

UNIVERSITE LILLE

École Doctorale Biologie- Santé Lille-Nord de France

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

Présentée et soutenue par

Mandy DUMORTIER

À Lille, Le 21 Décembre 2017

Étude du rôle des facteurs de transcription ETV4 et ETV1 de la famille ETS dans le processus tumoral de cancers hormono-dépendants : - le cancer du sein - la progression métastatique du cancer de la prostate

Directrice de thèse

Pr Anne Chotteau-Lelièvre

Composition du jury :

Président : Pr Yvan de Launoit, CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille

Rapporteurs :

Dr Anne Chauchereau, INSERM U 981, Institut Gustave Roussy, Paris

Pr Antoine Galmiche, CHU Amiens

Examineurs :

Dr Ivan Bièche, Institut Curie, Paris

Pr Anne Chotteau-Lelièvre, CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille

CNRS UMR8161 Mécanismes de la Tumorigenèse et Thérapies Ciblées

Équipe 7: ETS Proteins and Associated diseases

Remerciements

Après ces nombreuses années, quatre plus précisément passées au troisième étage de l'Institut de Biologie de Lille, il est temps de terminer cette belle expérience en remerciant comme il se doit toutes les personnes ayant participées de près ou de loin à mon projet, les personnes m'ayant entourées et soutenues.

Merci à l'**École Doctorale Biologie-Santé de Lille**, ainsi qu'à l'**Université de Lille** pour avoir financé et m'avoir permis d'effectuer ces travaux de thèse.

Merci aux membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, d'avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce manuscrit. Merci au professeur **Yvan de Launoit** d'avoir accepté d'être le président de ce jury, je vous remercie également de m'avoir accueillie au sein de l'UMR8161, pour vos conseils et pour le partage de vos connaissances et de votre expérience lors des différentes réunions d'équipes. Merci au docteur **Anne Chauchereau** et au professeur **Antoine Galmiche** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, ainsi qu'au docteur **Ivan Bièche** et au professeur **Anne Chotteau-Lelièvre** d'avoir accepté d'être mes examinateurs.

Merci au docteur **Lehenkyi Vyacheslav** et au docteur **Ivan Bièche** d'avoir participé à l'évaluation et à l'avancement du projet lors de mes deux Comités de Suivi de Thèse.

Merci à ma directrice de thèse, le professeur **Anne Chotteau-Lelièvre**, tout d'abord merci de m'avoir donné ma chance en m'accueillant lors de mon stage de Master 1, une expérience dans la recherche qui m'a permise de découvrir un peu mieux ce milieu et qui m'a donné l'envie de poursuivre dans cette voie. Merci de m'avoir permis de poursuivre mon projet en effectuant mon année de Master 2 puis de m'avoir donnée tous les outils nécessaires à la réalisation du projet de thèse. Merci pour le temps que vous m'avez accordé, pour votre pédagogie et votre oreille attentive. Vous êtes un exemple d'organisation et de rigueur pour moi.

Merci au docteur **Martine Duterque-Coquillaud**, de m'avoir accueillie au sein de votre équipe, merci pour vos nombreux conseils et votre regard critique sur les différents projets lors des différentes réunions.

Merci, à **Isabelle Damour**, avec qui j'ai eu la chance de travailler sur l'ensemble des projets. Tout d'abord, merci de m'avoir formé, transmis tes connaissances techniques et pour tous les conseils que tu m'as apportés. Mais avant tout je te remercie d'avoir été là pour moi et d'avoir eu une oreille attentive que ce soit au niveau professionnel ou au niveau personnel. Je te souhaite réellement à toi et à ta famille une bonne santé.

Merci « aux filles » **Nathalie Vampouille** et **Anne-Claire Flourens**, pour les moments que nous avons pu partager autour d'un thé. Merci pour vos conseils techniques, votre gentillesse et votre bonne humeur, vous faites parties avec **Isabelle** de la chaleur et de la convivialité de cette dent 3.

Merci aux autres membres de l'équipe toujours présents ou non, **Anthony Turpin**, **Rachel Deplus**, **Alice Pham-Becker** et **Nuria Balibrea** pour votre sympathie et pour certains votre rire communicatif. Merci à **Carine Delliaux** avec qui j'ai partagé de nombreux moments et discussions. J'espère que ta nouvelle vie au pays des caribous est à la hauteur de tes attentes.

Merci aux différentes personnes qui m'ont aidées grâce à leurs formations lors de ma thèse, **Elizabeth Werkmeister** pour la microscopie, **Sophie Salome** pour le Lumina et **Nathalie Marchant** pour l'expérimentation animale.

Merci à tous les membres de l'UMR8161 que j'ai eu la chance de rencontrer, **Rémi**, **Mélanie** (petit bouchon), **Nadège**, **Racha** vous avez été mon petit groupe d'amis lors de mon arrivée dans l'unité et j'espère que vous êtes tous épanouis dans vos projets respectifs. Lors du changement d'équipe j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses autres personnes incroyables et attachantes. Je voudrais ainsi remercier les filles du bureau, **Sarah**, **Sameh** et **Shaema**. **Sarah** surtout ne change pas tu es une fille pétillante avec un cœur en or, je pense que tu es l'âme de ce bureau. Merci à **Rami** pour ton soutien et ta gentillesse. Merci à l'équipe IRCV aussi appelée équipe Vampire, avec qui j'ai eu la chance d'échanger de nombreux goûters d'anniversaire, merci à **Alexandre** toujours le petit mot pour rire, sa complice **Anne**, merci à **Olivier** et à Madame le docteur **Nadira Delhem** comme le disait si bien Laurissa, **Chantal**, **Romuald**, **Celine** et **Hamza**, pour votre gentillesse.

Merci à la petite équipe de 11h30, **Nicole** pour ta gentillesse, ta réactivité afin de faire en sorte que tout aille aussi vite que possible. Merci à **Ingrid, Vanessa, Gaëlle, Amélie** pour ces moments de rires, de bonnes humeurs et de détente qui font que les pauses déjeuners étaient toujours si particulières, grâce à vous je connais les joies d'avoir des enfants ☺.

Merci à ma petite **Sonia**, le petit Bisounours de la dent 2, tu as été une véritable amie durant mes 4 années au laboratoire. Les derniers mois passés sans notre petite routine du train, du petit déjeuner sur la route et nos confidences m'ont cruellement manqués. Tu as été d'un énorme réconfort aux mauvaises périodes de ma vie. Tu es une fille adorable et exceptionnelle je te souhaite le meilleur à toi, à ta petite Naomie. et à Sylvain. Surtout reste comme tu es !

Merci à **Mélanie**, ma binôme de TP, j'ai eu la chance de te connaître lors de mon changement de fac et je suis très heureuse de cette rencontre. Même si nos vies respectives font que l'on reste parfois de longs moments sans nous voir tu es toujours une oreille attentive et un soutien à toutes épreuves. Merci pour toutes ces sorties que je ne suis pas prête d'oublier. Je te souhaite un bon courage pour la rédaction de ta thèse !

Merci aux amis de longue date, sur qui je peux m'appuyer : **Marion**, l'amie en or dont tout le monde rêve, on a partagé tellement de souvenirs que rien que d'y penser j'en rigole. **JB**, la première lettre du fameux JMM un trio formé il y a maintenant 8 ans et qui j'espère va rester encore de nombreuses années! **Pauline** la discrète, **Yves** toujours le mot pour rire, merci pour les moments que l'on a partagés et notamment lors de nos dernières vacances. **Antho** et **Caro** le petit couple de geek à qui je souhaite plein de bonheur. Merci à **Jack** qui a eu le courage de supporter nos nombreuses conversations de biologie, merci également pour ta patience lors des nombreux moments où je t'ai emprunté ta femme pour nos sorties filles. Merci également à **Jeff** pour ces soirées inoubliables passées à Monaco, où ton humour était toujours au rendez-vous.

Merci à **Fanny**, ma meilleure amie, même si nos tempéraments de feu font souvent des étincelles, je sais que tu es une des personnes sur lesquelles je peux compter en toutes circonstances et à n'importe quelle heure du jour et de la nuit. Merci pour nos moments purement fille, de rires, de déprime, de plans sur la comète. Je te souhaite

vraiment de t'épanouir dans ton futur projet et nouvelle vie ! N'abuse pas trop de « L'oh à la bouche » ☺ !

Merci à mon club de sport et tout particulièrement à **Dorothée, Lucie, Adrien, Sébastien** et au coach **Christian**. Merci pour toutes ces heures passées à se surpasser, à améliorer chaque mouvement technique et au renforcement de mes « petites cannes ». Merci à mon coach pour sa patience et ses conseils. Merci à **Dorothée et Lucie** qui sont devenues de vraies amies.

Merci à ma famille ma sœur **Elodie**, mon frère **Johan** de m'avoir supporté toutes ces années et de m'avoir toujours soutenue, vous êtes les meilleurs, merci à mon parrain **Mickael** et à **Catherine** pour tout ces moments chaleureux passés en famille.

Merci à mon chéri **Pierre** ! Tu as été la locomotive de ma vie durant ces derniers mois. Merci de m'avoir soutenu et préparé de bons petits plats pendant toute la période de rédaction. Merci de m'avoir offert une nouvelle vision de la vie, tu m'as appris à avoir un peu plus confiance en moi et cela n'était pas gagné. Je sais maintenant grâce à toi tout est possible et qu'il faut avoir confiance en l'avenir.

Merci à mes **parents**, pour qui je ne pourrais jamais exprimer assez de gratitude quant à leur gentillesse, leur soutien et leur présence dans les bons et les mauvais moments. Je ne pouvais rêver avoir de meilleurs parents, vous êtes un exemple de force, de courage et d'amour pour moi.

Sommaire :

RÉSUMÉ	1
ABSTRACT	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ANNEXES	14
INTRODUCTION	16
Partie I: Les facteurs de transcription ETS	17
1 Origine et évolution des facteurs de transcription ETS	17
2 Domaines fonctionnels des facteurs ETS	18
2.1 Le domaine ETS.....	18
2.2 Le domaine Pointed (HLH)	19
2.3 Autres domaines.....	20
3 Régulation de l'expression des gènes cibles	22
3.1 Formation de complexes ternaires	22
3.2 Coopération avec d'autres facteurs de transcription	24
3.3 Interaction entre les facteurs ETS et certains motifs protéiques	25
3.4 Coopération avec des co-facteurs	26
4 Implication biologique du groupe PEA3 (ETV1, ETV4 et ETV5)	27
4.1 Implication dans la formation osseuse	28
4.2 Implication dans la fertilité	28
4.3 Implication lors de la placentation	29
4.4 Implication dans la formation du système nerveux.....	29
4.5 Implication dans l'organogenèse.....	31
4.5.1 Morphogenèse de branchement des poumons	31
4.5.2 Morphogenèse de branchement des reins	31
5 Implication des facteurs PEA3 au niveau pathologique	32
Partie II: L'implication du facteur ETV4 dans la tumorigenèse mammaire (TM)	33

1	La glande mammaire	33
1.1	Anatomie et fonction de la glande mammaire.....	33
1.2	Organogenèse de la glande mammaire	34
1.2.1	Développement embryonnaire de la glande mammaire	34
1.2.2	Développement de la glande mammaire lors de la puberté	35
1.2.3	Développement de la glande mammaire lors de la gestation et de la lactation	36
1.2.4	Involution de la glande mammaire	36
1.3	Implication du groupe PEA3 dans le développement de la glande mammaire	37
2	Généralités sur le cancer du sein	38
2.1	Incidence et mortalité du cancer du sein	38
2.2	Biologie du cancer du sein	38
2.2.1	Implication du microenvironnement tumoral.....	39
2.2.2	Rôle de l'hypoxie dans le métabolisme tumoral	40
2.2.3	Développement de l'angiogenèse lors du processus d'invasion.....	40
2.2.4	L'implication des exosomes dans la tumorigenèse mammaire	41
2.2.5	Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Figure 10)	41
2.2.6	Voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse	42
2.3	Classification moléculaire du cancer du sein	42
2.3.1	Luminal	42
2.3.2	Type HER2	43
2.3.3	Type basal-like.....	43
2.3.4	Cancer du sein triple-négatif.....	43
3	Implication du facteur de transcription ETV4 dans le cancer du sein.....	44
3.1	Surexpression de ETV4 dans le cancer du sein	44
3.2	Mécanismes et voies de signalisation impliqués dans la surexpression de ETV4.....	45
3.2.1	Voie Wnt1/ β -caténine et ETV4 dans le cancer du sein	45
3.2.2	Association HER2/neu et ETV4 dans le cancer du sein	46
3.3	Dérégulation des gènes cibles d'ETV4 participant au cancer du sein	47
3.3.1	Gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse	48
3.3.2	Gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire	49
4	La métalloprotéase MMP13.....	50
4.1	Généralités sur les métalloprotéases	50
4.1.1	Classification	50
4.1.2	Régulation des MMPs.....	52
4.2	La collagénase MMP13	54

4.3	Régulation de MMP13	54
4.3.1	Au niveau transcriptionnel	54
4.3.2	Régulation de MMP13 par des différents facteurs	54
4.3.3	Régulation par les cytokines	55
4.4	Rôle physiologique.....	55
4.4.1	Substrats de MMP13.....	55
4.4.2	Rôle dans l'ossification	56
4.5	Implication pathologique de MMP13	57
4.5.1	Dans les pathologies inflammatoires.....	57
4.5.2	Dans le cancer	57
Partie III: Implication du facteur ETV1 dans le cancer de la prostate (CaP)		60
1	La glande prostatique.....	60
1.1	Organogenèse prostatique	60
1.2	Différents types cellulaires de la prostate	60
1.3	Anatomie de la prostate.....	62
1.4	Rôles de la prostate	63
2	Généralités sur le cancer de la prostate	64
2.1	Épidémiologie du cancer de la prostate	64
2.2	Dépistage du CaP	65
2.3	Classification du CaP	66
2.3.1	Le score de Gleason.....	67
2.3.2	La classification TNM	69
2.3.3	La classification d'Amico	70
2.4	Thérapies utilisées dans la lutte contre le CaP	70
2.4.1	Traitement différé, surveillance active ou abstention de surveillance clinique	73
2.4.2	La chirurgie	73
2.4.3	La curiethérapie.....	74
2.4.4	La radiothérapie (TR)	74
2.4.5	La chimiothérapie.....	74
2.4.6	L'hormonothérapie (HT)	75
2.4.7	Dans le cas des cancers de la prostate résistants à la castration (CRPC).....	75
3	Implication des androgènes dans le CaP.....	76
3.1	Biosynthèse des androgènes	76
3.2	Activation du récepteur aux androgènes.....	77
3.3	Implication d'AR dans le cancer de le CRPC	78

3.3.1	Amplification et hypersensibilité d'AR	78
3.3.2	Mutation d'AR	79
3.3.3	Co-activateurs et co-répresseurs d'AR.....	79
3.3.4	Activation aberrante d'AR	79
3.3.5	Variants d'AR.....	80
3.3.6	Stéroïdogénèse alternative	80
4	Altérations génétiques dans le CaP	81
4.1	TP53 (Tumor protein p53).....	81
4.2	PTEN (Phosphate and Tensin Homolog).....	81
4.3	KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog)	82
4.4	Rb (retinoblastoma protein).....	82
4.5	Myc	83
5	Les métastases osseuses dans le CaP	83
5.1	Généralités sur les métastases osseuses	83
5.2	Différents types de métastases osseuses	84
5.3	Mécanisme de formation des métastases osseuses	84
6	Les fusions de gènes dans le CaP.....	86
6.1	Historique de la découverte des fusions de gènes dans le CaP	86
6.2	Diversité des fusions ETS dans le CaP.....	87
6.2.1	Gènes et promoteurs impliqués	87
6.2.2	Longueur des transcrits	89
6.3	Prévalence des différentes fusions ETS dans le CaP	89
6.4	Notion de CaP multifocal	90
6.5	Implication des fusions de gènes dont ETV1 dans le CaP.....	92
6.5.1	Mécanisme des fusions de gènes.....	92
6.5.2	Implication de ces translocations	92
6.6	Fonctions biologiques des facteurs ETV1 et ERG dans le CaP	93
6.6.1	Impact de la surexpression d'ETV1 ou ERG	93
6.6.2	Association de la surexpression d'ETV1 ou ERG à la perte de PTEN	94
6.6.3	Existe t-il des différences entre les fusions ERG et ETV1 ?.....	94
7.	Conclusion.....	96
	Présentation et contexte du projet de thèse	97
	Partie I:	99

La métalloprotéase 13 relais du facteur de transcription ETV4 dans la tumorigenèse mammaire	99
Contexte: Partie I.....	100
Résultats Partie I :	102
Discussion et Conclusion Partie I :	140
Contexte: Partie II.....	145
Étude de l'implication du facteur de transcription ETV1 dans la formation des métastases du cancer de la prostate.....	145
Matériels et Méthodes Partie II.....	149
1 Oligonucléotides utilisés.....	150
2 Stratégie de clonage.....	151
3 Mesure de la prolifération cellulaire par l'Incucyte® (SARTORIUS)	155
4 Injection en intra cardiaque	155
Résultats Partie II:.....	157
1 Comparaison du statut d'expression du facteur ETV1 dans les lignées cancéreuses prostatiques MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M.....	158
2 Établissement des modèles cellulaires nécessaires à notre étude.....	160
2.2 Modèles cellulaires MDA-PCa-2b de répression de l'expression du facteur ETV1 ..	161
2.3 Modèles cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M de surexpression de l'expression du facteur ETV1	161
3 Exploration du rôle d'ETV1 dans les propriétés des cellules prostatiques cancéreuses MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M	164
3.1 Cas de la répression du facteur ETV1 dans les MDA-PCa-2b.....	164
3.2 Cas de la surexpression du facteur ETV1.....	165
4. Exploration du rôle du facteur ETV1 dans la métastase prostatique	171
5. Données préliminaires sur SPARC, un gène cible et potentiel relais des effets d'ETV1 dans la tumorigenèse prostatique	178

6. Etude de la corrélation d'expression du facteur ETV1 dans une cohorte de tumeurs prostatiques	180
6.1 Analyse de la représentativité du facteur ETV1 dans une cohorte de tumeurs prostatiques	180
6.2 Analyse de la représentativité de la forme tronquée d'ETV1 dans une cohorte de tumeurs prostatiques	181
6.3 Variation de l'expression de SPARC dans les échantillons de tumeurs prostatiques surexprimant ETV1	182
7. Conclusion	183
Discussion et Conclusion Partie II	184
1. Stratégies d'étude de l'implication du facteur ETV1 dans le CaP	186
2. ETV1 pleine longueur et agressivité tumorale	191
3. Gène cibles d'ETV1 dans le CaP	194
4. Conclusions et perspectives	197
CONCLUSION GÉNÉRALE	200
ANNEXES	204
BIBLIOGRAPHIE	212

RÉSUMÉ

ETV1, 4, 5 sont des facteurs de transcription appartenant au groupe PEA3 de la famille ETS. Ces facteurs sont exprimés lors du développement embryonnaire dans les organes se mettant en place par morphogenèse de branchement puis chez l'adulte au niveau physiologique comme pathologique ; ainsi leur surexpression est souvent associée au développement de nombreux cancers.

Le projet de thèse a porté sur deux approches orientées autour de cancers homono-dépendants ; le cancer du sein et suite à un changement d'équipe, le cancer de la prostate:

① La première approche concerne l'étude de l'implication d'ETV4 dans la tumorigenèse mammaire et la caractérisation de MMP13 en tant que gène cible et relais potentiel de l'effet pro-tumorigène induit par ETV4.

Nous avons ainsi montré, dans des cellules mammaires cancéreuses, la régulation de l'expression de *MMP13* par ETV4 *via* l'étude de son promoteur, au niveau transcriptionnel et protéique. Nous avons ensuite montré par des tests phénotypiques *in vitro* de mesure de la migration, de la prolifération, de l'invasion cellulaires et de clonage sans ancrage, que ETV4 promeut la tumorigenèse mammaire et que MMP13 en est un relais. En effet, la surexpression de MMP13 contribue aux effets pro-tumorigène *in vitro* et l'inhibition de MMP13 dans un contexte de surexpression d'ETV4 les diminue. Cette approche a été complétée *in vivo via* l'injection sous cutanée des cellules en souris immunodéficientes et a permis de révéler que de la même façon que dans les tests *in vitro*, MMP13 est un médiateur de l'activité pro-tumorigène d'ETV4. Enfin, nous avons analysé l'expression de *MMP13* et *ETV4* dans une cohorte de 456 échantillons de cancer du sein et montré que la surexpression concomitante d'ETV4 et de MMP13 est associée à un mauvais pronostic en termes de survie.

Ainsi, ce premier projet a permis de définir que MMP13 agit en tant que relais du facteur ETV4 dans la tumorigenèse mammaire.

② La seconde approche que nous avons développée porte sur le rôle du facteur ETV1, du groupe PEA3, dans la progression métastatique du cancer de la prostate (CaP) et la recherche de gènes cibles impliqués.

Les fusions de gènes impliquant les facteurs ERG et ETV1 de la famille ETS et leur surexpression sont fréquentes dans les cancers de la prostate et représentent environ 50% et 10% des cas respectivement.

Afin de décrypter le rôle du facteur ETV1, en comparaison avec les données déjà bien caractérisées sur ERG, différents modèles de cellules de CaP surexprimant/réprimant ETV1 ont été mis en place. Leur phénotype a été étudié *in vitro* grâce à différents tests phénotypiques mais aussi *in vivo via* l'injection des cellules en intra-cardiaque. Nous avons ainsi montré que le facteur ETV1 augmente les capacités tumorigènes de cellules cancéreuses prostatiques et qu'une forme tronquée (retrouvée de façon récurrente dans les fusions associées au CaP) a des effets opposés ; et qu'*in vivo* le facteur ETV1 induit une capacité de formation de métastases osseuses plus importante que la forme tronquée.

