. 2012;7(5):e36923.

268. Liu J, Chen Y, Shuai S, Ding D, Li R, Luo R. TRPM8 promotes aggressiveness of breast cancer cells by regulating EMT via activating AKT/GSK-3β pathway. Tumour Biol. sept 2014;35(9):8969-77.

269. Asuthkar S, Demirkhanyan L, Sun X, Elustondo PA, Krishnan V, Baskaran P, et al. The TRPM8 protein is a testosterone receptor: II. Functional evidence for an ionotropic effect of testosterone on TRPM8. J Biol Chem. 30 janv 2015;290(5):2670-88.

270. Sagredo AI, Sagredo EA, Pola V, Echeverría C, Andaur R, Michea L, et al. TRPM4 channel is involved in regulating epithelial to mesenchymal transition, migration, and invasion of prostate cancer cell lines. Journal of Cellular Physiology. 2019;234(3):2037-50.

271. Nouri M, Ratther E, Stylianou N, Nelson CC, Hollier BG, Williams ED. Androgen-Targeted Therapy-Induced Epithelial Mesenchymal Plasticity and Neuroendocrine Transdifferentiation in Prostate Cancer: An Opportunity for Intervention. Front Oncol [Internet]. 23 déc 2014 [cité 18 mars 2020];4. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00370/abstract

272. Montanari M, Rossetti S, Cavaliere C, D'Aniello C, Malzone MG, Vanacore D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview. Oncotarget. 23 mai 2017;8(21):35376-89.

273. Li P, Yang R, Gao W-Q. Contributions of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells to the development of castration resistance of prostate cancer. Mol Cancer. 12 mars 2014;13:55.

274. McKeithen D, Graham T, Chung LWK, Odero-Marah V. Snail transcription factor regulates neuroendocrine differentiation in LNCaP prostate cancer cells. Prostate. 2010;n/a-n/a.

275. Pinto F, Pértega-Gomes N, Vizcaíno JR, Andrade RP, Cárcano FM, Reis RM. Brachyury as a potential modulator of androgen receptor activity and a key player in therapy resistance in prostate cancer. Oncotarget. 17 mai 2016;7(20):28891-902.

276. Chang Y-T, Lin T-P, Campbell M, Pan C-C, Lee S-H, Lee H-C, et al. REST is a crucial regulator for acquiring EMT-like and stemness phenotypes in hormone-refractory prostate cancer. Sci Rep. mars 2017;7(1):42795.

277. Clapham DE. Calcium signaling. Cell. 14 déc 2007;131(6):1047-58.

278. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. oct 2000;1(1):11-21.

279. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. juill 2003;4(7):517-29.

280. Cabanas H, Harnois T, Magaud C, Cousin L, Constantin B, Bourmeyster N, et al. Deregulation of calcium homeostasis in Bcr-Abl-dependent chronic myeloid leukemia. Oncotarget. 29 mai 2018;9(41):26309-27.

281. Stewart TA, Yapa KTDS, Monteith GR. Altered calcium signaling in cancer cells. Biochim Biophys Acta. oct 2015;1848(10 Pt B):2502-11.

282. Prakriya M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. Physiol Rev. oct 2015;95(4):1383-436.

283. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. Nat Rev Mol Cell Biol. 23 août 2012;13(9):549-65.

284. Mignen O, Shuttleworth TJ. I(ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca(2+) entry channel. J Biol Chem. 31 mars 2000;275(13):9114-9.

285. Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ. The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca2+-selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. J Physiol (Lond). 1 sept 2009;587(Pt 17):4181-97.

286. Thompson J, Mignen O, Shuttleworth TJ. The N-terminal domain of Orai3 determines selectivity for activation of the store-independent ARC channel by arachidonic acid. Channels (Austin). oct 2010;4(5):398-410.

287. Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ. STIM1 regulates Ca2+ entry via arachidonate-regulated Ca2+-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. J Physiol (Lond). 15 mars 2007;579(Pt 3):703-15.