Nous avons complété cette étude par la définition de *SPARC* (codant l'Ostéonectine, une glycoprotéine matricielle) comme gène cible du facteur ETV1 et étudié le statut d'expression d'ETV1, de sa forme tronquée et de *SPARC* dans une cohorte de 88 échantillons de cancers de la prostate et 20 échantillons de prostate « saine ». Ainsi les résultats obtenus ont permis de confirmer le statut pro-tumorigène du facteur ETV1 dans le CaP, de définir une différence entre la forme pleine longueur et la version tronquée et de préciser l'implication d'ETV1 dans la formation des métastases osseuses du CaP.

Ces résultats ouvrent la voie vers la recherche plus approfondie de la mécanistique liée à ces propriétés métastatiques et aux différences potentielles d'action par rapport aux fusions ERG, avec pour but final la recherche d'outils de diagnostic, de pronostic ou de thérapie du CaP, outils manquants actuellement.

ABSTRACT

ETV1, 4, 5 constitute the PEA3 group of the ETS transcription factor family. These factors are involved in the embryonic development and control the branching morphogenesis of various organs. They are then involved in the adult physiological and in some cancer pathological. Indeed, PEA3 factors are overexpressed in various cancers.

This thesis project focused on two approaches around hormone-dependent cancers; breast cancer and prostate cancer following a team change.

① The first part is focused on the implication of ETV4 in breast tumorigenesis and characterisation of MMP13 like target gene. Indeed, MMP13 is potentially implicated in the mammary tumorigenesis induced by ETV4.

Thus we first investigate, in mammary breast cancer cell line, the regulation of *MMP13* expression by ETV4 through her promoter study, at the transcriptional and protein level. Next, by the measurement of phenotypic tests *in vitro* of migration, proliferation, cell invasion and anchorage independent growth, we show that ETV4 promotes the mammary tumorigenesis and that MMP13 is a relay. In fact, the overexpression of MMP13 is implicated in pro-tumorigenesis effect *in vitro* and the repression of MMP13 in context of ETV4 overexpression decreases this effect. This approach was completed by the injection of cell lines in the inguinal flank of immunocompromised mice and show MMP13 mediate the pro-tumorigenesis effect of ETV4 like shown *in vitro* tests. Finally, we analysed expression of MMP13 and ETV4 in a series of 456 primary breast tumors and show the overexpression concomitant of ETV4 and MMP13 are associated with a poor prognosis.

So we show in the first part of this project that MMP13 potentiates effects of the ETV4 oncogene during breast cancer tumorigenesis.

② The second part of our study is about the ETV1 factor, member of PEA3 group, in the progression of metastasis of prostate cancer (PCa) and the research of involved target genes.

Gene fusion involving ERG and ETV1 of ETS family and their overexpression are frequent in prostate cancer and occur in over 50% and 10% of cases respectively.

In order to understand the role of ETV1, in comparison with available data on ERG, different prostate cancer cells overexpress or repress ETV1 were used. Their phenotypes were studied *in vitro* by different phenotypic tests but also by injection intracardially *in vivo* of these cells. We have shown that the ETV1 factor enhances tumorigenesis capacities of prostate cancer cell lines and its truncated form (recurrent form of ETV1 in PCa) has opposite effects; and ETV1 full-length induces more bone metastasis formation than its truncated form.

Next, we have completed this study by the definition of SPARC (encoding for Osteonectin, matricial glycoprotein) like target gene of ETV1 factor and study the expression status of ETV1, and its truncated form as well as SPARC in 88 prostate cancer samples and 20 prostate « normal » samples tissues. Thereby, we confirmed the pro-tumorigenic status of ETV1 factor in PCa by our results, and we defined differences between full-length and truncated length and completed the comprehension of the ETV1 function in the formation of bone metastasis of PCa.

These results open the gate around more depth research of mechanisms linked to metastasis properties and potential action difference with ERG fusions, with for final objective to find diagnostic, prognostic or therapeutic tools of PCa, which are currently missing.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Liste des abréviations

ACTH : adenocorticotropique hormone	EGF : Epidermal Growth Factor
AD : activation domain	EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
ADN : acide desoxyribonucléique	ERG : ETS related gene
AIB1 : amplified-in breast cancer 1	ERM : Ets related molecule
AR : androgen receptor	ETS : E-twenty-six
ARE : androgen response element	ETV : Ets variant
AR-V : androgen receptor variant	FDA : Food and Drug Administration
bHLH : basic helix-loop-helix	FGF : fibroblast growth factor
BMECs : bone marrow endothelial cells	GDNF : glial derived neurotrophic factor
BMP : bone morphogenetic protein	GH : growth hormone
BP : paires de bases	HAT : histone acétyltransférase
BPH : hyperplasie prostatique bénigne	HDAC : histone déacétylase
bZIP : basic leucine zipper region	HGF : Hepatocyte growth factor
CAF : cancer associated fibroblaste	HLH : helix loop helix
CaP : cancer de la prostate	HSC : hematopoietic stem cell
Cbfa1 : core binding factor 1	HT : hormonothérapie
CBP : CREB- binding protein	ID : inhibition domain
ChIP : chromatine immuno precipitation	IGF : insulin-like growth factor-1
COPA : cancer outlier profile analysis	IL : interleukine
COX-2 : cyclooxygenase-2	KLKs : kallikréines
CRPC : cancer de la prostate résistant à la castration	LH : luteinizing hormone
CT : chimiothérapie	LHRH : luteinizing hormone releasing hormone
CZ : central zone	MAPK : mitogen activated protein kinases
DBC1 : deleted in breast cancer 1	MMP : métalloprotéases
DHEA : déhydroépiandrostérone	NFKB : nuclear factor- kappa B
DHT : dihydroxytestostérone	OSE-2 : osteoblast specific element
EBS : ETS binding site	OST : on-sight
ECM : matrice extracellulaire	

Liste des abréviations

PCA3 : prostate cancer antigen 3

PHI : prostate Health Index

PIN : néoplasie intra-épithéliale

PNT : pointed

PSA : prostate specific antigen

PT : prostatectomie totale

PTEN : Phosphate and Tensin Homolog

PTH : parathyroid hormone

PTH LH : parathyroïde hormone like hormone

PZ : peripheral zone

Rb : rétinoblastome

RD : repression domain

RMN : résonance magnétique nucléaire

RT : radiothérapie

SAM : sterile alpha motif

SCC : carcinoma à cellules squameuses

SPARC : secreted protein acidic and rich in cysteine

SRC : steroid receptor coactivators

SRE : serum response element

SRF : serum response factor

SRR : serine rich region

SUMO : small ubiquitin-like modifier

TAM : tumor associated macrophages

TCF : ternary complex factor

TEB : terminal end buds

TGF- β 1 : transforming growth factor 1

TNF α : tumor necrosis factor alpha

TP53 : Tumor protein p53

TZ : transitional zone

VEGF : vascular endothelial growth factor

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

Figure 1: Schéma représentant la structure des protéines de la famille des ETS.....	17
Figure 2 : Structure des domaines conservés ETS et PNT retrouvés dans les facteurs de transcription ETS.	20
Figure 3: Fonction d'auto-inhibition du facteur ETS1 <i>via</i> la phosphorylation des régions en amont du domaine ETS.....	22
Figure 4 : Système d'activation et de désactivation d'un membre du groupe TCF : Elk1 <i>via</i> la SUMOylation et la phosphorylation de la protéine.....	23
Figure 5 : Voie d'activation de la transcription des gènes cibles d'Elk1.....	24
Figure 6: Modulation de l'expression de gènes cibles des facteurs ETS <i>via</i> des interactions de type bHLH ou bZIP.	26
Figure 7: Représentation schématique de l'implication du facteur ETV1 lors de la mise en place des neurones sensoriels et motoneurones.	30
Figure 8 : Composition de la structure cellulaire d'un acini.....	33
Figure 9 : Développement embryonnaire des glandes mammaires.	35
Figure 10 : Schéma représentant la transition épithélio-mésenchymateuse lors de la tumorigénèse.	39
Figure 11: Schéma simplifié montrant la coopération entre la voie Wnt1/ β caténine et le facteur ETV4 dans la tumorigénèse mammaire.....	46
Figure 12: Domaines et structures des métalloprotéases.	52
Figure 13: Schéma représentant le mécanisme d'activation des métalloprotéases.	53
Figure 14: Composition cellulaire de la prostate.	61
Figure 15: Schéma représentant les différentes zones de la prostate.	62
Figure 16: Représentation des différents grade de Gleason.	67
Figure 17: Différentes voies de synthèse des androgènes.	77
Figure 18: Représentation schématique de l'organisation spatio-temporelle de AR.....	78
Figure 19: Classification des fusions de gènes dans la CaP.....	88
Figure 20: Différentes fusions impliquant le facteur ETV1 dans la CaP.....	89
Figure 21: Réarrangements chromosomiques impliquant les facteurs ETS et un promoteur hormono-sensible.	93
Figure 22: Différences de contribution des facteurs ETV1 et ERG dans la tumorigénèse prostatique suite à la perte de PTEN.	95
Figure 23: Représentation schématique de la stratégie de clonage des séquences ADN complémentaires ETV1 ou dETV1 dans le vecteur rétroviral pMX puro.	152

Figure 24: Schéma décrivant les différentes étapes permettant une infection rétrovirale afin d'établir des clones stables d'expression.....	154
Figure 25: Représentation de la stratégie expérimentale d'injection intra-cardiaque des cellules prostatiques cancéreuses.....	156
Figure 26: Analyse de l'expression transcriptionnelle d'ETV1 par Q-RT-PCR dans différentes lignées cellulaires prostatiques.....	158
Figure 27: Analyse de l'expression transcriptionnelle des facteurs ERG, ETV1, 4 et 5 par Q-RT-PCR dans les lignées MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M.....	159
Figure 28: Analyse de l'expression protéique par Western Blot d'ETV1 dans les modèles cellulaires MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M.....	160
Figure 29: Répression de l'expression transcriptionnelle du facteur ETV1 par interférence à l'ADN dans la lignée cellulaire MDA-PCa-2b.	161
Figure 30: Analyse de l'expression transcriptionnelle par Q-RT-PCR de la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1 dans les modèles cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M.....	163
Figure 31: Analyse du potentiel clonogénique sans ancrage dans les MDA-PCa-2b réprimant l'expression d'ETV1.	165
Figure 32: Analyse de la prolifération cellulaire des lignées cancéreuses IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1 au cours du temps.	166
Figure 33: Analyse de la migration cellulaire des lignées cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.....	167
Figure 34: Analyse de la migration après inhibition de la prolifération cellulaire, des lignées IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.....	168
Figure 35: Analyse de la migration cellulaire par chambre de Boyden des lignées IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.....	169
Figure 36: Analyse de l'invasion cellulaire des lignées IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.....	170
Figure 37: Analyse du clonage sans ancrage des lignées IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.....	171
Figure 38: Observation en bioluminescence des souris injectées en intra-cardiaque avec les cellules IGR-CaP1 contrôle.....	174
Figure 39 : Observation en bioluminescence des souris injectées en intra-cardiaque avec les cellules IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1.....	175

Liste des figures

Figure 40: Observation en bioluminescence des souris injectées en intra-cardiaque avec les cellules IGR-CaP1 surexprimant la forme tronquée d'ETV1. 176

Figure 41: Analyse de l'expression relative en ARNm de SPARC dans nos modèles cellulaires MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M..... 179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Séquences consensus de fixation spécifique pour les membres de la famille ETS.....	19
Tableau 2: Classification des métalloprotéases.....	50
Tableau 3: Évolution de l'incidence et des décès par CaP en France de 1980 à 2000	64
Tableau 4: Nouvelle classification de Gleason.....	68
Tableau 5: Classification TNM pour le cancer de la prostate.....	69
Tableau 6: Différentes options de traitement en fonction du stade tumoral.....	72
Tableau 7: Prévalence des fusions ETV1 dans le CaP.....	91
Tableau 8: Nom et séquences des oligonucléotides utilisés pour la deuxième partie du projet.	150
Tableau 9: Bilan des injections intra-cardiaque des cellules IGR-CaP1 Ctrl, pleine longueur et tronquée en termes de viabilité des souris.....	172
Tableau 10: Bilan du pourcentage de métastases en fonction des souris et des différents membres (pates arrière, pates avant, tête, queue) dans chaque groupe de souris injectées avec différentes lignées IGR-CaP1 (Ctrl, pleine longueur, tronquée)	177
Tableau 11: Tableau regroupant les différents échantillons de CaP surexprimant ETV1.:	181
Tableau 12: Etude de l'expression d'ETV1 pleine longueur ou tronquée ainsi que SPARC dans les échantillons ETV1 positifs.....	182

LISTE DES ANNEXES

Annexes 1: Différentes stratégies mises en place pour la détection de la protéine ETV1	205
Annexes 2: Tableau regroupant les différents échantillons de CaP et normaux.	206
Annexes 3: Analyse par Q-PCR de l'expression relative en ARNm d'ETV1 dans la cohorte de patients.	209
Annexes 4: Analyse par Q-PCR de l'expression relative en ARNm d'ETV1 et de SPARC dans la cohorte de patients.	210

INTRODUCTION

Partie I: Les facteurs de transcription ETS

1 Origine et évolution des facteurs de transcription ETS

Les facteurs ETS ont été identifiés pour la première fois en 1983 dans le rétrovirus aviaire transformé E26, dans lequel se trouvent fusionnés les oncogènes *gag-myb* et *ets*. Ce rétrovirus induit chez le poulet une leucémie érythroblastique et myéloblastique (Leprince *et al.* 1983). Les facteurs ETS pour **E-Twenty-Six** forment une large famille de facteurs de transcription très conservée au cours de l'évolution. En effet, ces facteurs sont retrouvés depuis la branche des métazoaires jusqu'aux invertébrés puis chez les vertébrés (Hsu and Schulz 2000; Oikawa and Yamada 2003; Papas *et al.* 1986). On compte ainsi 27 facteurs ETS chez l'Homme, 26 chez la souris, 10 chez *Caenorhabditis elegans* et 9 chez la Drosophile (Galang *et al.* 2004; Hollenhorst, Jones, and Graves 2004; Gutierrez-Hartmann, Duval, and Bradford 2007). Les 27 facteurs retrouvés chez l'Homme sont subdivisés en 11 sous-groupes établis en fonction des homologies de séquence au niveau du domaine ETS: ETS, ERG, ELG, ELF, ESE, ERF, TEL, PEA3, SPI, TCF et PDEF (**Figure 1**).

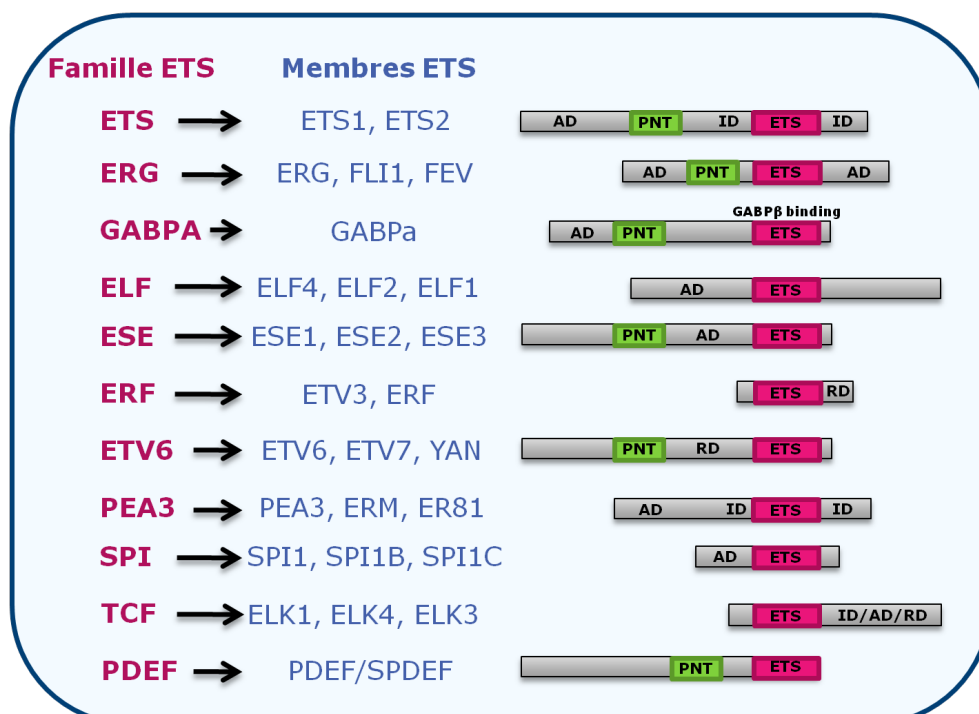


Figure 1: Schéma représentant la structure des protéines de la famille des ETS.

Représentation des 11 sous-groupes ETS et des membres associés à chacune et schématisation de la structure des différents membres. Les rectangles roses représentent le domaine ETS et en vert le domaine PNT. Sont aussi indiqués les domaines d'activation (AD), de répression (RD) et d'auto-inhibition (ID) (Hollenhorst, McIntosh and Graves, 2011).

2 Domaines fonctionnels des facteurs ETS

Cette famille de facteurs est composée de différents domaines dont le domaine ETS sur lequel se base la composition des différents groupes. D'autres régions fortement conservées composent également ces facteurs: les domaines Pointed (PNT), les domaines d'activation (AD), les domaines de répression (RD) et les domaines d'auto-inhibition (ID) (**Figure 1**).

2.1 Le domaine ETS

L'analyse de la structure du domaine ETS par spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire) a permis de mettre en évidence trois hélices alpha (α 1- α 3) et 4 feuillets bêta anti-parallèles (β 1- β 4). Ces structures sont organisées dans l'ordre suivant α 1- β 1- β 2- α 2- α 3- β 3- β 4 formant ainsi une structure de type hélice-boucle-hélice (Kodandapani *et al.* 1996; Donaldson *et al.* 1996a) (**Figure 2a**). Comme on peut le voir sur la **Figure 1**, ce domaine est situé pour la majorité des facteurs de transcription ETS en partie C terminale de la protéine.

Ce domaine a pour fonction la fixation à l'ADN au niveau des séquences cibles spécifiques appelées EBS pour « ETS binding site ». Quatre vingt cinq acides aminés composent le domaine ETS et le corps de cette séquence permettant la reconnaissance de la séquence cible de l'ADN est 5'-GGA(A/T)-3' (Yuan *et al.* 2014; Donaldson *et al.* 1996a; Papas *et al.* 1986; C. Y. Wang *et al.* 1992). Cependant, des variations de séquence consensus ont été détectées grâce à la technique de CHIP-Seq. On peut ainsi subdiviser les 11 groupes en 4 classes (Barski and Zhao 2009; Farnham 2009; Hollenhorst *et al.* 2007) :

- ✓ La classe I est composée des groupes ETS, ERG, GABPA, ERF, PEA3, TCF, dont le corps de la séquence consensus est ACCGGAAGT (**Tableau 1, ligne 1**).
- ✓ La classe II est composée des membres ELF, ESE et ETV6, dont la séquence consensus d'affinité diffère de la classe I *via* les premiers acides aminés, cette séquence est CCCGGAAGT (**Tableau 1, ligne 2**).
- ✓ La classe III est composée du groupe SPI, dont la séquence est riche en adénine en 5' et le corps de celle-ci est GGAA (**Tableau 1, ligne 3**).
- ✓ La classe IV est composée uniquement du groupe SPDEF, qui possède une forte affinité pour les séquences dont le corps est GGAT contrairement à la séquence GGAA retrouvée dans les autres groupes (**Tableau 1, ligne 4**).

Tableau 1: Séquences consensus de fixation spécifique pour les membres de la famille ETS.

Classe	Famille ETS	Séquence d'affinité
I	ETS, ERG, GABPA, ERF, PEA3, TCF	ACCGGAAGT
II	ELF, ESE, ETV6,	CCCGGAAGT
III	SPI	AGAGGAAGT
IV	PDEF	ACCGGATGT

2.2 Le domaine Pointed (HLH)

Le domaine Pointed aussi appelé HLH (helix-loop-helix) a été identifié à l'origine dans la protéine Pointed (PNT) retrouvée chez *Drosophila melanogaster* (Klämbt 1993). Le domaine PNT est semblable au domaine SAM (Sterile alpha motif) retrouvé dans de nombreuses protéines comme Smaug, EPHB1, LIP (Chongwoo A Kim and Bowie 2003).

C'est un domaine de 80 acides aminés qui est retrouvé dans environ un tiers des protéines ETS en N-terminal (**Figure 1**). Ce domaine est composé de quatre hélices alpha (H2-H5) et d'une autre hélice alpha plus courte (H2') (**Figure 2b**) (Slupsky *et al.* 1998). D'autres hélices peuvent s'associer au corps de ce domaine pour certains facteurs ETS (H0-H1).

Différentes fonctions ont pu être identifiées pour les facteurs de transcription qui le possèdent. Une étude de Nelson et collaborateurs en 2010 montre que la phosphorylation de la protéine Ets1 au niveau des domaines H0-H1 induit un changement de conformation du domaine PNT et une augmentation des interactions avec le domaine TAZ de la protéine CBP (Nelson *et al.*, 2010). Il a aussi été montré que le domaine PNT des facteurs ETS1 et ETS2 peut être phosphorylé par ERK2 ce qui induit la formation d'un complexe. Les facteurs ETS1 et ETS2 participent ainsi à la voie des MAP kinases (Seidel and Graves 2002; Callaway *et al.* 2010). Dans d'autres cas, le domaine PNT peut aussi avoir un rôle inverse et agir comme répresseur (C. A. Kim *et al.* 2001).

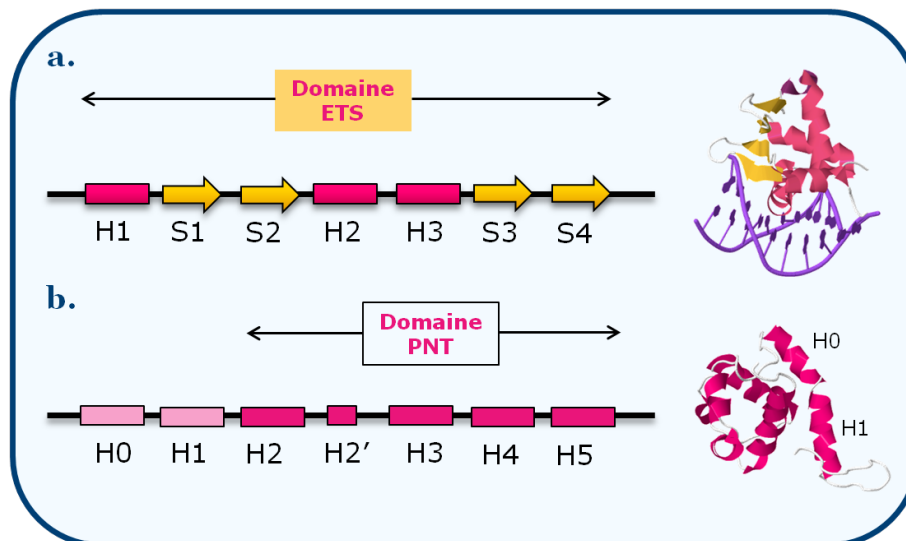


Figure 2 : Structure des domaines conservés ETS et PNT retrouvés dans les facteurs de transcription ETS.

2.3 Autres domaines

D'autres domaines constituent certains facteurs de la famille ETS (**Figure 1**):

- ✓ Les domaines d'activation et de répression

De nombreuses protéines ETS présentent des domaines permettant l'activation ou la répression de la transcription de gènes cibles (**Figure 1**). La majorité de ces domaines sont activateurs mais certains ont une activité répressive (O'Neill *et al.* 1994; Maira, Wurtz, and Wasyluk 1996; Lopez *et al.* 1999; Sgouras *et al.* 1995). De nombreuses études montrent que certains facteurs peuvent être à la fois activateurs ou répresseurs en fonction du contexte (Zinck *et al.* 1993; Borràs *et al.* 1995; Sieweke *et al.* 1996; Foos *et al.* 1998; R. Li *et al.* 2000). Ces activités d'activation ou de répression des différents gènes cibles par les facteurs ETS s'effectuent en coopération avec d'autres facteurs de transcription ou co-facteurs qui vont également jouer un rôle majeur dans de nombreuses fonctions de la régulation cellulaire (Oikawa and Yamada 2003; Sharrocks *et al.* 1997; Mavrothalassitis and Ghysdael 2000).

- ✓ Les domaines d'auto-inhibition

Certains membres de cette famille sont capables d'auto-inhiber leur fixation à l'ADN grâce à une réduction d'affinité avec celui-ci. Pour cela différents mécanismes ont été mis en évidence comme la protéolyse, les modifications post-traductionnelles ou

encore la fixation à un ligand (Pufall and Graves 2002; Lim *et al.* 1992; Graves *et al.* 1998; Hagman and Grosschedl 1992).

L'auto-inhibition la plus décrite est celle du facteur ETS1. En effet, Lim et collaborateurs montrent que la délétion d'une région centrale et d'une région en C-terminale du facteur ETS1 induit une augmentation de la fixation à l'ADN de 10 à 20 fois en comparaison à la protéine pleine longueur (**Figure 1**)(Lim *et al.* 1992). Il a été montré ensuite que la phosphorylation des régions SRR (Serine Rich Region) ainsi que des modules HI-1 et HI-2 en amont du domaine ETS va induire un état rigide inactif ou flexible actif et donc la liaison ou non à l'ADN (**Figure 3 a et b**) (Cowley and Graves 2000; Donaldson *et al.* 1996b; C. Wasylyk, Kerckaert, and Wasylyk 1992b; Pufall and Graves 2002).

Cette auto-inhibition de fixation à l'ADN a aussi été observée dans d'autres facteurs ETS comme ETS2 (C. Wasylyk, Kerckaert, and Wasylyk 1992a), PEA3 (Greenall *et al.* 2001) et ERM (Laget *et al.* 1996). Cependant aucune homologie de séquence en acides aminés n'est retrouvée dans ce domaine d'auto-inhibition.

✓ Autres domaines

Il existe d'autres domaines, spécifiques, comme le domaine OST pour On-Sight, retrouvé uniquement dans le facteur GAPBPA. Ce domaine a pour fonction le recrutement d'autres co-facteurs et va se fixer par exemple aux domaines CH1 et CH3 de la protéine co-activatrice CBP/p300 (Kang *et al.* 2008).

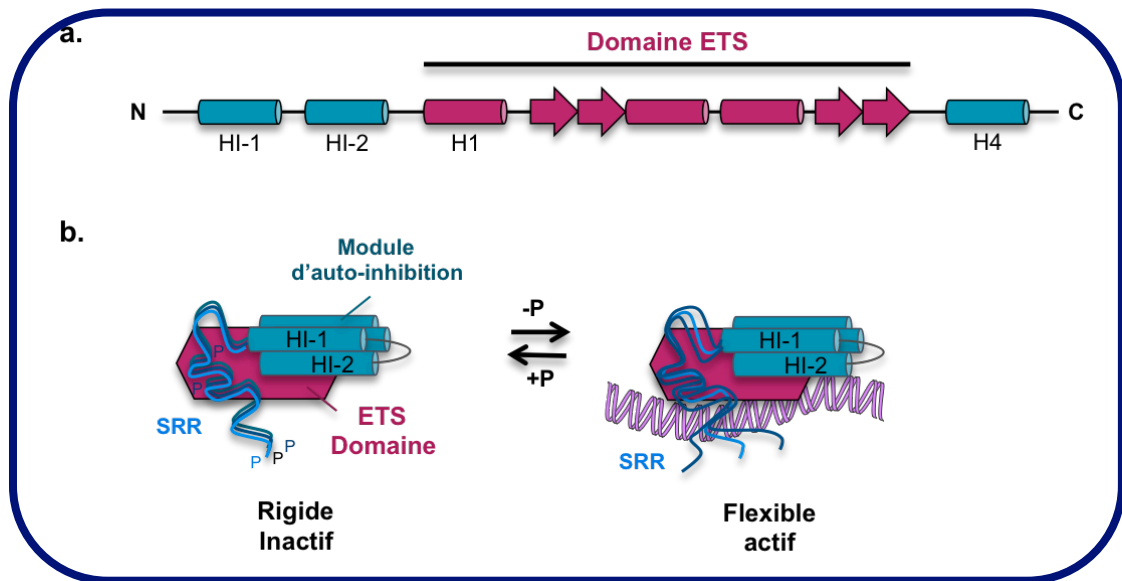


Figure 3: Fonction d'auto-inhibition du facteur ETS1 via la phosphorylation des régions en amont du domaine ETS.

a. Le corps du domaine ETS est composé de 3 hélices alpha (rectangle rose) et de 4 feuillets bêta antiparallèle (flèches rose). b. L'auto-inhibition du domaine ETS1 induit par le changement de confirmation rigide inactif induit par la phosphorylation et la forme flexible active en absence de phosphorylation. (Adaptée de Hollenhorst *et al.*, 2011)

3 Régulation de l'expression des gènes cibles

Comme décrit dans la partie précédente, les facteurs ETS possèdent une conservation globale de leur séquence de fixation à l'ADN. Cette conservation se reflète souvent dans certaines similarités fonctionnelles, moléculaires et biologiques des sous-groupes ETS. Cependant des variations de fonction sont également observées dans les différents sous-groupes, ce qui traduit des propriétés propres à chacune. Ces spécificités d'actions peuvent s'effectuer grâce à la formation de complexes ternaires, grâce aux interactions avec différents partenaires protéiques ou par l'implication de voies de signalisation.

3.1 Formation de complexes ternaires

Les facteurs ETS peuvent être phosphorylés en réponse à certaines stimulations médiées par des récepteurs de facteurs de croissance et la signalisation des intégrines. Les facteurs ETS s'associent à d'autres protéines et forment un complexe ternaire avec l'ADN.

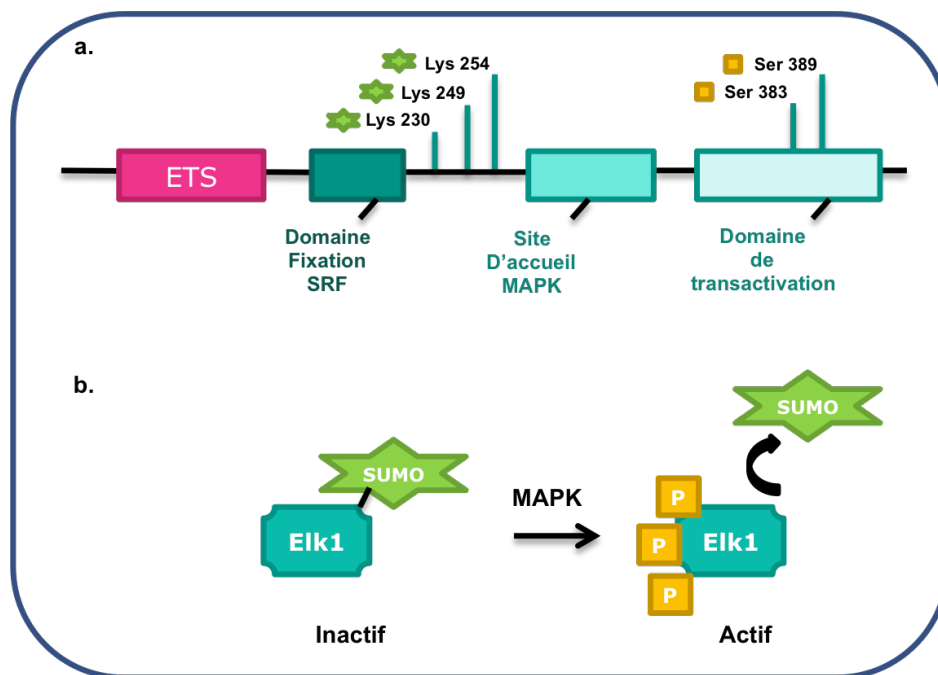


Figure 4 : Système d'activation et de désactivation d'un membre du groupe TCF : Elk1 via la SUMOylation et la phosphorylation de la protéine.

Composition de la protéine Elk1 avec la position de ses différents domaines conservés : ETS (en rose), le domaine de fixation SFR, le site d'accueil des MAPK et le domaine de transactivation. Représentés aussi les trois sites de SUMOylation ainsi que les deux sites de phosphorylation. b. Représentation du passage de la forme inactive sumoylée d'Elk1 à sa forme activée après phosphorylation par les MAPK (Adaptée de Yang *et al.*, 2003 ; Besnard *et al.*, 2011).

Trois facteurs du complexe ternaire TCF (*ternary complexes factors*) ont été identifiés à l'origine : Elk1, Sap1a et Net/Sap2 (B. Wasylyk, Hagman, and Gutierrez-Hartmann 1998), leur activation dépend de leur état de phosphorylation *via* les MAPK. Par exemple il a été montré que la phosphorylation de Elk1 au niveau des sérines 383 et 389 par les MAPK (Janknecht *et al.* 1993; Gille *et al.* 1995) induit un changement de conformation de la protéine et augmente son affinité avec l'ADN (R. Li, Pei, and Watson 2000; Gille *et al.* 1995; S.-H. Yang *et al.* 1999). En effet, Elk1 passe d'une forme inactive induite par la SUMOylation (SUMO : small ubiquitin-like modifier) des lysines 230, 249 ou 254 à un état phosphorylé actif (**Figure 4a & b**) (Shen-Hsi Yang *et al.* 2003; Salinas *et al.* 2004). La phosphorylation de Elk1 induit par exemple l'interaction avec un dimère de co-facteur de transcription *Serum response factor* (SRF) (Janknecht *et al.* 1994; Ling *et al.* 1997, 1998) fixé au niveau du domaine *serum response element* (SRE) des gènes cibles (B. Wasylyk, Hagman, and Gutierrez-Hartmann 1998; Besnard *et al.* 2011). Ce mécanisme va renforcer la fixation du facteur de transcription Elk1 à l'ADN et ainsi permettre la transcription des gènes cibles (**Figure 5**).

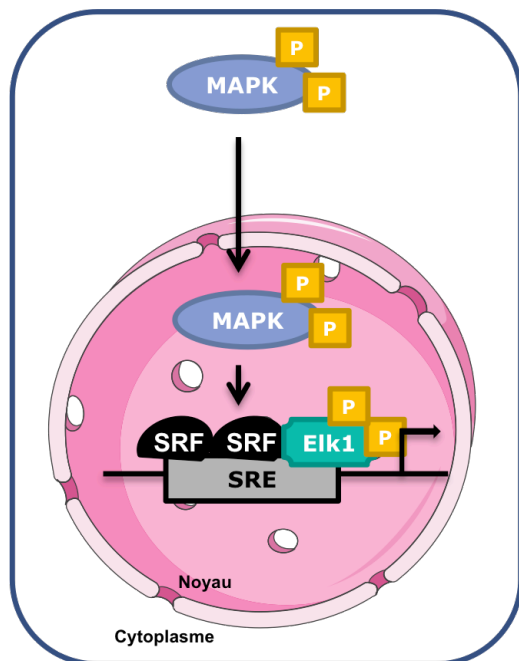


Figure 5 : Voie d'activation de la transcription des gènes cibles d'Elk1.

Formation du complexe Elk1/ SRF/ SRE au niveau des gènes cibles *via* la phosphorylation d'Elk1 par la voie de signalisation des MAPK. (Adaptée de Janknecht *et al.*, 1994)

3.2 Coopération avec d'autres facteurs de transcription

Les séquences qui entourent l'EBS forment différents domaines (**Cf I-2**), qui vont participer à la spécificité de liaison des facteurs de transcriptions ETS, permettant ainsi de coordonner différents processus cellulaires. Le contrôle de la transcription des gènes cibles va donc dépendre, des interactions avec d'autres protéines nucléaires, de la coopération entre les membres de la famille ETS et d'autres facteurs de transcription. Ainsi, différents exemples de coopération ont été mis en évidence dans la littérature comme par exemple les coopérations ETS/AP1, ETS/NFκB, ETS/Rb entre autres.

- ✓ **Coopération ETS/AP1** : AP1 est un dimère de facteur de transcription composé de protéines se fixant à l'ADN. Les protéines composant ce dimère sont caractérisées par une région de type bZIP (basic leucine zipper region) et comportent également un domaine permettant la fixation à l'ADN. Deux familles composent ce dimère, les protéines Fos (c-Fos, Fra1, Fra2, FosB) et Jun (c-Jun, JunB, JunD). Des sites de liaison ETS et AP-1 se retrouvent adjacents dans de nombreux promoteurs (Wasylyk *et al.* 1993 ; Westermarck and Kahari, 1999) ce qui permet une coopération fonctionnelle et la régulation de l'expression de nombreux gènes cibles comme certaines métalloprotéases (Crawford and Matrisian, 1996 ; Gutman and Wasylyk, 1990 ; Javaraman *et al.*, 1999, Kapila, Xie, and Wang 2009; Otero *et al.* 2012), des cytokines (Gottschalk *et al.* 1993 ; Wang *et al.* 1994), des gènes viraux

(Nothias *et al.* 1993; B. Wasylyk *et al.* 1990) ou encore de nombreux autres gènes (Clementz *et al.* 2011; Britton *et al.* 2017).

- ✓ **Coopération ETS/ NfκB** : NfκB (*nuclear factor-kappa B*) est un facteur de transcription ubiquitaire impliqué dans l'immunité, l'inflammation et la réponse au stress (Gilmore 1999). La coopération de NfκB avec les facteurs ETS va induire la transcription de IL-2 ainsi que de son récepteur (Gri *et al.* 1998), d'IL-3 (Gottschalk, Giannola, and Emerson 1993), d'IL-12 (Gri *et al.* 1998) ainsi que de gènes viraux (SETH *et al.* 1993). Cette coopération nécessite une interaction directe entre ces deux facteurs. Par exemple le domaine ETS du facteur Ets1 est essentiel pour l'interaction avec la région HD de la sous-unité p50 de NfκB (Bassuk, Anandappa, and Leiden 1997).
- ✓ **Coopération ETS/ Rb** : Rb pour rétinoblastome est une protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et qui interagit avec de nombreuses protéines du cycle cellulaire comme les cyclines et certains facteurs de transcription comme E2F et AP-1. Les interactions entre les ETS et Rb jouent un rôle important pour la production de lymphokine et l'activation lymphocytaire. Par exemple il a été montré une interaction entre Rb et Elf1, lorsque Rb n'est pas phosphorylé Elk1 va pouvoir se fixer à Rb et à l'inverse il est relâché lors de la phosphorylation de celui-ci (C. Y. Wang *et al.* 1993).

3.3 Interaction entre les facteurs ETS et certains motifs protéiques

Les domaines spécifiques des facteurs ETS peuvent interagir avec de nombreux motifs protéiques comme les domaines bHLH et bZipper. Ces coopérations vont ainsi réguler un grand nombre d'éléments stimulateurs ou répresseurs du promoteur au niveau des éléments de contrôle.

- ✓ **Interaction ETS/ bHLH**: bHLH pour basic helix-loop-helix est une structure de type hélice boucle hélice présente dans de nombreuses familles de facteurs de transcription capables de se dimériser. Les facteurs de transcriptions possédant ce domaine peuvent ainsi se regrouper pour former des homo ou hétéro-dimères (Amoutzias *et al.* 2008). La structure bHLH va se fixer sur ses gènes cibles au niveau d'une séquence consensus canonique palindromique CACGTG, appelée E-box (Chaudhary and Skinner 1999; Murre *et al.* 1994). Il existe de nombreuses coopérations comme par exemple la coopération entre la protéine USF-1 fixée

sur la E-box du gène HIV-1 et le facteur de transcription Ets1 (Sieweke *et al.* 1998). Dans le cadre de cette étude, les auteurs montrent que Ets1 peut se lier à USF-1 en absence de son site EBS (Sieweke *et al.* 1998)(**Figure 6a**).

- ✓ **Interaction ETS/ bZIP:** la structure cristallographique de bZIP montre que le domaine leucine zipper va participer aux interactions protéine-protéine (Glover and Harrison 1995). Par exemple, une étude montre que le facteur PU-1 (aussi appelé SPI1) forme un dimère avec le facteur c-Jun *via* les domaines bZIP. Ce dimère va ainsi réguler l'expression du récepteur M-CSF qui possède un domaine de fixation EBS mais pas de domaine de fixation pour les facteurs AP-1 dont fait partie c-Jun (Behre *et al.* 1999) (**Figure 6b**).

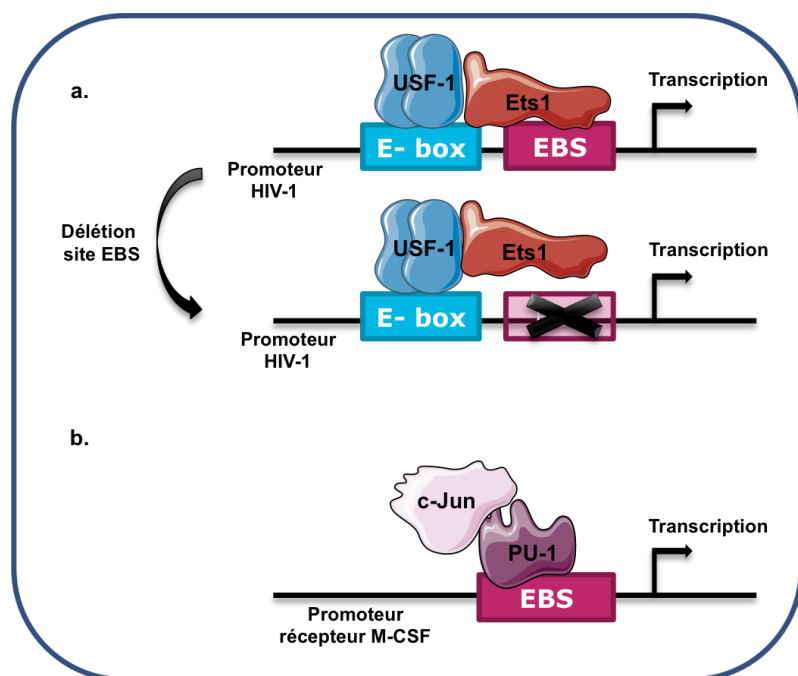


Figure 6: Modulation de l'expression de gènes cibles des facteurs ETS *via* des interactions de type bHLH ou bZIP.

a. Régulation de l'expression du gène HIV-1 *via* une interaction de type bHLH entre le facteur Ets1 et le facteur USF-1 en présence ou absence du site de fixation EBS. b. Régulation de l'expression du récepteur M-CSF *via* une interaction de type bZIP entre le facteur PU-1 et c-Jun. (Adaptée de Sieweke *et al.*, 1998 (a) et Behre *et al.*, 1999 (b))

3.4 Coopération avec des co-facteurs

Les facteurs ETS peuvent aussi coopérer avec des co-facteurs comme par exemple CBP/p300 (CREBBP) qui est une histone acétyltransférase (HAT). Cette famille de co-activateurs est composée de deux protéines p300 et CBP (*CREB-binding protein*) qui vont réguler l'expression de gènes cibles *via* l'acétylation des histones ou *via* l'interaction avec d'autres facteurs de transcription (X. Liu *et al.* 2008). De nombreuses protéines ETS comme ELK-1, ETS1, ETS2 et ETV1 interagissent avec le co-activateur CBP/p300 pour activer la transcription, comme par exemple celle de la métalloprotéase stromélysine (Jayaraman *et al.* 1999). Il a été montré que le facteur ETS1 est capable de recruter CBP/p300 afin de former un complexe stable possédant une HAT (C. Yang *et al.*

1998). Puisque CBP/p300 interagit avec de nombreux facteurs de transcription, son rôle biologique dépend donc de ses partenaires. Ainsi, d'autres co-facteurs peuvent aussi être co-répresseurs lorsqu'ils sont associés aux facteurs ETS dans le cas d'une activité de désacétylation des histones (HDAC). Ce mécanisme conduit ainsi à une perte de l'activité de transcription. C'est le cas par exemple de l'interaction entre HDAC et Ets-1 qui induit l'inhibition de la transcription de l'IL-10 dans la lignée cellulaire Th-1 (C.-G. Lee *et al.* 2012).