288. Thompson JL, Shuttleworth TJ. Anchoring protein AKAP79-mediated PKA phosphorylation of STIM1 determines selective activation of the ARC channel, a store-independent Orai channel. J Physiol. 1 févr 2015;593(Pt 3):559-72.

289. Mignen O, Constantin B, Potier-Cartereau M, Penna A, Gautier M, Guéguinou M, et al. Constitutive calcium entry and cancer: updated views and insights. Eur Biophys J. juill 2017;46(5):395-413.

290. Cross BM, Hack A, Reinhardt TA, Rao R. SPCA2 Regulates Orai1 Trafficking and Store Independent Ca2+ Entry in a Model of Lactation. PLoS One [Internet]. 28 juin 2013 [cité 27 août 2020];8(6). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3696057/

291. Graham SJL, Dziadek MA, Johnstone LS. A cytosolic STIM2 preprotein created by signal peptide inefficiency activates ORAI1 in a store-independent manner. J Biol Chem. 6 mai 2011;286(18):16174-85.

292. Debant M, Burgos M, Hemon P, Buscaglia P, Fali T, Melayah S, et al. STIM1 at the plasma membrane as a new target in progressive chronic lymphocytic leukemia. J Immunother Cancer. 23 2019;7(1):111.

293. Hammadi M, Chopin V, Matifat F, Dhennin-Duthille I, Chasseraud M, Sevestre H, et al. Human ether à-gogo K(+) channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry. J Cell Physiol. déc 2012;227(12):3837-46.

294. Frischauf I, Schindl R, Derler I, Bergsmann J, Fahrner M, Romanin C. The STIM/Orai coupling machinery. Channels. 4 juill 2008;2(4):261-8.

295. Perrouin Verbe M-A, Bruyere F, Rozet F, Vandier C, Fromont G. Expression of store-operated channel components in prostate cancer: the prognostic paradox. Human Pathology. mars 2016;49:77-82.

296. Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphaël M, Vandenberghe M, Abeele FV, et al. Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. Cell Death Dis. sept 2010;1(9):e75-e75.

297. Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Gkika D, Guarmit B, Lepage G, et al. Remodeling of Channel-Forming ORAI Proteins Determines an Oncogenic Switch in Prostate Cancer. Cancer Cell. 14 juill 2014;26(1):19-32.

298. Guéguinou M, Chantôme A, Fromont G, Bougnoux P, Vandier C, Potier-Cartereau M. KCa and Ca(2+) channels: the complex thought. Biochim Biophys Acta. oct 2014;1843(10):2322-33.

299. Soboloff J, Spassova MA, Hewavitharana T, He L-P, Xu W, Johnstone LS, et al. STIM2 Is an Inhibitor of STIM1-Mediated Store-Operated Ca2+ Entry. Current Biology. 25 juill 2006;16(14):1465-70.

300. Berry PA, Birnie R, Droop AP, Maitland NJ, Collins AT. The calcium sensor STIM1 is regulated by androgens in prostate stromal cells. Prostate. nov 2011;71(15):1646-55.

301. Xu Y, Zhang S, Niu H, Ye Y, Hu F, Chen S, et al. STIM1 accelerates cell senescence in a remodeled microenvironment but enhances the epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. Sci Rep [Internet]. 10 août 2015 [cité 1 sept 2020];5. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4530453/

302. Yang Z-H, Wang X-H, Wang H-P, Hu L-Q. Effects of TRPM8 on the proliferation and motility of prostate cancer PC-3 cells. Asian J Androl. mars 2009;11(2):157-65.

303. Gkika D, Flourakis M, Lemonnier L, Prevarskaya N. PSA reduces prostate cancer cell motility by stimulating TRPM8 activity and plasma membrane expression. Oncogene. 12 août 2010;29(32):4611-6.

304. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca2+-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. Oncogene. oct 2003;22(49):7858-61.