Ainsi en fonction des co-facteurs, les facteurs ETS vont activer ou réprimer la transcription de leurs gènes cibles *via* l'acétylation ou la désacétylation des histones.

Cette liste non exhaustive d'acteurs pouvant interagir avec les facteurs ETS afin de moduler positivement ou négativement l'expression de leurs gènes cibles, montre bien que malgré la redondance des séquences cibles, ces facteurs possèdent une régulation assez spécifique de leurs gènes cibles. Ainsi ces facteurs de transcription jouent un rôle important dans les processus physiologiques et pathologiques que nous allons développer dans les deux prochaines parties de ce mémoire.

Dans la suite de cette introduction, nous allons nous intéresser plus particulièrement au groupe de facteurs de transcription PEA3.

4 Implication biologique du groupe PEA3 (ETV1, ETV4 et ETV5)

Le groupe PEA3 est composé de différents membres comprenant les facteurs : **ETV1** (ETV1 : Ets variant gene 1, aussi appelé ER81), **ETV4** (ETV4 : Ets variant gene 4, aussi appelé PEA3) et **ETV5** (ETV1 : Ets variant gene 5, aussi appelé ERM).

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 sont impliqués dans de nombreux processus du développement. En effet ils vont agir à différents niveaux : ① au niveau cellulaire *via* la régulation de la prolifération, la différenciation, la migration, l'apoptose et au niveau de l'interaction cellule-cellule, ② au niveau tissulaire; en effet les facteurs vont participer au remodelage des tissus notamment durant le développement embryonnaire et ③ au niveau des organes chez l'adulte.

Les facteurs du groupe PEA3 sont impliqués au niveau de la formation osseuse, dans la fertilité, dans la placentation ainsi que dans la coordination motrice.

4.1 Implication dans la formation osseuse

L'expression de nombreux facteurs de transcription ETS est fortement liée à la formation des os et du cartilage durant le développement embryonnaire, mais aussi chez l'adulte. La formation osseuse est un processus complexe : les cellules souches mésenchymateuses vont former soit les chondrocytes soit les précurseurs des ostéoblastes appelés pré-ostéoblastes avant de mûrir en ostéoblastes (Aubin 1998). Durant ces processus de formation et de développement osseux vont être impliqués différents facteurs ETS comme Ets-1, Ets-2, ERG et le groupe des facteurs PEA3.

Une étude spatio-temporelle de l'expression des trois membres ETV1, ETV4 et ETV5 dans l'embryon de souris a permis de mettre en évidence qu'ils sont exprimés dans les chondroblastes ainsi que dans les cellules péri-chondrales mais ne persistent pas dans la matrice cartilagineuse (Chotteau-Lelièvre *et al.* 1997). Les membres du groupe PEA3 sont ainsi détectés dans les cellules du sclérotome qui vont servir à la mise en place de l'axe vertébral, des côtes et du squelette appendiculaire.

4.2 Implication dans la fertilité

La famille ETS joue un rôle crucial dans la régulation de la reproduction aussi bien chez la femme que chez l'homme.

Chez l'homme, le facteur ERM (ERM : Ets related molecule) ou ETV5 est impliqué dans la spermatogenèse. En effet, une étude montre que le facteur ETV5 est exprimé dans différents tissus comme le cerveau, les poumons et les testicules (Chotteau-Lelièvre *et al.*, 1997). L'implication du facteur ETV5 dans la fertilité a été mise en évidence chez la souris mâle, où une délétion du facteur ETV5 (*ETV5*^{-/-}) entraîne une diminution de la taille des testicules qui conduit au développement de mâles stériles (Chen Chen *et al.* 2005). Dans les cellules de testicules normales, les cellules de Sertoli vont maintenir l'auto-renouvellement des cellules souches ainsi que leur différenciation, mais dans les souris dont l'expression d'ETV5 est réprimée, l'auto-renouvellement des

cellules souches ne fonctionne plus même si ces cellules continuent à se différencier (Chen Chen et al. 2005).

4.3 Implication lors de la placentation

Chez la femelle, les différents membres du groupe PEA3 sont exprimés à différents moments et endroits durant la péri-implantation des embryons de souris et dans les ovaires (Koo *et al.* 2005). En effet, le facteur ETV5 est impliqué dans les stades précoces de l'implantation et dans les fonctions ovariennes alors qu'ETV1 est impliqué dans l'établissement de la vascularisation maternelle permettant le développement du placenta, quant à ETV4, il semble être un facteur de l'embryogenèse précoce (Koo 2005). D'autres facteurs ETS sont aussi impliqués dans la placentation, c'est le cas d'Ets-2.

Toutes ces données montrent que les facteurs du groupe PEA3 jouent un rôle important au niveau du développement tout d'abord embryonnaire puis chez l'adulte, qu'ils vont aussi induire la différenciation et le maintien de cellules souches embryonnaires. De plus les facteurs du groupe PEA3 sont impliqués dans d'autres tissus endocriniens, comme la glande mammaire et la prostate mais ces deux cas seront développés plus en détail dans la suite du manuscrit.

4.4 Implication dans la formation du système nerveux

Lors du développement de la moelle épinière, les sous-types de neurones moteurs vont s'étendre afin de former des connexions synaptiques avec les muscles et contrôler ainsi la locomotion. La différenciation des neurones moteurs est régulée par les facteurs GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor) et les facteurs de transcription PEA3 (J. H. Lin *et al.* 1998; Kandemir *et al.* 2017). En effet, une expression d'ETV1 et d'ETV4 est retrouvée dans les neurones proprioceptifs ainsi que dans les motoneurones dans une étude menée dans des embryons de poulet (J. H. Lin *et al.* 1998). Initialement, ETV1 et ETV4 sont co-exprimés par tous les neurones proprioceptifs mais l'expression de ces deux protéines se sépare en des sous-ensembles neuronaux distincts. Ainsi la mutation d'ETV1 chez la souris induit un défaut important dans la coordination motrice qui est caractérisée par une ataxie des membres ainsi qu'un défaut postural de flexion/extension (Arber *et al.* 2000). Cependant, ce phénotype n'est pas associé à une perturbation de la formation des neurones proprioceptifs ou motoneurones mais est

induit par une mauvaise arborisation des dendrites et des motoneurones qui se termine prématurément au niveau de la moelle épinière dorsale (Arber *et al.* 2000) (**Figure 7**). De plus, l'absence d'expression d'ETV1 induit une diminution du nombre d'organes tendineux de Golgi qui correspondent à un corpuscule sensoriel de tendons (Kucera *et al.* 2002), ainsi qu'une absence de formation des mécanorecepteurs de type corpuscule de Pacini (Sedý *et al.* 2006). Toutes ces données montrent donc une implication importante d'ETV1 dans la coordination motrice.

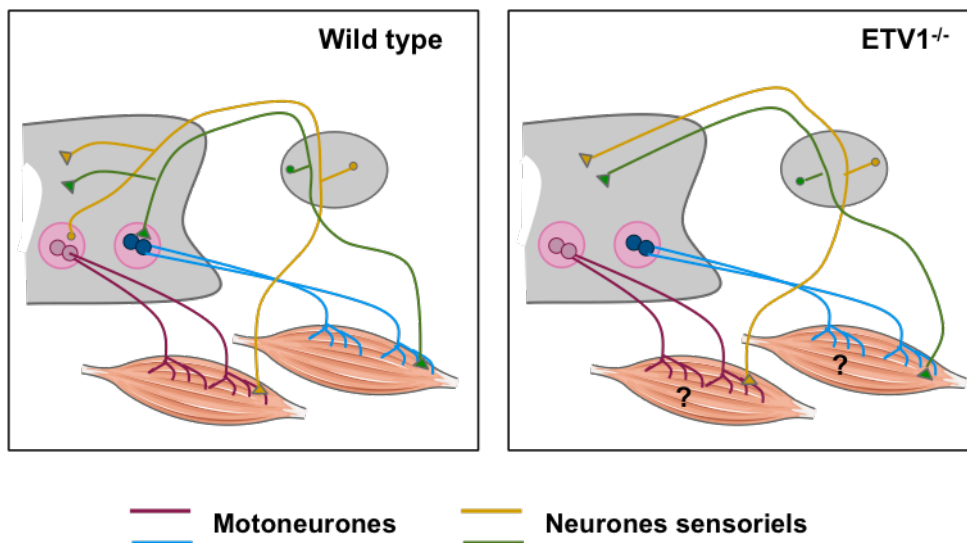


Figure 7: Représentation schématique de l'implication du facteur ETV1 lors de la mise en place des neurones sensoriels et motoneurones.

Chez la souris normale les neurones innervent les muscles et transmettent les informations aux motoneurones qui sont dans la moelle épinière et envoient un signal aux cellules musculaires cibles. Une inhibition de l'expression d'ETV1 induit un défaut de projection des axones des neurones sensoriels et aussi une perte de connexion entre ces neurones et les motoneurones. Adapté de (Koo and Pfaff 2002).

En ce qui concerne ETV4, il est exprimé au niveau des neurones sensoriels musculaires au début du développement puis n'est plus exprimé après la naissance. ETV4 est également fortement exprimé dans un groupe particulier de motoneurones situés au niveau de la moelle épinière (Livet *et al.* 2002). Il a été montré que la perte d'expression d'ETV4 chez la souris entraîne une perte importante de l'arborisation ainsi que de l'innervation des muscles cibles des motoneurones qui expriment normalement ce facteur de transcription (Livet *et al.* 2002; Ladle and Frank 2002). Cependant le facteur ETV4 n'influence pas les connexions interneuronales ou les neurones sensoriels (Ladle and Frank 2002).

4.5 Implication dans l'organogenèse

Lors de l'organogenèse qui se produit pendant le développement embryonnaire, certains organes vont se former par morphogenèse de branchement, c'est le cas par exemple des poumons, des reins et de la glande mammaire. Les facteurs de transcription du groupe PEA3 jouent un rôle lors de ce processus. En ce qui concerne le cas de la glande mammaire, son développement sera étudié dans la partie II de l'introduction.

4.5.1 Morphogenèse de branchement des poumons

Une étude menée sur l'embryon de souris, pendant le développement embryonnaire et la formation des poumons, montre que les facteurs PEA3 ETV4 et ETV5 sont exprimés à partir du stade E10,5 jusqu'au stade E17,5. Lors du processus de branchement permettant la formation des bronches, le gène *ETV5* est exprimé au niveau de la croissance de l'épithélium distal mais ne l'est plus dans les tiges différenciées (Chotteau-Lelievre *et al.* 2003). En parallèle, ETV1 est exprimé dans le mésenchyme tandis qu'ETV4 l'est dans la partie distale croissante des canaux bronchiques (Chotteau-Lelievre *et al.* 2003). D'autres études ont aussi mis en évidence l'expression des facteurs PEA3 dans les poumons (Monté *et al.* 1995, 1994). De plus, l'expression d'ETV4 est retrouvée non seulement dans le mésenchyme pulmonaire lors du développement embryonnaire mais aussi au niveau de l'épithélium (Y. Liu *et al.* 2003).

4.5.2 Morphogenèse de branchement des reins

Comme les poumons, les reins vont se former par morphogenèse de branchement, qui nécessite la différenciation ainsi que l'organisation des lignées épithéliales du néphron. Différents modèles d'études ont permis de mettre en évidence l'implication des facteurs PEA3 dans ce processus de formation des reins. Tout d'abord chez la souris ou l'expression de ces facteurs est retrouvée (Monté *et al.* 1995). De plus, la mise en place de souris dont l'expression d'*ETV4* et d'*ETV5* est délétée totalement ou partiellement (*ETV4*^{-/-}, *ETV5*^{+/-}) met en évidence un arrêt total du développement rénal (B. C. Lu *et al.* 2009). Pour finir, une étude récente de 2016 confirme l'implication des facteurs ETV4 et ETV5 dans la morphogenèse du rein chez le poisson zèbre (Marra and Wingert 2016).

5 Implication des facteurs PEA3 au niveau pathologique

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 comprenant ETV1, ETV4 et ETV5 sont retrouvés au niveau pathologique uniquement dans le cancer. Ces trois facteurs sont ainsi impliqués dans le mélanome, le sarcome d'Ewing, le cancer de l'ovaire mais aussi de nombreux autres cancers (Oh, Shin, and Janknecht 2012).

Le projet de thèse porte sur les facteurs ETV1 et ETV4 et leur implication dans les cancers hormono-dépendants du sein et de la prostate. La partie suivante de l'introduction est donc focalisée plus particulièrement sur ces aspects : l'étude de l'implication du facteur ETV4 dans le cancer du sein fait l'objet de la Partie II de l'introduction et l'implication du facteur ETV1 dans le cancer de la prostate fait l'objet de la Partie III de l'introduction.

Partie II: L'implication du facteur ETV4 dans la tumorigénèse mammaire (TM)

1 La glande mammaire

1.1 Anatomie et fonction de la glande mammaire

La glande mammaire dont la fonction est la production de lait est composée de graisse, de quinze à vingt lobes, de tissus conjonctifs ainsi que de canaux. Les unités ducto-lobulaires sont les structures permettant la production de lait, et sont elles mêmes constituées d'acini. Au niveau cellulaire, les acinis sont composés de deux tissus principaux, l'épithélium parenchymateux dont la fonction est de produire et délivrer le lait, et le stroma qui entoure et supporte l'épithélium. Le stroma est composé des nombreux types cellulaires (fibroblastes, adipocytes et cellules immunitaires), de vaisseaux sanguins, de nerfs et de fibres extracellulaires qui sont les composants majoritaires du collagène de type I (**Figure 8**).

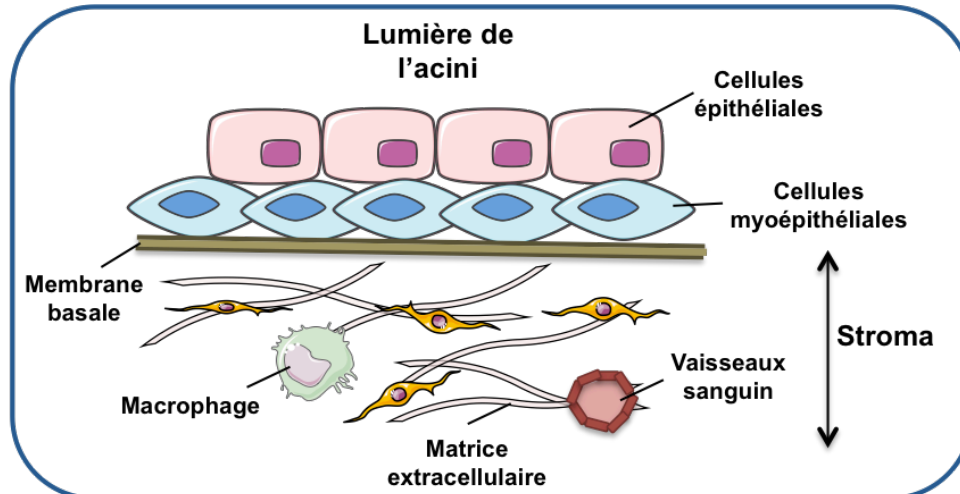


Figure 8 : Composition de la structure cellulaire d'un acini.

Composition cellulaire des différents compartiments des acinis, on retrouve ainsi l'épithélium parenchymateux composé des cellules épithéliales et myoépithéliales, reposant sur la membrane basale. Sous cette membrane basale on retrouve le stroma lui-même composé des macrophages, de vaisseaux sanguins et de la matrice extracellulaire.

1.2 Organogenèse de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire s'effectue en différents stades : ① pendant le développement embryonnaire, puis majoritairement post-nataux, à différentes périodes ② pendant la puberté, ③ lors de la gestation et de la lactation, ④ puis après la gestation lors de l'involution.

1.2.1 Développement embryonnaire de la glande mammaire

La glande mammaire se développe à partir du dixième jour de développement embryonnaire chez la souris, celle-ci dérive des feuilletts ectodermiques et mésodermiques. Se forment alors des bandes bilatérales d'ectoderme multicouches allant du bourgeon de membre supérieur jusqu'aux bourgeons des membres inférieurs au niveau de la face ventrale de l'embryon. Chez les humains, ces plaques disparaissent pour ne laisser que les placodes mammaires au niveau épithélial. Puis ces placodes vont s'invaginer vers le mésenchyme jusqu'au coussinet adipeux afin de former les bourgeons de la glande mammaire (Sakakura et al. 1987; Julie R Hens and Wysolmerski 2005). Lorsque le bourgeon atteint la couche adipeuse, la ramification du conduit commence afin de former des bourgeons secondaires, dix à quinze branches sont alors générées sans apport d'hormone et forment les conduits lactifères. La « parathyroid hormone-related protein » (PTHrP) joue un rôle central dans la régulation de la transition induisant la formation des bourgeons et le branchement *via* la sécrétion de différentes protéines comme BMP4 « bone morphogenetic protein 4 » (J. R. Hens *et al.* 2007).

Avant que le développement embryonnaire ne se termine et que ce système reste au repos jusqu'à la puberté, se forme la lumière canalaire et la génération de la structure du mamelon (**Figure 9**).

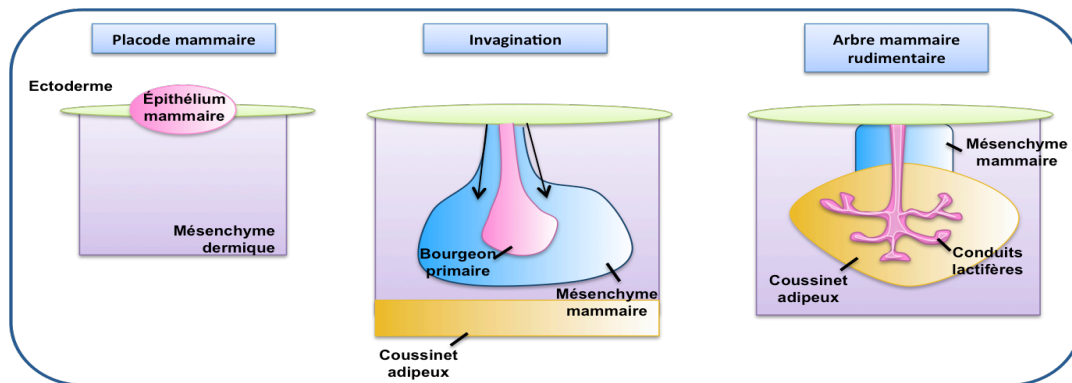


Figure 9 : Développement embryonnaire des glandes mammaires.

Évolution de la formation de la glande mammaire lors du développement embryonnaire, qui passe par différents stades : placode, invagination, arborisation.

1.2.2 Développement de la glande mammaire lors de la puberté

Lors de la puberté, la glande subit une croissance allométrique sous l'influence d'hormones endocriniennes et de facteurs de croissance. Ainsi les bourgeons terminaux nommés TEB pour « terminal end buds » et les cellules de la coiffe situées aux extrémités des bourgeons prolifèrent et pénètrent dans le coussinet adipeux. Ce développement de l'arbre épithélial s'effectue donc par une étape de morphogenèse de branchement. Les structures ductales primaires sont mises en place grâce aux bifurcations des TEB, phénomène régulé par le stroma qui l'entoure et induit la formation d'acini. Cette morphogenèse de branchement est contrôlée par différentes hormones :

- ✓ L'hormone de croissance GH « growth hormone » : est sécrétée par la glande pituitaire et joue un rôle important dans le développement de la glande mammaire (Gallego *et al.* 2001). La GR induit la signalisation de l'IGF1 au stroma.
- ✓ L'IGF1 « Insulin-like growth factor 1 » : peut donc être produite dans le stroma grâce à la fixation de la GH sur son récepteur, elle peut aussi être produite par le foie et sera acheminée aux cellules de la glande mammaire. L'IGF1 a donc une action endocrine et paracrine et est impliquée dans la prolifération et le développement de la glande mammaire (Cannata *et al.* 2010).

- ✓ Estrogène : cette hormone est produite par les ovaires et joue aussi un rôle lors du développement de la glande mammaire pendant la puberté en induisant une forte croissance de celle-ci *via* sa fixation au niveau de son récepteur ESR1 situé dans les cellules épithéliales mammaires (Silberstein *et al.* 1994).

Ces trois facteurs vont donc induire la prolifération des cellules épithéliales qui vont former l'arbre épithélial. D'autres facteurs de croissance sont aussi impliqués lors de la morphogenèse de branchement comme les membres des familles EGF et FGF, qui vont influencer l'architecture de l'arbre épithélial ainsi que sa croissance (Gorska *et al.* 1998; Ingman and Robertson 2008). Enfin, d'autres protéines comme certaines métalloprotéases vont être impliquées dans le remodelage de la membrane basale et participer ainsi aux changements de l'architecture lors de la morphogenèse (Tan *et al.* 2014; Radisky and Radisky 2010).

1.2.3 Développement de la glande mammaire lors de la gestation et de la lactation

Lors de la gestation, la glande mammaire va se préparer à la lactation grâce à des changements comme la maturation de la glande mammaire et l'alvéogénèse. Ces processus sont effectués sous le contrôle de la prolactine et de la progestérone. La progestérone va permettre une large ramification latérale de l'arbre épithélial ainsi que l'alvéogénèse qui sont des processus nécessaires à la production du lait. La prolactine qui est synthétisée par la glande pituitaire possède un rôle majeur lors de la lactation en favorisant la différenciation des structures spécialisées des alvéoles. Celle-ci agit également directement sur les cellules épithéliales mammaires en activant l'expression des gènes codant pour les protéines de lait comme la β -caséine *via* l'activation de la voie JAK2/STAT5 et participe également à la production de la progestérone ovarienne. (Naylor *et al.* 2005).

1.2.4 Involution de la glande mammaire

Lorsque la période de lactation prend fin, la glande mammaire va revenir à son état adulte d'origine. La production de lait par les cellules épithéliales est stoppée et la structure de l'arbre épithélial se simplifie. L'involution s'effectue en deux étapes : lors de la première étape qui est réversible, les cellules alvéolaires se détachent et sont éliminées par apoptose grâce à une augmentation de protéases perméabilisant la

membrane lysosomale mais aussi *via* l'activation du programme de mort cellulaire au stade précoce de l'involution (M. Li *et al.* 1997). Lors de la deuxième phase les protéases sont activées et induisent une seconde vague d'apoptose permettant un remodelage tissulaire important; la majorité de l'épithélium sécrétoire est ainsi éliminé puis remplacé par des adipocytes (M. Li *et al.* 1997). Certaines MMPs comme la MMP2 et la MMP3 participent à la différenciation des adipocytes et au remodelage tissulaire (Sympson *et al.* 1994; Fata *et al.* 2001).

1.3 Implication du groupe PEA3 dans le développement de la glande mammaire

Les gènes du groupe PEA3 sont fortement co-exprimés au 15,5^{ème} jour de développement embryonnaire au niveau du bourgeon épithélial de la glande mammaire ce qui suggère qu'ils jouent un rôle dans le développement de celle-ci (Chotteau-Lelièvre *et al.* 1997). D'autres études ont mis en évidence une surexpression des membres *PEA3* dans les cellules épithéliales lors de l'organogenèse de la glande mammaire. Cette expression se poursuit lors du développement de l'épithélium entre les jours 10,5 et 15,5. À partir du jour 15,5 correspondant au début de la détermination du sexe, l'expression de *PEA3* est perdue chez le mâle mais continue dans l'embryon femelle (T. Shepherd and Hassell 2001). Par la suite, lors du développement post-natal de la glande mammaire, une forte expression des gènes du groupe PEA3 est retrouvée lors de la puberté et de la gestation, périodes pendant lesquelles ces facteurs vont participer à la croissance de l'épithélium ainsi qu'à la morphogenèse de branchement de la glande avant de diminuer lors de la lactation (T. Shepherd and Hassell 2001; Chotteau-Lelievre *et al.* 2003). Ces gènes sont donc fortement exprimés lors des périodes nécessitant une forte croissance épithéliale ainsi qu'une importante ramification. Leur expression diminue ensuite au milieu de la gestation et reste relativement faible pendant la lactation et l'involution (T. Shepherd and Hassell 2001). Les facteurs de transcription du groupe PEA3 participent ainsi au contrôle de la prolifération et de la migration des cellules souches épithéliales mammaires en régulant le programme de différenciation de ces cellules. En effet, une étude menée sur des cellules épithéliales mammaires met en évidence que les facteurs ETV4 et ETV5 sont capables d'induire leur morphogénèse de branchement *in vitro*, et qu'ils sont fortement exprimés durant ce même processus *in vivo* (Chotteau-Lelievre *et al.* 2003).

2 Généralités sur le cancer du sein

2.1 Incidence et mortalité du cancer du sein

Le cancer du sein est une tumeur maligne qui se développe à partir des cellules épithéliales des conduits de la glande mammaire. C'est le cancer le plus diagnostiqué chez la femme dans les pays industrialisés et la deuxième cause de mortalité par cancer en France. La ligue contre le cancer estime à 54 000 le nombre de nouveaux cas et à 11 900 le nombre de décès par an en France. Le dépistage précoce par mammographie de ce cancer accroît les chances d'une réponse positive aux traitements et diminue les risques de mortalité (Heinävaara, Sarkeala, and Anttila 2016).

2.2 Biologie du cancer du sein

Dans des conditions physiologiques, l'épithélium de la glande mammaire forme une couche uniforme, bien définie et structurée. La progression tumorale va être caractérisée par le développement d'une masse à partir d'une population cellulaire qui est capable d'inhiber les mécanismes d'apoptose, d'induire l'invasion et la prolifération. D'autres événements vont participer à la tumorigenèse comme l'angiogenèse, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (**Figure 10**), l'immunosuppression, l'hypoxie intra-tumorale ainsi que de nombreuses voies de signalisation.

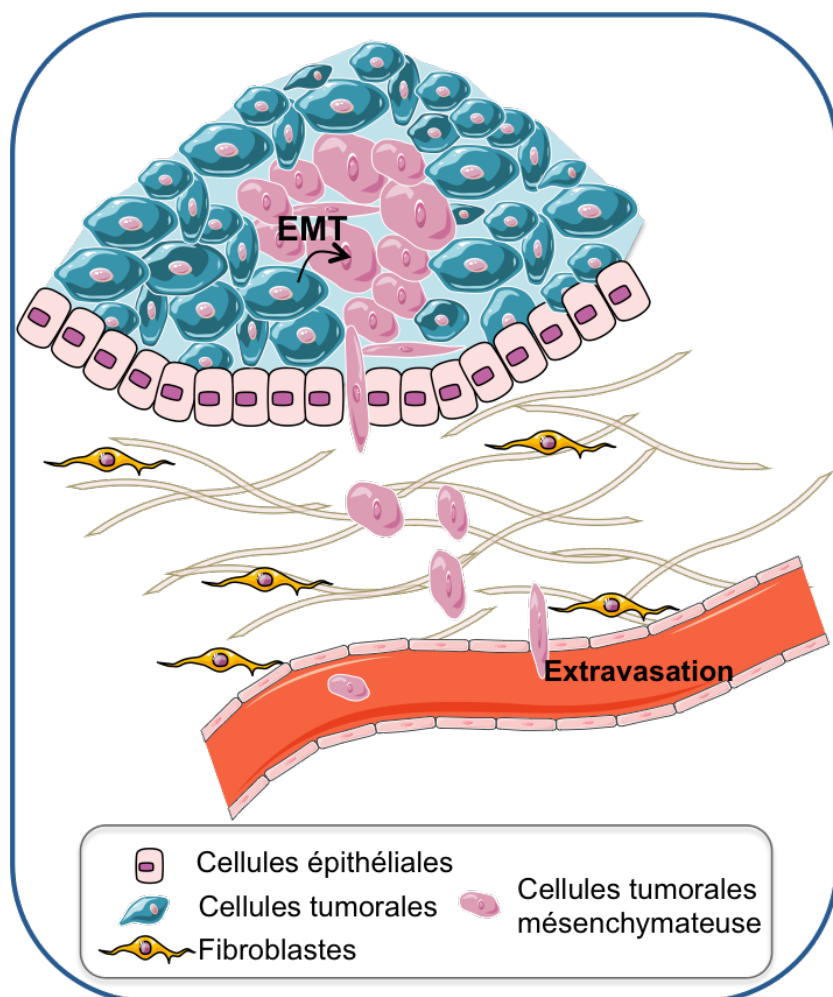


Figure 10 : Schéma représentant la transition épithélio-mésenchymateuse lors de la tumorigénèse.

Les cellules subissant l'EMT perdent leurs adhésions cellules-cellules et gagnent en motilité afin de pouvoir rejoindre la circulation par extravasation et permettre la formation des métastases. (Adapté de Peinado, Olmeda and Cano, 2007)

2.2.1 Implication du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est composé de cellules cancéreuses, de cellules stromales et de la matrice extracellulaire (ECM : extracellular matrix).

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un phénotype adapté à certaines conditions comme un faible taux d'oxygène et de nutriments. Ces adaptations peuvent être induites par une instabilité génétique et par de nombreuses mutations.

Le stroma est composé de nombreux types cellulaires qui sont capables de communiquer avec les cellules cancéreuses (Weber and Kuo 2012). Les fibroblastes retrouvés dans le stroma sont recrutés dans la zone tumorale et appelés CAFs pour fibroblastes associés au cancer. Ces CAFs vont permettre l'activation de nombreux facteurs comme le TGF- β (transforming growth factor- β) participant à l'EMT (Y. Yu *et al.* 2014). Les CAFs vont aussi participer à la migration cellulaire grâce à la sécrétion de l'HGF (hepatocyte growth factor) (Tyan *et al.* 2011).

De plus, le microenvironnement tumoral développe un processus inflammatoire grâce au recrutement de macrophages associés à la tumeur (TAM) qui permettent : le remodelage tissulaire, la suppression de l'immunité ainsi que la progression tumorale grâce à la sécrétion de nombreuses cytokines, facteurs de croissance, de protéases et de métalloprotéases (MMP) (Carron *et al.* 2017). La majeure partie du microenvironnement tumoral est composé de l'ECM qui est dérégulé et remodelé lors du développement tumoral par les MMPs, en particulier MMP2 et MMP9 qui digèrent la matrice et inhibent les adhésions cellules-cellules *via* la dégradation de la E-cadhérine (B. Liu *et al.* 2016b).

2.2.2 Rôle de l'hypoxie dans le métabolisme tumoral

Le métabolisme des tumeurs solides est différent de celui des tissus sains et passe par l'activation d'une voie énergétique alternative. Cette altération du métabolisme dans les cellules cancéreuses est caractérisée par la suppression de la phosphorylation oxydative et l'activation de la glycolyse ainsi que l'utilisation de la glutamine. La diminution de l'activité mitochondriale et l'augmentation de la glycolyse sont suivies d'une fermentation acide, d'une production d'ATP moins efficace et d'une production d'énergie dans des conditions anaérobiques, ce processus est nommé effet Warburg (WARBURG 1956).

2.2.3 Développement de l'angiogenèse lors du processus d'invasion

La croissance de la tumeur primaire induit le développement du système vasculaire en réponse à la production du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ce processus est appelé angiogenèse. Pour cela, la tumeur met en place un environnement pro-angiogénique *via* l'augmentation de la production d'activateurs angiogéniques et d'une diminution de ses inhibiteurs. Ces processus induisent ainsi une structure et un fonctionnement anormal des vaisseaux, caractérisé par une architecture altérée provoquant une augmentation de la perméabilité microvasculaire (Geevarghese and Herman 2014). Cette défaillance architecturale a pour conséquence d'induire un mauvais apport en oxygène et en nutriments (Benjamin *et al.* 1999; De Bock, Cauwenberghs, and Carmeliet 2011).

Le recrutement des péricytes le long des cellules endothéliales est essentiel pour la formation des vaisseaux tumoraux, cependant leur recrutement est dépendant de

nombreuses voies de signalisation, de facteurs de croissance et de la dégradation de l'ECM par les métalloprotéases MMP4 et MMP9 (Jain 2003; Chantrain *et al.* 2006, 2004).

2.2.4 L'implication des exosomes dans la tumorigenèse mammaire

Les exosomes sont des nanovésicules de 50-100nm induisant un phénotype invasif. En effet, ils sont chargés en lipides, en matériel génétique (ARNm et miRNA), en protéines, en diverses héparanes sulfate et protéoglycanes qui vont être impliqués dans la progression tumorale (Record *et al.* 2014; Ratajczak *et al.* 2006; J.-K. Lee *et al.* 2013; Ramani *et al.* 2013). La sécrétion d'exosomes par les fibroblastes induit la migration des cellules cancéreuses mammaires *via* l'activation de la voie Wnt, voie qui est impliquée dans les cellules métastatiques et lors de la modulation de l'angiogenèse (J.-K. Lee *et al.* 2013; Hoffman 2013; Luga and Wrana 2013). De plus, l'expression à la surface des exosomes issus des cellules cancéreuses du TGF- β induit la différenciation des fibroblastes en CAF qui ont un rôle important lors de l'invasion et de la progression tumorale (Webber *et al.* 2010).

2.2.5 Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Figure 10)

La dissémination cellulaire s'effectue lors de la désorganisation et la perte de polarisation épithéliale qui est induite par l'absence des contacts entre les cellules. Cette perte de contact provoquant le détachement et la migration cellulaire. Le programme de l'EMT est caractérisé par une augmentation de la signalisation mésenchymateuse comprenant la vimentine, la N-cadhérine ainsi que par une altération de nombreuses protéines membranaires et intracellulaires comme la E-cadhérine et les glycoprotéines transmembranaires qui sont responsables de l'adhésion entre les cellules et la polarité endothéliale (Thiery 2002). L'EMT est un processus important lors du développement embryonnaire mais sa dérégulation joue un rôle important dans la progression du cancer du sein, en participant au passage d'un phénotype cancéreux non invasif à invasif (Mallini *et al.* 2014).

Dans des conditions physiologiques, la E-cadhérine transmembranaire et la β -caténine intracellulaire sont responsables du maintien de l'intégrité de l'épithélium grâce à la formation d'un complexe se fixant à l'actine du cytosquelette. Dans les cellules tumorales, l'absence de ces protéines couplées à l'expression des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et la fibronectine sont associées à l'EMT induisant ainsi des modifications morphologiques. L'EMT est donc corrélée à la migration,

l'invasion et la formation de métastases (Mendez, Kojima, and Goldman 2010; Jing Yang and Weinberg 2008; Craene and Berx 2013). Certains facteurs de transcription comme Twist, Snail et NF- κ B modulent l'EMT en réprimant l'expression des protéines endothéliales et en induisant l'expression des protéines mésenchymateuses (Vesuna *et al.* 2008; Tsubaki *et al.* 2013). De plus, il a été montré que les facteurs MAPK, p38, TGF- β et PI3K appartiennent aux signaux participant à la régulation des gènes impliqués lors de l'EMT (Blanco *et al.* 2002; Jing Yang *et al.* 2004; Grund *et al.* 2008).

2.2.6 Voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse

Les propriétés invasives des cellules cancéreuses sont régulées par de nombreuses voies de signalisation. Ainsi les récepteurs membranaires HER2, EGFR et les récepteurs couplés à la protéine G activent la voie PI3K/AKT/mTOR induisant ainsi la croissance cellulaire *via* l'activation de la prolifération, la survie et l'EMT (Gillham *et al.* 1999; L. Zhang, Zhou, and ten Dijke 2013). En effet, mTOR est par exemple capable d'inhiber la protéine Bcl-2 qui est pro-apoptotique et favorise ainsi la survie (Joensuu, Pylkkänen, and Toikkanen 1994; Bai and Wang 2014). De plus, lors de la progression tumorale et de la formation de métastases, PI3K augmente *via* mTOR l'expression de HIF-1 α induisant l'activation de Twist impliquée dans l'EMT (Harada *et al.* 2009; Mimeault and Batra 2013; Phillips *et al.* 2005; Nan and Nan 2011).

2.3 Classification moléculaire du cancer du sein

Les différences moléculaires basées sur le profil d'expression des gènes révèlent que le cancer du sein peut être classé en différents sous-types : luminal A, luminal B, HER2⁺, basal-like et triple négatif. Ces sous-groupes prennent en considération le statut d'expression des récepteurs hormonaux (estrogène, progestérone), le statut HER2 ainsi que la prolifération des cellules luminales.

2.3.1 Luminal

Les tumeurs de type luminal A représentent 50 à 60% des tumeurs mammaires. Elles sont caractérisées par une forte expression des gènes codant pour les récepteurs aux estrogènes ainsi que des gènes régulant ces récepteurs comme *GATA-3*, *FOX A1* entre autres. À l'inverse les gènes impliqués dans la prolifération sont exprimés faiblement et

une absence de surexpression de *HER2* est observée. De plus, dans ce type de tumeur, *P53* est muté dans 13% des cas (Boisserie-Lacroix *et al.* 2013).

Les tumeurs de type luminal B représentent 20% des tumeurs mammaires. Comparées aux tumeurs de type luminal A, une faible expression des récepteurs aux estrogènes ainsi qu'une faible expression des gènes les régulant sont observées, ce type de tumeur présente une forte expression des gènes régulant la prolifération (Sorlie *et al.* 2003). Dans ce type de tumeur *P53* est muté dans 66% des cas (Boisserie-Lacroix *et al.* 2013).

2.3.2 Type HER2

Les tumeurs HER2⁺ représentent 10% des tumeurs mammaires. Elles sont caractérisées par l'absence des gènes associés aux récepteurs aux estrogènes, et présentent une forte expression du gène HER2 ainsi que des gènes associés à la prolifération. En effet, la surexpression de HER2 induit la croissance tumorale par l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT qui augmentent la prolifération, l'invasion et la formation de métastases (Rimawi, Schiff, and Osborne 2015). Dans ce groupe, *P53* est muté dans 71% des cas. Au regard du phénotype ce type de tumeur est de moins bon pronostic que les tumeurs de type luminal A ou B (Boisserie-Lacroix *et al.* 2013).

2.3.3 Type basal-like

Les tumeurs basal-like représentent 10% des tumeurs mammaires et sont présentes dans 56 à 85% des tumeurs triple-négatives (Billar *et al.* 2010; Whitman, Albarracin, and Gonzalez-Angulo 2011). Ce type de tumeur est caractérisé par une absence d'expression des récepteurs aux estrogènes et à une forte expression des gènes impliqués dans la prolifération. Dans ce groupe, *P53* est muté dans 82% des cas. Au regard du phénotype, ce type de tumeur est de moins bon pronostic que les tumeurs de type luminal A ou B (Boisserie-Lacroix *et al.* 2013).

2.3.4 Cancer du sein triple-négatif

Les cancers triple négatif représentent 10 à 30% de tous les cancers mammaires et 70% des tumeurs mutées sur le gène BRCA1 (Billar *et al.* 2010; Whitman, Albarracin, and Gonzalez-Angulo 2011). Ces tumeurs sont caractérisées par une absence complète de l'expression des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone ainsi que de HER2. Cette triple négation d'expression de gènes est associée à la forte expression des gènes

codant les cytokératines et l'EGFR. Au regard du phénotype, ce type de tumeur est très agressif et de mauvais pronostic. Les cancers du sein triple négatifs sont souvent associés aux cancers se développant chez les femmes jeunes.

3 Implication du facteur de transcription ETV4 dans le cancer du sein

Les facteurs du groupe PEA3 dont fait partie ETV4 ont un rôle important dans le développement embryonnaire puis chez l'adulte *via* leur implication sur la prolifération, la différenciation, la migration ainsi que lors du remodelage tissulaire.

3.1 Surexpression de ETV4 dans le cancer du sein

En plus de son implication dans le développement de la glande mammaire, ETV4 est associé au cancer mammaire chez la souris (Chotteau-Lelièvre *et al.* 1997; Trimble *et al.* 1993; T. Shepherd and Hassell 2001; Kurpios *et al.* 2003) ainsi que chez l'Homme (Baert *et al.* 1997; Yuan *et al.* 2014).

De nombreuses études ont mis en évidence la surexpression du facteur ETV4 dans le cancer du sein et la corrélation de cette surexpression avec le stade de la tumeur. Ainsi, les données de la littératures montrent que l'expression en ARNm d'*ETV4* est un nouveau marqueur de la progression tumorale et de l'effusion maligne (Davidson *et al.* 2004). En effet, ce facteur de transcription joue un rôle important lors des processus d'invasion et lors de la formation des métastases (Bièche *et al.* 2004; Yuan *et al.* 2014). Une étude menée par Kaya met en évidence que la transfection de cellules cancéreuses mammaires non invasives avec le facteur ETV4 apporte des capacités de motilité et d'invasion à ces cellules lorsqu'elles sont injectées en sous-cutanée *in vivo* dans des souris immunodéprimées (Kaya *et al.* 1996).

Cependant, une minorité d'études montre que la surexpression du facteur ETV4 est associée à une augmentation de la survie, c'est le cas d'une publication Japonaise effectuée sur une faible cohorte de patientes (J, Kinoshita 2002).