305. Zhao X, Guo H, Liu G, Ji C, Zhang S, Liu T, et al. [Inhibitory effect of TRPV6 silencing on prostate cancer cell line LNCaP in vitro]. Zhonghua Nan Ke Xue. mai 2010;16(5):423-7.

306. Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, et al. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. Cancer Res. 1 févr 2010;70(3):1225-35.

307. Hu J, Reyes-Cruz G, Goldsmith PK, Spiegel AM. The Venus's-flytrap and cysteine-rich domains of the human Ca2+ receptor are not linked by disulfide bonds. J Biol Chem. 9 mars 2001;276(10):6901-4.

308. Tennakoon S, Aggarwal A, Kállay E. The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. juin 2016;1863(6):1398-407.

309. Saidak Z, Brazier M, Kamel S, Mentaverri R. Agonists and Allosteric Modulators of the Calcium-Sensing Receptor and Their Therapeutic Applications. Mol Pharmacol. déc 2009;76(6):1131-44.

310. Smith K, Ayon R, Tang H, Makino A, Yuan J. Calcium-Sensing Receptor Regulates Cytosolic [Ca2+] and Plays a Major Role in the Development of Pulmonary Hypertension. Frontiers in Physiology. 4 nov 2016;7.

311. The calcium-sensing receptor (CaSR) defends against hypercalcemia independently of its regulation of parathyroid hormone secretion - PubMed [Internet]. [cité 3 sept 2020]. Disponible sur: https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/19797241/

312. Brennan SC, Thiem U, Roth S, Aggarwal A, Fetahu ISh, Tennakoon S, et al. Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 1 juill 2013;1833(7):1732-44.

313. Aguirre A, González A, Planell JA, Engel E. Extracellular calcium modulates in vitro bone marrow-derived Flk-1+ CD34+ progenitor cell chemotaxis and differentiation through a calcium-sensing receptor. Biochem Biophys Res Commun. 26 févr 2010;393(1):156-61.

314. Canaff L, Zhou X, Hendy GN. The Proinflammatory Cytokine, Interleukin-6, Up-regulates Calcium-sensing Receptor Gene Transcription via Stat1/3 and Sp1/3*. Journal of Biological Chemistry. 16 mai 2008;283(20):13586-600.

315. Lin K-I, Chattopadhyay N, Bai M, Alvarez R, Dang CV, Baraban JM, et al. Elevated Extracellular Calcium Can Prevent Apoptosis via the Calcium-Sensing Receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications. 19 août 1998;249(2):325-31.

316. doi:10.1016/S0003-4266(06)72540-9 | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 3 sept 2020]. Disponible sur: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0003426606725409?token=EBBA0D73843CCB4A12DC9FBE554C47222C876B037B68A4CED1B6F2CF7C23F638A66EE56C727796B353FBA53BCECBDB19

317. Campos-Verdes LM, Costa-Silva DR, da Silva-Sampaio JP, Barros-Oliveira M da C, Escórcio-Dourado CS, Martins LM, et al. Review of Polymorphism of the Calcium-Sensing Receptor Gene and Breast Cancer Risk. Cancer Investigation. 7 févr 2018;36(2):1-7.

318. Jeong S, Kim JH, Kim MG, Han N, Kim I-W, Kim T, et al. Genetic polymorphisms of CASR and cancer risk: evidence from meta-analysis and HuGE review. Onco Targets Ther. 2016;9:655-69.

319. Casalà C, Gil-Guiñón E, Ordóñez JL, Miguel-Queralt S, Rodríguez E, Galván P, et al. The calcium-sensing receptor is silenced by genetic and epigenetic mechanisms in unfavorable neuroblastomas and its reactivation induces ERK1/2-dependent apoptosis. Carcinogenesis. févr 2013;34(2):268-76.

320. Saidak Z, Mentaverri R, Brown EM. The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. Endocr Rev. avr 2009;30(2):178-95.

321. Ahearn TU, Tchrakian N, Wilson KM, Lis R, Nuttall E, Sesso HD, et al. Calcium-Sensing Receptor Tumor Expression and Lethal Prostate Cancer Progression. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(6):2520-7.