3.2 Mécanismes et voies de signalisation impliqués dans la surexpression de ETV4

3.2.1 Voie Wnt1/ β -caténine et ETV4 dans le cancer du sein

Wnt1 est un oncogène mammaire qui code pour un facteur impliqué dans la signalisation. Lorsqu'il est exprimé, cet oncogène est capable d'induire le développement d'une hyperplasie épithéliale puis d'un carcinome dans les glandes mammaires murines (Tsukamoto *et al.* 1988). Des études menées à partir de modèles murins ont permis de mettre en évidence une surexpression du facteur ETV4 dans des tumeurs développées suite à la surexpression de Wnt1 (Howe *et al.* 2001; R. Baker *et al.* 2010). Ces données indiquent donc un rôle important d'ETV4 dans la tumorigenèse mammaire induite par Wnt1 (R. Baker *et al.* 2010)

Au niveau fonctionnel, la fixation de Wnt1 au niveau de son promoteur induit la stabilisation cytosolique de la β -caténine activant ainsi son activité transcriptionnelle suite à la formation du complexe β -caténine-TCF. Une étude met en évidence un lien entre la voie Wnt1/ β -caténine et ETV4. La formation d'un complexe entre ses facteurs va induire la transcription de gènes dont certains sont impliqués dans la tumorigenèse mammaire comme c'est le cas du gène codant pour la cyclooxygenase-2 (COX-2)(Howe *et al.* 2001) (**Figure 11**). Des études réalisées dans d'autres cancers ont aussi mis en évidence cette synergie entre le facteur ETV4 et la voie Wnt1/ β -caténine et l'activation de gène comme c'est le cas de la MMP-7 dans les tumeurs intestinales (Crawford *et al.* 2001).

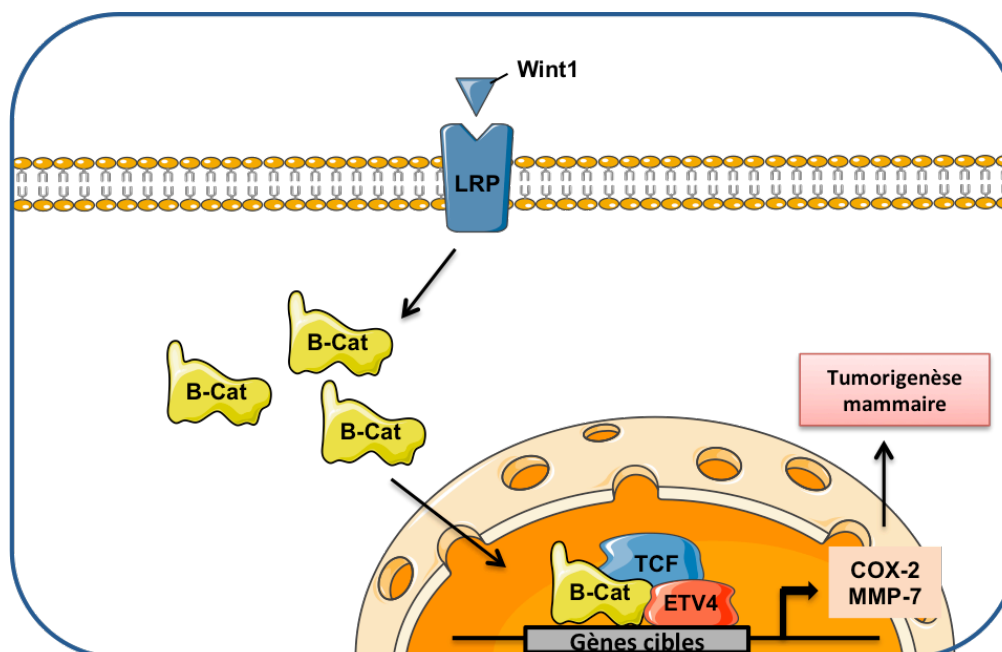


Figure 11: Schéma simplifié montrant la coopération entre la voie Wnt1/ β caténine et le facteur ETV4 dans la tumorigenèse mammaire.

3.2.2 Association HER2/neu et ETV4 dans le cancer du sein

La surexpression de l'oncogène HER2/neu/ ErbB2 est un événement moléculaire fréquemment retrouvé dans les cancers et notamment dans les cas de tumeurs mammaires et ovariennes. Le gène *HER2* code pour un récepteur à activité tyrosine kinase appartenant à la famille des récepteurs de facteurs de croissance, et agit à travers de nombreuses voies de signalisation comme Ras, PI3K afin d'altérer l'expression de nombreux gènes impliqués dans la tumorigenèse. Comme nous avons pu le voir précédemment les tumeurs mammaires surexprimant l'oncogène Her2 sont de mauvais pronostic.

De nombreuses études ont mis en évidence une corrélation entre la surexpression de HER2/neu et celle du facteur de transcription ETV4. Cette association est rapportée dans 93% des échantillons de tumeurs mammaires HER2 positives (Benz *et al.* 1997). De plus, de multiples autres études ont validé la corrélation de surexpression d'ETV4 et HER2/Neu dans différents modèles : échantillons de tumeurs, murins ou encore lignées cellulaires cancéreuses mammaires (Baert *et al.* 1997; Bièche *et al.* 2004; Fleming *et al.* 2004; T. G. Shepherd *et al.* 2001; Myers *et al.* 2006).

Cependant, une étude contradictoire menée sur des lignées cancéreuses mammaires et ovariennes montre que l'activité du promoteur HER2/neu peut être inhibée par ETV4 de façon dose dépendante (Xing *et al.* 2000).

Enfin, le lien de régulation positif entre HER2/neu et ETV4 est mis en évidence dans différentes publications. En effet, l'étude du promoteur *HER2/neu* dans lequel le site de fixation EBS est muté induit une diminution de l'expression du gène. L'étude de ce promoteur permet aussi de mettre en évidence une synergie entre ETV4 et c-Jun dans l'activation de *HER2/neu* (Matsui *et al.* 2006). De plus, l'inhibition du facteur ETV4 dans une lignée de souris transgénique exprimant ErbB2 entraîne une formation plus tardive des tumeurs (T. G. Shepherd *et al.* 2001). Ces résultats portant sur l'étude du promoteur et sur des expérimentations *in vivo* mettent bien en évidence un lien entre le facteur ETV4 et l'oncogène HER2/ neu dans la tumorigenèse de la glande mammaire.

3.3 Dérégulation des gènes cibles d'ETV4 participant au cancer du sein

Comme nous l'avons vu précédemment l'expression du facteur ETV4 est régulée par de nombreuses voies de signalisation et son importance dans la tumorigenèse mammaire est suggérée non seulement par les données mettant en évidence sa surexpression, mais aussi par la longue liste de gènes pro-tumorigènes qu'il transactive à son tour. Les gènes ainsi régulés par ETV4 vont être responsables de divers processus conduisant à la formation et au développement de tumeurs mammaires.

C'est le cas par exemple du gène DBC1 (deleted in breast cancer 1) qui est un coactivateur des récepteurs nucléaires comme le récepteur aux oestrogènes (ER : estrogen receptor) et régule également négativement certaines modifications épigénétiques, tels que les désacétylases SIRT1 et HDAC3. De plus, DBC1 agit avec le facteur ETV4 afin d'induire la progression des cancers du sein ER-négatifs (H. J. Kim *et al.* 2015).

Le facteur ETV4 va réguler l'expression d'autres gènes ayant une implication dans le développement et la mise en place du cancer du sein.

3.3.1 Gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse va permettre aux cellules de perdre leur adhésion cellule-cellule et gagner ainsi en motilité, cela permettant ainsi d'augmenter leur potentiel métastatique. Lors de cette transition, on observe une diminution des marqueurs épithélias accompagnée d'une augmentation des marqueurs mésenchymateux. L'implication du facteur ETV4 dans l'EMT est documentée dans de nombreux cancers comme dans les tumeurs pulmonaires (Upadhyay *et al.* 2006) ou ovariennes (Cowden Dahl *et al.* 2009). De plus, il a été mis en évidence dans le cas du cancer du sein que le facteur de transcription ETV4 peut être lui même régulé au niveau transcriptionnel par le facteur de croissance TGF- β , conduisant à l'induction de l'EMT de cellules épithéliales mammaires (Arase *et al.* 2017).

Le facteur ETV4 participe à l'EMT lors de la tumorigenèse mammaire en régulant l'expression de nombreux gènes.

- ✓ TWIST : lors de l'EMT, TWIST participe à l'inhibition de l'expression de la E-cadhérine et de la β -caténine qui sont des marqueurs de cellules épithéliales. Dans les cellules tumorales mammaires, le gène *TWIST* est activé grâce à la synergie d'action entre le facteur de transcription ETV4 et SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) (Qin *et al.* 2009). Ce gène peut aussi être activé par la voie Wnt via l'activation d'ETV4 (Howe *et al.* 1906).
- ✓ Cycline : les cyclines sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire au niveau de la progression de la phase G1. Ainsi les cyclines sont impliquées dans différentes propriétés cellulaires comme la migration et l'invasion ou encore la différenciation cellulaire. Une étude menée au sein de notre équipe à partir de cellules épithéliales mammaires cancéreuses a permis de mettre en évidence la *cycline D2* comme gène cible d'ETV4. De plus, des expériences de répression d'expression de la *cycline D2* ont permis de montrer l'existence une boucle de régulation négative entre le facteur ETV4 et la cycline D2 (Ladam *et al.* 2013). Le facteur de transcription ETV4 régule également l'expression de la cycline D3 et induisant une augmentation de l'activité du cycle cellulaire lors de la formation de tumeurs mammaires (Jiang *et al.* 2007).
- ✓ Snail : Snail induit l'EMT par la répression de la E-cadhérine durant le développement et la progression tumorale et à l'inverse, son inhibition dans

des cellules cancéreuses mammaires réverse partiellement l'EMT (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005; Peinado, Olmeda, and Cano 2007). ETV4 contrôle l'expression de Snail grâce à la présence sur son promoteur de domaine de fixation. Snail agit donc comme relais du facteur ETV4 dans l'EMT lors de la tumorigenèse mammaire (Yuen *et al.* 2011).

3.3.2 Gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire

Lors du développement de la tumeur, les cellules cancéreuses participent à différentes interactions avec l'environnement tumoral impliquant la matrice extracellulaire (ECM), les facteurs de croissances, les cytokines associées à l'ECM ainsi que les cellules environnantes (cellules endothéliales, fibroblastes...). Les métalloprotéases sont des enzymes jouant un rôle crucial dans la dégradation de nombreuses cellules d'adhérence, modulant ainsi les interactions cellule-cellule et l'ECM.

- ✓ MMP1 : est une collagénase capable de digérer le collagène de type I qui est retrouvé associée aux cellules stromales dans de nombreux cancers du sein (Heppner *et al.* 1996). Cette enzyme est également sécrétée par de nombreuses cellules tumorales, incluant des cellules cancéreuses mammaires très invasives les MDA231 (Templeton *et al.* 1990). De plus, une étude de l'activité promotrice de MMP1 a permis de mettre en évidence la présence de sites spécifiques permettant la fixation du facteur de transcription ETV4 sur cette même lignée cancéreuse mammaire (Benbow *et al.* 1999). Enfin, une recherche menée sur des cellules fibro-cartilagineuses met en évidence que les sites AP-1 et ETV4 présents sur le promoteur de MMP1 sont essentiels pour induire l'expression de cette métalloprotéase (Kapila, Xie, and Wang 2009).
- ✓ MMP2 et MMP9: les métalloprotéases 2 et 9 sont des gélatinases associées à la dégradation osseuse et jouent donc un rôle important dans la formation des métastases osseuses notamment dans le cancer du sein (J. Lee *et al.* 2001). MMP2 est sécrétée principalement par les fibroblastes et les ostéoclastes et va participer à la dégradation de la membrane basale (Ohshiba *et al.* 2003). Quant à MMP9, elle est produite principalement par les ostéoclastes (Ohshiba *et al.* 2003) et les cellules du système immunitaire comme les macrophages et les neutrophiles qui ont un rôle essentiel dans la

croissance tumorale (Egeblad and Werb 2002; Huang *et al.* 2002). Les métalloprotéases 2 et 9 sont capables de cliver le collagène de type I, IV et V et sont importantes pour la dégradation de la matrice osseuse (Björklund and Koivunen 2005) notamment dans le cancer du sein (B. Liu *et al.* 2016a). Des études ont permis de mettre en évidence la régulation de ces deux métalloprotéases dans le contexte de la tumorigenèse mammaire grâce à la formation d'un complexe entre ETV4 et AIB1 (amplified-in-breast-cancer 1) afin d'induire leur expression (Qin *et al.* 2008). De plus une corrélation positive est retrouvée entre les facteurs de transcription ETV4 et MMP2 dans des échantillons de tumeurs mammaires (Bièche *et al.* 2004).

4 La métalloprotéase MMP13

4.1 Généralités sur les métalloprotéases

4.1.1 Classification

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) forment une famille de protéases à zinc qui dégradent la majorité des composants de l'ECM. Les MMPs sont des endopeptidases comprenant une vingtaine de membres chez l'Homme et sont subdivisées en six groupes basés sur les spécificités de substrat : collagénases, stomélysines, gélatinases, matrilysines, les MMPs liées à la membrane (MT-MMP) et les autres (**Tableau 2**).

Tableau 2: Classification des métalloprotéases.

Groupe	Protéine	MMP
Collagénase	Collagénase 1	MMP-1
	Collagénase 2	MMP-8
	Collagénase 3	MMP-13
Stomélysine	Stomélysine 1	MMP-3
	Stomélysine 2	MMP-10
	Stomélysine 3	MMP-11
Gélatinase	Gélatinase-2	MMP-2
	Gélatinase-9	MMP-9
Matrilysine	Matrilysine-1	MMP-7
	Matrilysine- 2	MMP-26

MT-MMP	MT1-MMP	MMP14
	MT2-MMP	MMP15
	MT3-MMP	MMP16
	MT4-MMP	MMP-17
	MT5-MMP	MMP-24
	MT6-MMP	MMP-25
Les Autres		MMP-12
		MMP-19
		MMP-20
		MMP-21
		MMP-23
		MMP-27
		MMP-28

Les MMPs peuvent aussi être classées en fonction de leur structure, on trouve ainsi huit groupes, cinq de MMPs sécrétées et trois de type membranaire. Les MMPs chez les mammifères sont composées de deux domaines très conservés : le pro-domaine et le domaine catalytique possédant une région conservée (HEXXHXXGXXH) qui comprend trois histidines permettant la fixation du zinc (Jackson, Nebert, and Vasiliou 2010). On retrouve aussi d'autres domaines comme le domaine hémopexine connecté au domaine catalytique, une région charnière entre le domaine hémopexine et le domaine catalytique ainsi qu'un peptide signal, dont la fonction est de diriger les MMPs vers le réticulum endoplasmique (Kerkelä and Saarialho-Kere 2003) (**Figure 12 A**). Les domaines transmembranaires et cytoplasmiques sont présents dans le groupe des MMPs transmembranaires (**Figure 12 B**).

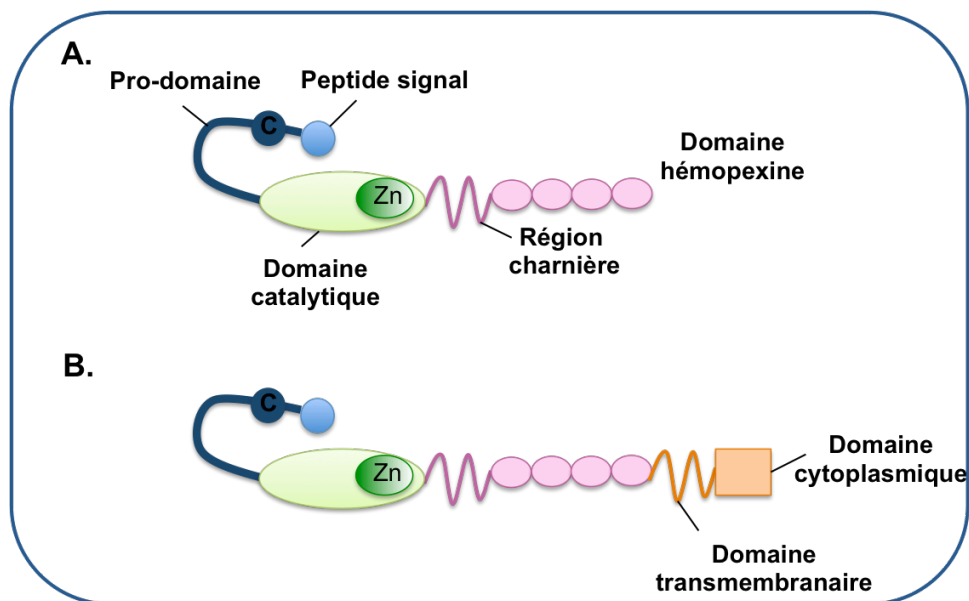


Figure 12: Domaines et structures des métalloprotéases.

A. Représentation de la structure commune des MMPs solubles dans lesquelles on retrouve le domaine hémopexine, la région charnière, le domaine catalytique, le pro-domaine et le peptide signal. B. Représentation de la structure des métalloprotéases transmembranaires présentant en plus un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique.

4.1.2 Régulation des MMPs

Un des mécanismes permettant de réguler l'activité des MMPs est l'activation de celles-ci. Les MMPs sont synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives avec un pro-domaine qui sera retiré lors de l'activation. Ce pro-domaine présente un motif conservé de cystéine proche du domaine catalytique, et une interaction entre les cystéines et les ions zinc du domaine catalytique permet le maintien de l'enzyme sous une forme latente. L'activation des MMPs dépend d'un changement de conformation du pro-domaine qui élimine le résidu cystéine permettant à l'eau d'interagir avec l'ion zinc contenu sur le site actif (**Figure 13**).

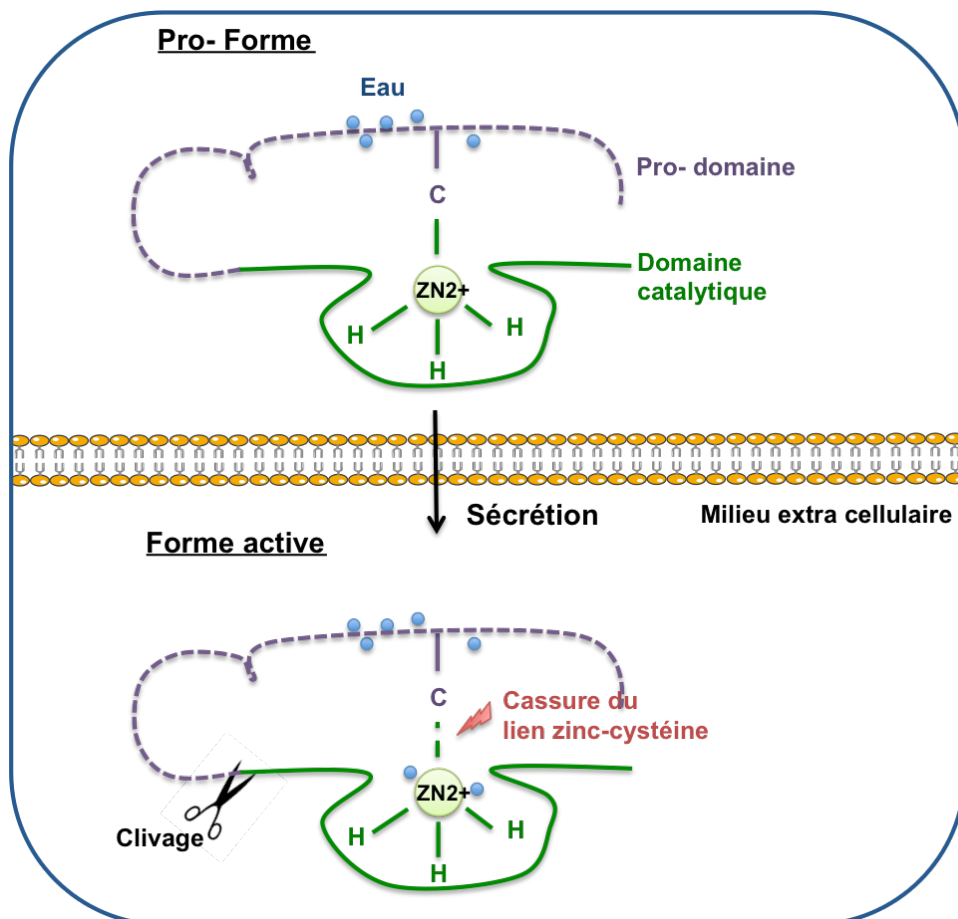


Figure 13: Schéma représentant le mécanisme d'activation des métalloprotéases. Activation des MMPs grâce au clivage du pro-domaine après la cassure du lien zinc-cystéine qui relie le pro-domaine et le domaine catalytique.

L'activité des MMPs peut aussi être contrôlée négativement par des inhibiteurs endogènes. L'inhibiteur principal des MMPs dans les tissus fluides est la α 2-macroglobuline qui est une protéine plasmatique (Sottrup-Jensen and Birkedal-Hansen 1989). L' α 2-macroglobuline se fixe aux MMPs et forme un complexe se fixant au récepteur scavenger permettant d'éliminer de façon irréversible les MMPs par endocytose (A. H. Baker, Edwards, and Murphy 2002). Il existe également quatre inhibiteurs de MMPs appelés TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). Les TIMPs sont des protéines sécrétées mais on les retrouve aussi associées à la membrane ainsi qu'à la surface cellulaire. Les quatre TIMPs inhibent toutes les formes actives des MMPs (A. H. Baker, Edwards, and Murphy 2002).

4.2 La collagénase MMP13

MMP13 est le troisième membre de la sous-famille des collagénases. Le gène de la *MMP13* a été cloné pour la première fois à partir d'une banque d'ADN complémentaire dérivée d'une tumeur mammaire (Freije *et al.* 1994a). Ce gène est localisé sur le chromosome 11 en position q22-23 (A M Pendás *et al.* 1995) à côté de locus d'autres MMPs (MMP-1, MMP-7, MMP-8...) ce qui suggère une évolution ancestrale commune des MMPs. La taille du gène codant la MMP13 est de 12,5 ko, il est composé de 10 exons et 9 introns produisant un ARNm de 2,7kb qui permet la synthèse d'une protéine de 471 acides aminés (Alberto M. Pendás *et al.* 1997).