322. Liao J, Schneider A, Datta NS, McCauley LK. Extracellular Calcium as a Candidate Mediator of Prostate Cancer Skeletal Metastasis. Cancer Res. 15 sept 2006;66(18):9065-73.

323. Huang C, Miller RT, Freter CE. Signaling regulation and role of filamin A cleavage in Ca2+-stimulated migration of androgen receptor-deficient prostate cancer cells. Oncotarget. 17 janv 2017;8(3):3840-53.

324. Bernichtein S, Pigat N, Barry Delongchamps N, Boutillon F, Verkarre V, Camparo P, et al. Vitamin D3 Prevents Calcium-Induced Progression of Early-Stage Prostate Tumors by Counteracting TRPC6 and Calcium Sensing Receptor Upregulation. Cancer Res. 15 2017;77(2):355-65.

325. Yamamura A, Nayeem MJ, Sato M. Calcilytics inhibit the proliferation and migration of human prostate cancer PC-3 cells. Journal of Pharmacological Sciences. mars 2019;139(3):254-7.

326. Feng J, Xu X, Li B, Brown E, Farris AB, Sun S-Y, et al. Prostate cancer metastatic to bone has higher expression of the calcium-sensing receptor (CaSR) than primary prostate cancer. Receptors Clin Investig [Internet]. 2014 [cité 6 mai 2021];1(6). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4459757/

327. Girault A, Haelters J-P, Potier-Cartereau M, Chantôme A, Jaffrés P-A, Bougnoux P, et al. Targeting SKCa channels in cancer: potential new therapeutic approaches. Curr Med Chem. 2012;19(5):697-713.

328. Roderick HL, Cook SJ. Ca 2+ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca 2+ for cancer cell proliferation and survival. Nature Reviews Cancer. mai 2008;8(5):361-75.

329. S T, M F, K V, F V, M R, V L, et al. Differential role of transient receptor potential channels in Ca2+ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells [Internet]. Vol. 66, Cancer research. Cancer Res; 2006 [cité 25 août 2020]. Disponible sur: https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/16489003/

330. U W, B N, N H, T F, H B, V F. TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca2+ channel expression [Internet]. Vol. 322, Biochemical and biophysical research communications. Biochem Biophys Res Commun; 2004 [cité 25 août 2020]. Disponible sur: https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/15336984/

331. Sun Y, Sukumaran P, Varma A, Derry S, Sahmoun AE, Singh BB. Cholesterol-induced activation of TRPM7 regulates cell proliferation, migration, and viability of human prostate cells. Biochim Biophys Acta. sept 2014;1843(9):1839-50.

332. Valero ML, Mello de Queiroz F, Stühmer W, Viana F, Pardo LA. TRPM8 ion channels differentially modulate proliferation and cell cycle distribution of normal and cancer prostate cells. PLoS ONE. 2012;7(12):e51825.

333. Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B, Jacobson K. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. Nature. 22 juill 1999;400(6742):382-6.

334. Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song L-S, Cheng H. Calcium Flickers Steer Cell Migration. Nature. 12 févr 2009;457(7231):901-5.

335. Monet M, Gkika D, Lehen'kyi V, Pourtier A, Vanden Abeele F, Bidaux G, et al. Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. Biochim Biophys Acta. mars 2009;1793(3):528-39.

336. Prevarskaya N, Skryma R, Bidaux G, Flourakis M, Shuba Y. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. Cell Death Differ. juill 2007;14(7):1295-304.

337. Ardura JA, Álvarez-Carrión L, Gutiérrez-Rojas I, Alonso V. Role of Calcium Signaling in Prostate Cancer Progression: Effects on Cancer Hallmarks and Bone Metastatic Mechanisms. Cancers. mai 2020;12(5):1071.

338. Silvestri R, Pucci P, Venalainen E, Matheou C, Mather R, Chandler S, et al. T-type calcium channels drive the proliferation of androgen-receptor negative prostate cancer cells. The Prostate. 2019;79(13):1580-6.

339. Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, et al. CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. J Biol Chem. 11 avr 2008;283(15):10162-73.

340. Wang N, Yao M, Xu J, Quan Y, Zhang K, Yang R, et al. Autocrine Activation of CHRM3 Promotes Prostate Cancer Growth and Castration Resistance via CaM/CaMKK-Mediated Phosphorylation of Akt. Clin Cancer Res. 15 oct 2015;21(20):4676-85.

341. Boutin B, Tajeddine N, Monaco G, Molgo J, Vertommen D, Rider M, et al. Endoplasmic reticulum Ca2+ content decrease by PKA-dependent hyperphosphorylation of type 1 IP3 receptor contributes to prostate cancer cell resistance to androgen deprivation. Cell Calcium. avr 2015;57(4):312-20.

342. Vanoverberghe K, Abeele FV, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal J, et al. Ca2 þ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. Cell Death and Differentiation. :10.

343. Mariot P, Vanoverberghe K, Lalevée N, Rossier MF, Prevarskaya N. Overexpression of an α_{1H} (Ca_v 3.2) T-type Calcium Channel during Neuroendocrine Differentiation of Human Prostate Cancer Cells. J Biol Chem. 29 mars 2002;277(13):10824-33.

344. Vanoverberghe K, Lehen'kyi V, Thébault S, Raphaël M, Vanden Abeele F, Slomianny C, et al. Cytoskeleton Reorganization as an Alternative Mechanism of Store-Operated Calcium Entry Control in Neuroendocrine-Differentiated Cells. Rota R, éditeur. PLoS ONE. 25 sept 2012;7(9):e45615.

345. 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. 31 juill 2014;371(5):424-33.

346. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin M-E, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. N Engl J Med. 27 sept 2012;367(13):1187-97.

347. Hirano D, Okada Y, Minei S, Takimoto Y, Nemoto N. Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. Eur Urol. mai 2004;45(5):586-92; discussion 592.

348. Stark TW, Hensley PJ, Spear A, Pu H, Strup SS, Kyprianou N. Predictive value of epithelial-mesenchymal-transition (EMT) signature and PARP-1 in prostate cancer radioresistance. Prostate. déc 2017;77(16):1583-91.

349. Bery F, Figiel S, Kouba S, Fontaine D, Guéguinou M, Potier-Cartereau M, et al. Hypoxia Promotes Prostate Cancer Aggressiveness by Upregulating EMT-Activator Zeb1 and SK3 Channel Expression. Int J Mol Sci. 6 juill 2020;21(13).

350. Bery F, Cancel M, Chantôme A, Guibon R, Bruyère F, Rozet F, et al. The Calcium-Sensing Receptor is A Marker and Potential Driver of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. Cancers (Basel). 2 avr 2020;12(4).

351. Figiel S, Pasqualin C, Bery F, Maupoil V, Vandier C, Potier-Cartereau M, et al. Functional Organotypic Cultures of Prostate Tissues. The American Journal of Pathology. juin 2019;189(6):1268-75.

352. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer. oct 2003;3(10):721-32.

353. Tam SY, Wu VWC, Law HKW. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1α and Beyond. Front Oncol. 8 avr 2020;10:486.

354. Yu S, Xu Z, Zou C, Wu D, Wang Y, Yao X, et al. Ion channel TRPM8 promotes hypoxic growth of prostate cancer cells via an O2-independent and RACK1-mediated mechanism of HIF-1α stabilization. The Journal of Pathology. 2014;234(4):514-25.

355. Wang T, Li N, Jin L, Qi X, Zhang C, Hua D. The calcium pump PMCA4 prevents epithelial-mesenchymal transition by inhibiting NFATc1-ZEB1 pathway in gastric cancer. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. déc 2020;1867(12):118833.

356. Bhattacharya A, Kumar J, Hermanson K, Sun Y, Qureshi H, Perley D, et al. The calcium channel proteins ORAI3 and STIM1 mediate TGF-β induced Snai1 expression. Oncotarget. 29 juin 2018;9(50):29468-83.

357. Liu L, Wu N, Wang Y, Zhang X, Xia B, Tang J, et al. TRPM7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer through the calcium-related PI3K / AKT oncogenic signaling. J Exp Clin Cancer Res. 28 févr 2019;38(1):106.

358. Saini RK, Keum Y-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. Life Sci. 15 juin 2018;203:255-67.

359. Ouldamer L, Goupille C, Vildé A, Arbion F, Body G, Chevalier S, et al. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Origin and Multifocality in Human Breast Cancer. PLoS One. 2016;11(1):e0147148.

360. Oono K, Takahashi K, Sukehara S, Kurosawa H, Matsumura T, Taniguchi S, et al. Inhibition of PC3 human prostate cancer cell proliferation, invasion and migration by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. Mol Clin Oncol. août 2017;7(2):217-20.

361. O'Flaherty JT, Hu Y, Wooten RE, Horita DA, Samuel MP, Thomas MJ, et al. 15-lipoxygenase metabolites of docosahexaenoic acid inhibit prostate cancer cell proliferation and survival. PLoS One. 2012;7(9):e45480.

362. Kelavkar UP, Hutzley J, McHugh K, Allen KGD, Parwani A. Prostate tumor growth can be modulated by dietarily targeting the 15-lipoxygenase-1 and cyclooxygenase-2 enzymes. Neoplasia. juill 2009;11(7):692-9.

363. Gelsomino G, Corsetto PA, Campia I, Montorfano G, Kopecka J, Castella B, et al. Omega 3 fatty acids chemosensitize multidrug resistant colon cancer cells by down-regulating cholesterol synthesis and altering detergent resistant membranes composition. Mol Cancer. 13 nov 2013;12:137.

364. Bougnoux P, Hajjaji N, Couet C. The lipidome as a composite biomarker of the modifiable part of the risk of breast cancer. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. nov 2008;79(3-5):93-6.

365. Laurent V, Guérard A, Toulet A, Valet P, Malavaud B, Muller C. [Dissemination of prostate cancer: a way paved of fat]. Med Sci (Paris). juill 2016;32(6-7):563-5.

366. Sasaki T, Komiya A, Suzuki H, Shimbo M, Ueda T, Akakura K, et al. Changes in chromogranin a serum levels during endocrine therapy in metastatic prostate cancer patients. Eur Urol. août 2005;48(2):224-9; discussion 229-230.

367. Berruti A, Mosca A, Tucci M, Terrone C, Torta M, Tarabuzzi R, et al. Independent prognostic role of circulating chromogranin A in prostate cancer patients with hormone-refractory disease. Endocr Relat Cancer. mars 2005;12(1):109-17.

368. Bonkhoff H, Wernert N, Dhom G, Remberger K. Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. Prostate. 1991;19(2):91-8.

369. Mounir Z, Lin F, Lin VG, Korn JM, Yu Y, Valdez R, et al. TMPRSS2:ERG blocks neuroendocrine and luminal cell differentiation to maintain prostate cancer proliferation. Oncogene. juill 2015;34(29):3815-25.

370. Grant MP, Stepanchick A, Cavanaugh A, Breitwieser GE. Agonist-driven maturation and plasma membrane insertion of calcium-sensing receptors dynamically control signal amplitude. Sci Signal. 22 nov 2011;4(200):ra78.

371. Jin RJ, Wang Y, Masumori N, Ishii K, Tsukamoto T, Shappell SB, et al. NE-10 neuroendocrine cancer promotes the LNCaP xenograft growth in castrated mice. Cancer Res. 1 août 2004;64(15):5489-95.

372. Gabel M, Delavoie F, Vitale N, Bader M-F, Chasserot-Golaz S. [Actin and annexin A2: essential partners for the control of neuroendocrine secretion]. Med Sci (Paris). juill 2016;32(6-7):553-5.