4.3 Régulation de MMP13

4.3.1 Au niveau transcriptionnel

Une étude de la région proximale du promoteur de *MMP13* a permis de mettre en évidence différents sites majeurs de fixation de différents facteurs de transcription comme la séquence consensus d'AP-1 en position -50 à -56bp (paires de bases) et un site ETV4 en position -77 à -83bp (Tardif *et al.* 1997), ces deux sites sont essentiels pour la transcription de *MMP13*. En effet, une étude a permis de démontrer que les facteurs AP-1 et ETV4 agissent en synergie afin d'activer une transcription optimale de *MMP13* (Gutman and Wasyluk 1990). Un autre site OSE-2 (osteoblast specific element) est aussi identifié sur le promoteur proximal et coopère avec AP-1 afin d'augmenter l'expression de *MMP13* durant la différenciation des ostéoblastes (Winchester *et al.* 2000). D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation de l'expression de *MMP13*, c'est le cas de Cbfa1 (core binding factor 1) *via* la site OSE-2 afin d'induire la formation des ostéoblastes et des chondrocytes (Jiménez *et al.* 1999). Enfin *MMP13* peut être régulée par les BMPs (bone morphogenetic proteins) qui sont impliquées dans la formation osseuse. De nombreuses BMPs (BMPs 2, 4 et 6) inhibent l'expression en ARNm de *MMP13* par les ostéoblastes (Gazzerro, Rydziel, and Canalis 1999).

4.3.2 Régulation de MMP13 par des différents facteurs

Différents facteurs de croissance et hormonaux sont impliqués dans l'activation ou l'inhibition de *MMP13*.

- ✓ PTH (parathyroid hormone) qui est un facteur impliqué dans l'homéostasie calcique et est impliqué dans la résorption osseuse en faisant intervenir les

ostéoblastes et les ostéoclastes. PTH induit une augmentation des ARNm de MMP13, en effet la stimulation par la PTH d'une culture primaire de cellules osseuses induit une augmentation des ARNm des collagénases et de la gélatinase 9 (Witty *et al.* 1996).

- ✓ IGF-I et II (insulin-like growth factors) sont sécrétés par les cellules du squelette et agissent de façon autocrine sur la régulation fonctionnelle de la formation osseuse. Ces deux facteurs stimulent la synthèse du collagène de type I squelettique (Canalis *et al.* 1995). Le traitement d'une culture cellulaire d'ostéoblastes avec les IGF- I et II induit une diminution en ARNm des collagénases dont fait partie MMP13 (Canalis *et al.* 1995; Delany, Rydziel, and Canalis 1996).
- ✓ TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) influence à la fois l'environnement cellulaire et la production des MMPs. Dans les ostéoblastes, TGF- β 1 accélère la dégradation des ARNm de MMP13 en diminuant leur demie vie qui passent ainsi de 6,25 à 2 heures et diminue aussi leur expression génique (Rydziel, Varghese, and Canalis 1997).

4.3.3 Régulation par les cytokines

Les cytokines majeures impliquées dans la régulation de MMP13 sont les interleukines (IL) 1 et 6 ainsi que le TNF α (tumor necrosis factor alpha). Il-1, Il-6 et TNF α sont impliqués dans la formation des ostéoclastes et donc dans la résorption osseuse grâce à l'augmentation de l'expression en ARNm de certaines MMPs comme MMP13, MMP2, MMP9 et MMP3 (Kusano *et al.* 1998; Borden *et al.* 1996). La régulation de l'ARNm de MMP13 par Il-1 passe par les voies p38, JNK et NF- κ B (Mengshol, Vincenti, and Brinckerhoff 2001).

4.4 Rôle physiologique

4.4.1 Substrats de MMP13

MMP13 appartient au groupe des collagénases et clive différents types de collagène interstitiel :

- ✓ de type I : le plus abondant, il compose les ligaments, les tendons, les os ;
- ✓ de type II : représente plus de 50% des protéines du cartilage ;

- ✓ de type III : renforce les parois des structures creuses comme le cœur, les artères, l'intestin et l'utérus.

Le clivage du collagène par MMP13 s'effectue au niveau d'un site spécifique situé au $\frac{3}{4}$ du fragment de collagène et produit ainsi deux fragments $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{4}$ (Knäuper *et al.* 1996). MMP13 clive le collagène de type II cinq fois plus rapidement que le type I et six fois que le collagène de type III (Knäuper *et al.* 1996). MMP13 est la collagénase qui possède la meilleure capacité de dégradation du collagène. En effet, l'activité de MMP13 pour dégrader le collagène de type II est 10 fois plus importante que celle de MMP1 (Mitchell *et al.* 1996). De plus, parmi toutes les collagénases c'est MMP13 qui possède la meilleure capacité de dégradation de la gélatine, en effet, MMP13 dégrade la gélatine 44 fois plus efficacement que MMP1 et 3 à 8 fois plus efficacement que MMP8 (Knäuper *et al.* 1996).

D'autres composants de l'ECM sont susceptibles d'être dégradés par MMP13, comme les agrégans (Fosang *et al.* 1996), la tenascine C (Knäuper *et al.* 1997) ainsi que les fibrillines et les microfibrilles (Hindson *et al.* 1999).

4.4.2 Rôle dans l'ossification

Parmi toutes les collagénases, MMP13 est considérée comme ayant un rôle important dans la biologie squelettique en raison de sa présence exclusive dans le squelette lors du développement embryonnaire, au niveau des plaques de croissance cartilagineuses et dans les centres primaires d'ossification. L'étude de l'expression de MMP13 lors du développement embryonnaire a mis en évidence une expression précoce dès 4 semaines de gestation au niveau des cellules mésenchymateuses du cordon ombilical (Nina Johansson *et al.* 1997; Stähle-Bäckdahl *et al.* 1997). À partir de la 10^{ème} semaine et tout au long de la gestation, MMP13 est exprimée dans les vaisseaux sanguins périostés et lors de l'ossification primaire des os longs (Stähle-Bäckdahl *et al.* 1997)

La technique d'hybridation *in situ* a mis en évidence des transcrits de MMP13 au niveau des cartilages hypertrophiques des vertèbres de la colonne vertébrale, dans l'extrémité des côtes dorsales subissant une ossification ainsi que dans les ostéoblastes et dans les cellules périostiques lors de la 15^{ème} semaine du développement osseux fœtal (Nina Johansson *et al.* 1997). Puis, lors de la 16^{ème} semaine de gestation, les ARNm

de MMP13 sont détectés dans les ostéoblastes et les fibroblastes de l'os calcaire du crâne. Aucune expression de cette métalloprotéase n'est détectée dans les autres tissus fœtaux (peau, poumon, muscles...) (Nina Johansson *et al.* 1997). Chez l'adulte MMP13 est exprimée de nouveau lors des processus de remodelage du squelette et lors de la formation osseuse (Stähle-Bäckdahl *et al.* 1997).

Cette métalloprotéase est donc impliquée pendant les étapes d'ossification primaire, lors du développement embryonnaire ainsi que dans le remodelage des tissus chez l'adulte.

4.5 Implication pathologique de MMP13

4.5.1 Dans les pathologies inflammatoires

La métalloprotéase MMP13 est détectée dans de nombreuses conditions inflammatoires : dans l'athérosclérose, la cicatrisation, ainsi que dans l'ostéoarthrite et l'arthrite rhumatoïde. Une implication de cette collagénase 3 dans la dégradation du cartilage est mise évidence grâce à la détection de son expression dans du cartilage d'ostéoarthrite (Mitchell *et al.* 1996). Ces résultats ont aussi été confirmés par la présence de l'expression de MMP13 au niveau de la membrane synoviale des patients atteints de rhumatisme et d'arthrose (Wernicke *et al.* 1996). Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de MMP13, le RS 102, 481 (Billinghurst *et al.* 1997), met en évidence une diminution de la libération des peptides issus de la dégradation du cartilage lors de l'arthrose (Billinghurst *et al.* 2000), ainsi la détection de l'expression de MMP13 suggère que cette enzyme joue un rôle dans la dégradation du collagène présent dans le cartilage et donc joue un rôle dans cette pathologie.

4.5.2 Dans le cancer

4.5.2.1 Cancer de la tête et du cou

Les carcinomes à cellules squameuses (SCC) de la tête et du cou sont des tumeurs malignes ayant une grande capacité à envahir et à métastaser. Une analyse effectuée par Johansson et ses collaborateurs a permis de mettre en évidence l'expression de MMP13 dans les SCC de la tête et du cou. Les ARNm de MMP13 sont ainsi détectés dans 22 lignées cellulaires de SCC sur 29, dont 14 sur 15 sont des lignées cellulaires primaires de SCC et dont 8 sur 14 sont des lignées cellulaires de SCC capables de former des tumeurs

et des métastases (N Johansson *et al.* 1997). De plus, MMP13 est aussi détectée dans les échantillons tumoraux de SCC en comparaison aux tissus de peau ou de muqueuses orales où l'expression de cette métalloprotéase n'est pas retrouvée (N Johansson *et al.* 1997; Cazorla *et al.* 1998). Enfin, la surexpression de MMP13 dans ces cancers est associée à une invasion localement avancée de la tumeur suggérant que cette métalloprotéase contribue à la progression et qu'elle peut être considérée comme un marqueur de mauvais pronostic (Cazorla *et al.* 1998; Etoh *et al.* 2000; Osako *et al.* 2016).

4.5.2.2 Cancer de la peau

Le mélanome est le cancer de la peau le moins fréquent mais le plus agressif, c'est la cause principale de décès par cancer de la peau, en effet le mélanome induit la formation de métastases. De toutes les collagénases, seule l'expression de MMP1 et MMP13 est corrélée avec la progression du mélanome et à la formation précoce de métastases. Une première étude de Airola et collaborateurs montre que MMP13 est exprimée dans les cellules de carcinome de l'épiderme et qu'elle est associée à la différenciation de ces cellules (Airola *et al.* 1997). D'autres études ont ensuite conforté ces résultats, et ont mis en évidence une expression de MMP13 dans les mélanomes malins présentant une grande capacité d'invasion locale (Airola *et al.* 1999; Varani *et al.* 2000; Serini *et al.* 2016).

4.5.2.3 Cancer du sein

MMP13 a été cloné pour la première fois à partir d'une banque d'ADN complémentaire dérivée d'une tumeur mammaire (Freije *et al.* 1994b), son expression a ensuite été observée dans différentes tumeurs malignes. L'analyse de l'expression de MMP13 montre une localisation au niveau de l'endothélium entourant la tumeur mammaire ce qui suggère un rôle important dans la modulation et la dégradation de l'ECM lors du développement du cancer du sein (Freije *et al.* 1994b; Uría *et al.* 1997). Depuis, d'autres études ont montrées l'implication de la MMP13 dans le cancer mammaire, que ce soit au niveau du statut d'expression, au niveau de son association à la progression tumorale ou au niveau du caractère métastatique (Rizki *et al.* 2008; Vargas *et al.* 2012). Ainsi, la surexpression de MMP13 est retrouvée dans les cellules cancéreuses très invasives comme les MDA-MB-231 en comparaison aux cellules cancéreuses mammaires moins invasives comme les T47D, les MCF-7 et les BT-20 (Balduyck *et al.* 2000; Lafleur *et al.* 2005). Cette corrélation est aussi confirmée par la

technique d'immunohistochimie effectuée à partir d'échantillons de tumeurs mammaires et met en évidence un lien entre une forte expression de MMP13 et la diminution de la survie (B. Zhang *et al.* 2008a). La surexpression de MMP13 dans une lignée cancéreuse prostatique montre une augmentation de la migration cellulaire, de l'angiogenèse et participe aussi au potentiel métastatique des cellules (H. Li *et al.* 2014; Folgueira *et al.* 2013; L. Wang *et al.* 2012a; Swamydas *et al.* 2013). À l'inverse, l'inhibition de celle-ci reverse ces effets (L. Wang *et al.* 2012b; Swamydas *et al.* 2013). Enfin, l'expression de la MMP13 a pu être corrélée à celle de l'oncogène HER2/Neu et à la présence des métastases dans les ganglions lymphatiques (B. Zhang *et al.* 2008a) et participe au développement des métastases osseuses grâce à la différenciation et l'activation des ostéoclastes (Pivetta *et al.* 2017). Ainsi une surexpression de cette métalloprotéase entraîne une baisse de l'espérance de vie moyenne. MMP13 est considérée comme un marqueur de mauvais pronostic (B. Zhang *et al.* 2008a) et comme un nouveau marqueur de diagnostic potentiel du cancer du sein (H.-J. Chang *et al.* 2009).

Partie III: Implication du facteur ETV1 dans le cancer de la prostate (CaP)

1 La glande prostatique

1.1 Organogenèse prostatique

L'organogenèse prostatique est un processus complexe qui est d'abord induit par la présence d'androgène puis poursuivit par des interactions entre le mésenchyme et l'épithélium. La formation de la prostate s'effectue par morphogenèse de branchement *via* la formation des bourgeons épithéliaux à environ 10 semaines de gestation chez l'homme (Kellokumpu-Lehtinen, Santti, and Pelliniemi 1980). Celle-ci s'effectue sous l'influence continue des androgènes lors de son développement puis après la naissance ainsi que lors de la puberté période à laquelle la prostate atteint sa taille mature.

1.2 Différents types cellulaires de la prostate

La prostate est une glande masculine de quelques centimètres, située au dessous du péritoine entre le diaphragme pelvien et la cavité péritonéale.

L'épithélium prostatique est composé de cellules ayant des morphologies distinctes (**Figure 14**), il est composé :

- De cellules luminales qui expriment les cytokéranines 8 et 18 sécrètent des protéines comme l'antigène spécifique de la prostate appelé PSA (A. Y. Liu *et al.* 1997; Y. Wang *et al.* 2001). Ces cellules expriment fortement les récepteurs aux androgènes (AR), qui sont exprimés à la surface de presque toutes ces cellules (El-Alfy *et al.* 1999; Abate-Shen and Shen 2000).
- De cellules basales situées qui forment une fine couche de cellules entre les cellules luminales et la membrane basale. Ces cellules expriment faiblement AR (El-Alfy *et al.* 1999).
- De cellules neuroendocrines qui sont aussi présentes en faible quantité au niveau basal. Elles expriment des protéines sécrétées comme des neuropeptides ou d'autres hormones (Abrahamsson 1999).

Sous l'épithélium prostatique se trouve le mésenchyme qui est lui aussi composé de différents types cellulaires :

- De cellules musculaires lisses qui longent l'épithélium et sont capables de se contracter afin de permettre la libération des fluides synthétisés par la prostate (Hayward *et al.* 1996).
- De fibroblastes matures qui sécrètent dans la matrice extra-cellulaire des glycoprotéines et des protéoglycanes.

D'autres éléments composent aussi le stroma comme les vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs ainsi que des cellules immunitaires.

L'ensemble de ces cellules composant l'épithélium et le stroma forment des glandes tubulo-alvéolaires qui composent la prostate.

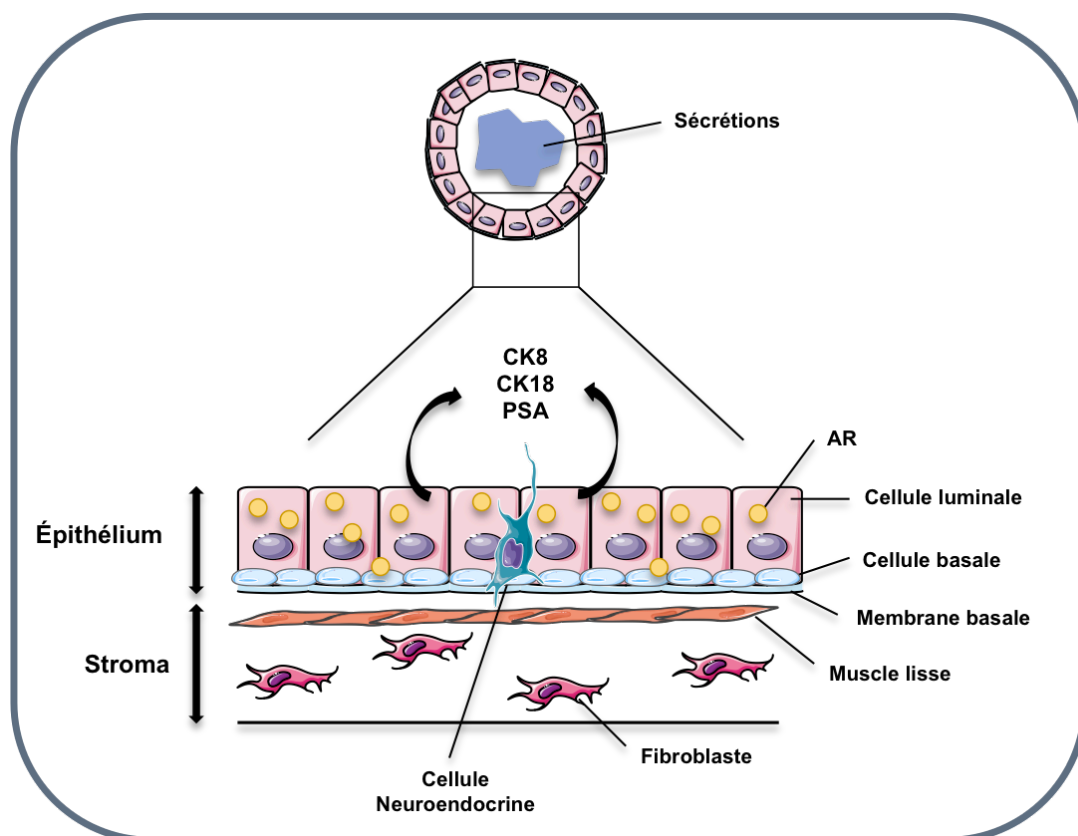


Figure 14: Composition cellulaire de la prostate.

La prostate est composée de deux compartiments, l'épithélium qui est en contact de la lumière de la glande et le stroma situé sous l'épithélium. Ces deux compartiments sont composés de différents types cellulaires.

1.3 Anatomie de la prostate

C'est en 1968 que le concept de subdivision de la prostate en différentes zones apparaît grâce aux travaux de l'urologue John E. McNeal mettant en évidence trois zones prostatiques : la zone centrale (CZ), la zone de transition (TZ) et la zone périphérique (PZ) (**Figure 15**)(McNeal 1968).

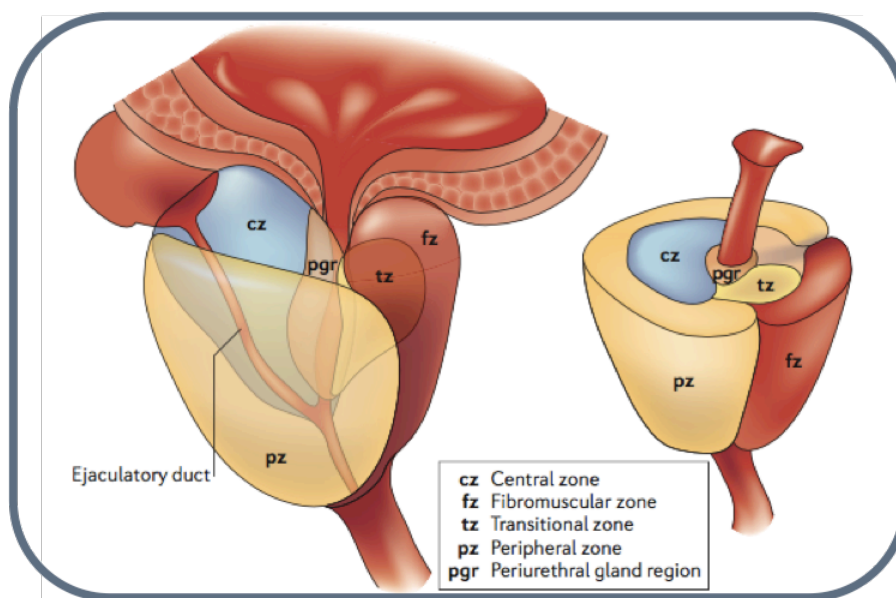


Figure 15: Schéma représentant les différentes zones de la prostate.

Représentation des différentes zones présentes dans la prostate, en orange (PZ) est représentée la zone périphérique, en jaune (TZ) la zone de transition et en bleu la zone centrale (CZ) (Adapté d'après: De Marzo *et al.*, 2007).

Ces zones ont différentes origines embryonnaires et sont identifiables grâce à leur histologie, leur anatomie ainsi que par leurs fonctions biologiques. La CZ est décrite comme étant un tissu glandulaire, constituant la plus grande partie à la base de la prostate et entourant les conduits éjaculateurs. La PZ constitue le reste de la glande et entoure la majeure partie de la CZ ainsi que la partie distale de l'urètre. Ces deux zones présentent des différences histologiques au niveau du stroma ainsi que de la structure glandulaire (Selman 2011; Aaron, Franco, and Hayward 2016). La TZ est la plus petite zone et représente moins de 5% de la prostate normale (Aaron, Franco, and Hayward 2016). Au niveau clinique, la prostate est aussi décrite comme possédant deux lobes latéraux, séparés par un sillon central, ainsi que d'un lobe moyen.