373. Hermanson KJ, Bhattacharya A, Dhasarathy AJ. Targeting Calcium Channels to prevent EMT. The FASEB Journal. 2019;33(S1):647.11-647.11.

374. Soundararajan R, Paranjape AN, Maity S, Aparicio A, Mani SA. EMT, stemness and tumor plasticity in aggressive variant neuroendocrine prostate cancers. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2018;1870(2):229-38.

375. Huss WJ, Gregory CW, Smith GJ. Neuroendocrine cell differentiation in the CWR22 human prostate cancer xenograft: association with tumor cell proliferation prior to recurrence. Prostate. 1 juill 2004;60(2):91-7.

376. Wright ME, Tsai M-J, Aebersold R. Androgen Receptor Represses the Neuroendocrine Transdifferentiation Process in Prostate Cancer Cells. Molecular Endocrinology. sept 2003;17(9):1726-37.

377. Dang Q, Li L, Xie H, He D, Chen J, Song W, et al. Anti-androgen enzalutamide enhances prostate cancer neuroendocrine (NE) differentiation *via* altering the infiltrated mast cells → androgen receptor (AR) → miRNA32 signals. Molecular Oncology. août 2015;9(7):1241-51.

378. Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. Cancer Cell. 14 oct 2013;24(4):466-80.

379. Yoast RE, Emrich SM, Zhang X, Xin P, Johnson MT, Fike AJ, et al. The native ORAI channel trio underlies the diversity of Ca2+ signaling events. Nat Commun. déc 2020;11(1):2444.

Fanny BERY

Rôle de la signalisation calcique et de la transition épithélio-mésenchymateuse dans l'agressivité et la différenciation neuroendocrine du cancer de la prostate.

Résumé

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) participe à l'agressivité du cancer de la prostate (CaP). Nous avons identifié une nouvelle voie de signalisation impliquée dans la progression tumorale et initiée par le TGFβ et l'hypoxie, deux inducteurs de la TEM. Il existe une boucle calcium-dépendante entre Zeb1, facteur clé de la TEM, et le canal SK3, pouvant être inhibée par l'acide linoléique et l'acide eicosapentaénoïque, acides gras inversement corrélés à l'agressivité du CaP. Les thérapies ciblant le récepteur aux androgènes peuvent induire des réponses adaptatives telles que la TEM et la différenciation neuroendocrine (NE). Nous avons montré que le récepteur sensible au calcium est un marqueur et un promoteur de la différenciation NE des cellules du CaP. Dans les CaP résistants à la castration, nous avons observé une augmentation de l'expression de Zeb1 et SK3. L'enzalutamide, hormonothérapie de nouvelle génération, peut induire l'expression de ces deux gènes et favoriser la différenciation NE. Le ciblage du canal SK3 pourrait constituer une stratégie thérapeutique pour lutter contre la progression et l'agressivité du CaP.

Mots clés : Cancer de la prostate, signalisation calcique, transition épithélio-mésenchymateuse, différenciation neuroendocrine.

Résumé en anglais

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is involved in prostate cancer (PCa) aggressiveness. We identified a new signalling pathway involved in tumor progression and initiated by TGFβ and hypoxia, two EMT inducers. We demonstrated a calcium-dependent loop between Zeb1, a key EMT factor, and SK3 channel, inhibited by linoleic and eicosapentaenoic acids, two fatty acids inversely associated with PCa aggressiveness. Therapies targeting the androgen receptor can induce adaptative responses such as EMT and neuroendocrine (NE) differentiation. We showed that the calcium sensing receptor is a marker and driver of NE differentiation of PCa cells. In castration-resistant PCa, we observed an increase in the expression of Zeb1 and SK3. Enzalutamide, a new generation hormonotherapy, can induce Zeb1 and SK3 expression and promote NE differentiation of PCa cells. Targeting SK3 channel could be a therapeutic strategy to prevent PCa progression and aggressiveness.

Key words: Prostate cancer, calcium signalling, epithelial to mesenchymal transition, neuroendocrine differentiation.