1.4 Rôles de la prostate

La prostate est une glande importante du système reproducteur masculin. Elle est composée de deux compartiments qui sont le stroma et l'épithélium qui ont différents rôles en fonction des voies de signalisation permettant ainsi le développement et une homéostasie normale de la prostate (Nieto, Rider, and Cramer 2014). La fonction principale du compartiment stromal de la glande prostatique est d'assurer un microenvironnement spécifique pour le compartiment épithélial. Les cellules épithéliales ont une fonction qui est principalement glandulaire, en effet les cellules vont sécréter un fluide qui compose un-cinquième à un-tiers du volume d'éjaculat (Verze, Cai, and Lorenzetti 2016). Le fluide prostatique participe donc avec la sécrétion de fluides produits par d'autres glandes accessoires masculines (vésicules séminales et glandes bulbo-urétrales) à la fertilité masculine. Le fluide produit par la prostate contient de nombreux facteurs contrôlant le processus d'éjaculation et régule des protéines permettant l'activation de la maturation du sperme. Ces facteurs sont importants pour la liquéfaction du sperme, le cycle de coagulation et la motilité des spermatozoïdes (Gilany *et al.*, 2015). Dans les protéines sécrétées par la prostate, on trouve les kallikréines (KLKs : kallikreines) qui sont une famille de 15 protéases sérines incluant le PSA (PSA : prostate specific antigen) ainsi que d'autres facteurs comme le citrate et le Zn^{2+} (Kalinska *et al.* 2016). En effet, la prostate accumule le Zn^{2+} dans les cellules épithéliales qui va dans un premier temps bloquer le cycle de Krebs conduisant ainsi à une accumulation de citrate, le citrate va alors agir comme un substrat énergétique pour le sperme en induisant l'augmentation de la production d'ATP (Medrano *et al.* 2006). Dans un second temps, le Zn^{2+} va inactiver temporairement les KLKs qui sont activées suite à l'éjaculation (Kalinska *et al.* 2016). L'accumulation du Zn^{2+} et du citrate, l'inhibition du cycle de Krebs et la libération du fluide prostatique sont régulées par les stéroïdes sexuels mâles qui agissent *via* les récepteurs aux androgènes (AR) (Verze, Cai, and Lorenzetti 2016).

La prostate va donc participer à la fertilité grâce à la sécrétion de nombreux facteurs participant entre autre à la motilité des spermatozoïdes.

2 Généralités sur le cancer de la prostate

2.1 Épidémiologie du cancer de la prostate

La prostate peut être le site de formation de deux pathologies : l'hyperplasie prostatique bénigne (BPH) et le cancer de la prostate (CaP).

Le CaP est un adénocarcinome qui se développe lentement et est localisé au début de la maladie, l'âge médian de son diagnostic est de 66 ans il est donc retrouvé chez les populations âgées. Cependant l'âge médian de mortalité survient plus tardivement vers 80 ans, cette mortalité est causée par la formation de métastases.

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme, c'est aussi la deuxième cause de mortalité par cancer dans les pays les plus développés (Amérique du Nord, Europe du Nord et de l'Ouest) (Siegel, Naishadham, and Jemal 2013). En effet, 181 000 nouveaux cas et 26 000 décès ont été comptabilisés aux Etats Unis en 2016 ('American Cancer Society; 2016'; Siegel, Naishadham and Jemal, 2013). Cependant, comme le montre le tableau établi par l'Association Française d'Urologie, une augmentation de l'incidence du CaP est observée ces dernières décennies, cependant le taux de mortalité lui varie très peu (**Tableau 3**). Cette augmentation du nombre de cas de CaP s'explique par une détection plus précoce de la maladie, de ce fait cette prévention de détection induit un meilleur suivi des patients et donc un nombre constant voir une diminution de la mortalité proportionnellement à l'incidence.

Tableau 3: Évolution de l'incidence et des décès par CaP en France de 1980 à 2000
(Données extraites du site de l'Association Française d'Urologie)

	1980	1985	Année 1990	1995	2000
Incidence (Nombre de cas)	10856	14132	19499	27513	40309
Mortalité (Nombre de cas)	6979	7852	8790	9575	10004

De plus, des disparités d'incidence sont observées en fonction de l'origine des populations. En effet, on observe une augmentation du développement d'un carcinome prostatique dans les populations afro-américaines avec une incidence qui passe de 120 à

200 cas pour 100 000 hommes, en comparaison à la population américaine blanche (Barry and Simmons 2017). En parallèle, une augmentation de la mortalité est aussi retrouvée entre ces deux populations avec une incidence qui passe de 44 décès pour 100 000 homme afro-américains à 19 décès pour 100 000 hommes blancs (Barry and Simmons 2017). Au contraire on observe une diminution du développement ainsi que de la mortalité causée par le CaP dans les populations asiatiques avec une incidence passant de 19 à 9 décès pour 100 000 cas, en comparaison à la population blanche (Barry and Simmons 2017). Ces données laissent à penser que le style de vie ainsi que l'alimentation pourraient avoir une influence sur le risque de développer un CaP. Cependant une étude portant sur la relation possible entre le risque de développer un CaP en fonction de la nourriture, l'importance et l'activité physique n'a pas permis d'établir de lien réel (Markozannes *et al.* 2016). D'autres hypothèses peuvent expliquer ces différences comme les antécédents familiaux, en effet on observe une augmentation du risque de développer un CaP si celui-ci s'est développé chez un proche de premier degré (Watkins Bruner *et al.* 2003).

2.2 Dépistage du CaP

Le cancer de la prostate ayant un développement lent et étant asymptomatique au début de la maladie, un dépistage peut être effectué chez les hommes le souhaitant à partir de 50 ans ou à partir de 45 ans chez ceux ayant des antécédents familiaux de cancers hormonaux dépendants.

Deux examens sont retrouvés en première ligne:

- Le toucher rectal, permettant au médecin de déceler des éventuels changements de taille, de consistance ou de forme de la prostate. Cet examen est recommandé avant le dosage du PSA total (Gosselaar *et al.* 2008).
- Le taux de PSA total dosé dans le sang peut indiquer en cas d'augmentation le risque de développer un CaP. Cependant, le dosage systématique du PSA est controversé car il peut entraîner un surdiagnostic et donc un surtraitement de la maladie. Le dosage du PSA peut cependant servir d'indicateur pour la deuxième ligne de dépistage qui est la biopsie ainsi que pendant le suivi de l'évolution de la maladie après traitement.

D'autres biomarqueurs pouvant être dosés dans le sang ou les urines peuvent être utilisés afin de diagnostiquer le CaP.

- 1 Le PHI (PHI : Prostate Health Index) peut être dosé dans le sang ; il existe une corrélation entre son expression, le taux de PSA et le stade de développement du cancer de la prostate. Le PHI a reçu les approbations de l'EMA (agence européenne des médicaments) et de la FDA en 2012 (Food and Drug Administration) et peut donc être utilisé comme biomarqueur dans le cadre du dépistage du CaP (Loeb and Catalona 2014; Ferrer-Batallé *et al.* 2017).
- 2 Le 4Kscore, qui correspond au dosage de quatre KLKs dans le sang sont aussi des biomarqueurs potentiels en attente d'accréditation CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amenment). Un algorithme établi à partir du dosage de quatre KLKs comprenant le PSA total, le PSA libre, le PSA intact et le KLK2 (kallikrein related peptidase 2) permet d'obtenir des informations sur le stade et l'agressivité de la maladie (Punnen, Pavan, and Parekh 2015).
- 3 Le PCA3 (Prostate Cancer Antigen 3) est fortement exprimé chez les patients ayant un CaP. Cette longue chaîne d'ARN non codante est un biomarqueur pouvant être dosé dans les urines des patients et sa concentration est indépendante de la taille de la prostate ainsi que du niveau de PSA total dans le sang (Wei *et al.* 2014). L'utilisation du PCA3 en tant que biomarqueur est approuvée par la FDA depuis 2012.

Ainsi, l'utilisation des différents biomarqueurs peut aider à distinguer les formes agressives ou non de CaP et permettent également d'affiner le diagnostic clinique.

Une biopsie peut ensuite être nécessaire afin d'établir le diagnostic dans le cas où le patient présente une anomalie de la prostate lors du toucher rectal ou alors un taux de PSA élevé.

2.3 Classification du CaP

Une fois le cancer détecté, celui-ci doit être classé en fonction du stade de la maladie dans le but de mettre en place la thérapie la plus adaptée. Cette classification est effectuée par un anatomopathologiste qui utilise différentes classifications possibles.

2.3.1 Le score de Gleason

Le premier système de classification des grades de cancer de la prostate basé sur l'aspect histopathologique fût développé en 1966 par le Dr. Donald Gleason (Gleason 1966). Cette classification se divise en cinq grades en fonction de la différenciation des cellules ; moins elles sont différenciées, plus le grade est élevé et plus le cancer est agressif (**Figure 16**). Lors de l'étude histopathologique, différents grades peuvent être identifiés, les deux grades les plus représentés sont alors additionnés pour donner le score de Gleason. Le score peut ainsi varier de 2 à 10, il est noté de 1-1 jusqu'à 5-5 (**Tableau 4**).

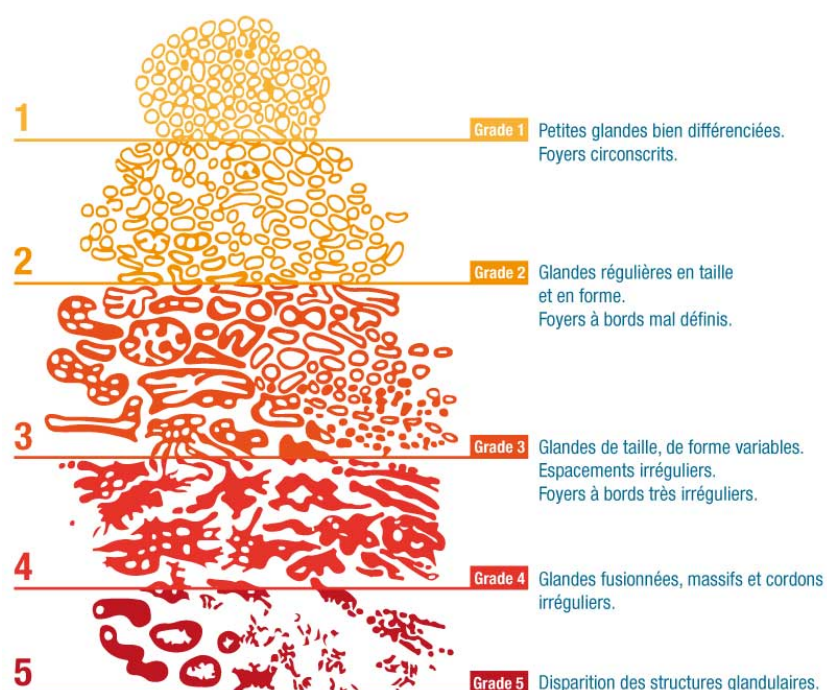


Figure 16: Représentation des différents grade de Gleason.
(Figure extraite de: <http://prostanet.com>)

Depuis son apparition, ce score de Gleason a été mis à jour à deux reprises tout d'abord en 2005 (Epstein *et al.* 2005) puis en 2014 (Epstein *et al.* 2015) lors de deux conférences de la société internationale des pathologies urologiques (ISUP : international society of urological pathology).

Lors de la première conférence en 2005, les modifications apportées sont les suivantes :

- La suppression du score de 2 (1-1) et la limitation quant à l'utilisation des scores 3 et 4.
- Le grade 4 a été redéfini, il comprend maintenant en plus des glandes fusionnées et massives, les petites glandes mal formées et dont la lumière est difficilement visible.

La deuxième conférence de 2014 a permis de rectifier d'autres défauts persistants dans cette classification. Ainsi différents groupes pronostiques ont été définis (**Tableau 4**).

Tableau 4: Nouvelle classification de Gleason

Nouveaux Grades	Score de Gleason	Caractéristiques
Groupe 1	Score de Gleason ≤ 6 (3+3)	Glandes individuelles et bien formées
Groupe 2	Score de Gleason 7 (3 majoritaire)	Dominance de glandes bien formées mais présence de glandes mal formées/ fusionnées/ cribiformes
Groupe 3	Score de Gleason 7 (4 majoritaire)	Dominance de glandes mal formées/ fusionnées/ cribiformes, avec peu de glandes bien formées
Groupe 4	Score de Gleason 8 (4+ 4, 3+ 5, ou 5+ 3)	Présence uniquement de glandes mal formées Ou prédominance de glandes bien formées avec perte de formation glandulaire Ou prédominance de mauvaise formation glandulaire avec quelques glandes bien formées
Groupe 5	Score de Gleason 9 ou 10	Perte de formation glandulaire avec la présence ou non de glandes mal formées/ fusionnées/ cribiformes

Cette nouvelle classification en 5 groupes permet ainsi de différencier les scores de Gleason 3 et 4 qui sont majoritaires et auparavant considérés comme identiques, mais aussi de différencier les scores de Gleason allant de 8 à 10 qui étaient auparavant tous caractérisés de « haut grade » même s'ils présentent un pronostic différent. Depuis, cette classification a été validée par différentes études et l'utilisation de celle-ci est recommandée (Epstein *et al.* 2016).

2.3.2 La classification TNM

La deuxième classification est appelée TNM, elle est couramment utilisée pour déterminer le stade tumoral du cancer de la prostate. Cette classification peut être utilisée au départ lors du diagnostic, puis pendant le traitement et enfin en cas de récurrence. Cette classification s'intéresse à la tumeur primitive : T, aux ganglions régionaux : N et à la présence ou non de métastases : M (**Tableau 5**).

Tableau 5: Classification TNM pour le cancer de la prostate.

T: Tumeur	T0	Tumeur primitive absente ou non retrouvée
	T1	Tumeur non palpable au toucher rectal, ni visible en imagerie
	T1a	Tumeur occupant moins de 5% du tissu réséqué, score Gleason <7, absence de grade 4/5
	T1b	Tumeur occupant plus de 5% du tissu réséqué, score Gleason ≥7 ou présence de grade 4/5
	T1c	Tumeur observable sur biopsie prostatique après augmentation de la valeur du PSA
	T2	Tumeur limitée à la prostate
	T2a	Tumeur atteint la moitié d'un lobe ou moins
	T2b	Tumeur atteint plus de la moitié d'un lobe
	T2c	Tumeur atteint les deux lobes
	T3	Tumeur s'étend au-delà de la prostate
T3a	Extension extra-prostatique uni- ou bilatérale	
T3b	Tumeur atteint les vésicules séminales uni- ou bilatérale	
T4	Tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales (ex: rectum)	
N: Ganglions Régionaux	Nx	Ganglions régionaux non évalués
	N0	Absence de métastases ganglionnaire dans la région prostatique
	N1	Atteinte des ganglions dans la région prostatique
	N1 mi	Présence de métastases ganglionnaires
M: Métastases	M0	Absence de métastases à distance
	M1	Métastases à distance
	M1a	Atteinte des ganglions non régionaux
	M1b	Atteinte osseuse
	M1c	Autres sites avec ou sans atteinte osseuse

Les tumeurs seront ensuite classées en 4 stades qui vont du cancer le moins avancé au plus avancé:

- Stade 1, cancer localisé : T1 ou T2a, N0, M0
- Stade 2, tumeur plus avancée : T2b/c, N0, M0
- Stade 3, tumeur étendue en dehors de la prostate : T3 ou T4, N0, M0
- Stade 4, cancer métastatique comprenant tous les T, tout les N et M1

2.3.3 La classification d'Amico

On trouve également une troisième classification appelée classification d'Amico , elle fait suite aux précédentes et va permettre une distinction des différentes tumeurs prostatiques en fonction de 3 critères qui sont : le dosage du PSA, le score de Gleason et la classification TNM, dans le but de définir le risque de progression biologique de la maladie ainsi que la mortalité après traitement (D'Amico *et al.* 1998, 2003).

Trois groupes sont ainsi définis :

- Les cancers à faible risque:
 - TNM: \leq T2a (et)
 - PSA (ng/ml) : \leq 10 (et)
 - Score de Gleason : \leq 6
- Les cancers à risque intermédiaire :
 - TNM: T2b (ou)
 - PSA (ng/ml) : 10- 20 (ou)
 - Score de Gleason : 7
- Les cancers à risque élevé :
 - TNM: \geq T2c (ou)
 - PSA (ng/ml): $>$ 20 (ou)
 - Score de Gleason: \geq 8

2.4 Thérapies utilisées dans la lutte contre le CaP

Une fois la tumeur détectée et classifiée, le but sera de la traiter avec la stratégie la mieux adaptée. Pour cela, le comité de cancérologie de l'Association française d'urologie établi des recommandations spécifiques pour la prise en charge du CaP. Il existe de nombreuses thérapies, plus ou moins invasives et avec plus ou moins d'effets

indésirables. Ces différentes thérapies peuvent être utilisées seules ou combinées (**Tableau 6**).

Tableau 6: Différentes options de traitement en fonction du stade tumoral

Stade de la maladie/ Etat du patient		Possibilités de traitement
Maladie localisée	Faible risque	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement immédiat: prostatectomie total (patient ayant surie >10 ans), radiothérapie, curiethérapie • Surveillance active de type « Watchfull Waiting » • Surveillance active pour patient avec probabilité survie > 10 ans • Cryothérapie et HIFU pour les patients ne pouvant relever d'une chirurgie ou radiothérapie <ul style="list-style-type: none"> • Traitement focal (lors d'essais clinique) • Traitement hormonal non recommandé
	Risque intermédiaire	<ul style="list-style-type: none"> • Surveillance simple de type « Watchfull Waiting » pour les patients avec une probabilité de survie courte • Prostatectomie totale avec ou sans curage (patient avec probabilité survie > 10ans) • Radiothérapie 74 à 78 Gy seule ou couplé à une privation androgénique courte (4- 6 mois) <ul style="list-style-type: none"> • Curiethérapie • Cryothérapie et HIFU pour les patients ne pouvant relever d'une chirurgie ou radiothérapie <ul style="list-style-type: none"> • Traitement focal (lors d'essais clinique) • Traitement hormonal non recommandé
	Haut risque	<ul style="list-style-type: none"> • Hormono- radiothérapie • Hormonothérapie longue (2 ou 3 ans) • La prostatectomie pour CaP de haut risque ou localement avancé, à envisager dans le cadre d'une approche multimodale
Maladie métastatique	Hormono-naïf	<ul style="list-style-type: none"> • Différentes homonothérapies sont proposées: immédiate, retardée, continue, intermittente • Hormono- chimiothérapie en cas de forte masse tumorale • Traitement local non recommandé en dehors d'un protocole de recherche clinique • Médicaments ciblant l'os non recommandé
	Résistante à la castration	<p>Approche multidisciplinaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - En 1^{re} ligne: <ul style="list-style-type: none"> • Possibilité de souscrire un anti-androgène de 1^{re} génération • Si blocage androgénique complet avec anti-androgène de 1^{re} génération → l'arrêter • Si patient peu ou pas symptomatiques et sans métastases viscérale → hormonothérapie de 2^e génération • Si tumeur indifférenciée, neuroendocrine, présence de métastases viscérales ou osseuses, d'un échappement rapide après hormonothérapie → chimiothérapie <ul style="list-style-type: none"> - En 2^{ème} ligne: <ul style="list-style-type: none"> • Tenir compte de la première ligne est des résistances croisées entre abiraterone et enzalutamide • Chimiothérapie si la première ligne de traitement était une hormonothérapie • En cas de métastases osseuse: radium -233 est une option avant ou après le docétaxel • Si progression avec docétaxel, utiliser en deuxième ligne de cabazitaxel, l'acétate d'abiraterone ou l'enzalutamide
Maladie chez sujet âgé	Bon état général	Traitement standard
	Vulnérable	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement standard si la vulnérabilité est réversible • Traitement adapte si la vulnérabilité n'est pas réversible
	Fragile	Traitement adapté
	État général médiocre	Traitement palliatif

2.4.1 Traitement différé, surveillance active ou abstention de surveillance clinique

- ✓ Le CaP a un développement lent, le traitement de la maladie n'est donc pas nécessairement utile lors de sa détection si celui-ci est asymptomatique et qu'il présente un faible risque d'évolution. En effet, les traitements étant souvent invasifs et ayant des effets secondaires il est préférable chez les sujets âgés de ne pas traiter la tumeur.
- ✓ Dans le cas de la surveillance active, cela consiste à décaler le début du traitement tout en contrôlant l'évolution de la maladie afin qu'elle reste dans une fenêtre curable. Des études cliniques ont validé cette approche dans les cas de cancer localisés à faible risque.
- ✓ Enfin l'abstention de surveillance clinique encore appelé « Watchful Waiting » concerne les hommes dont la pathologie est incurable. Dans ce cas un traitement à visée palliatif est instauré en cas de symptôme.

2.4.2 La chirurgie

La prostatectomie totale (PT) est indiquée chez les patients ayant une espérance de vie supérieure à 10 ans et présentant un cancer localisé de risque faible ou intermédiaire. Cependant, elle peut aussi être indiquée dans le cas d'un traitement multimodal pour les tumeurs de haut risque selon la classification d'Amico. De plus, lors de l'intervention chirurgicale de PT chez les patients des groupes intermédiaire et élevé peut être effectué le curage ganglionnaire qui consiste à l'exérèse des ganglions ilio-obturateur, iliaques internes et externes bilatéraux allant jusqu'à la bifurcation iliaque. Cette technique permet d'améliorer la classification de la tumeur grâce à l'identification des ganglions positifs (Heidenreich, Ohlmann, and Polyakov 2007).

L'incontinence urinaire ainsi qu'un dysfonctionnement érectile sont les deux complications majeures de la PT. Afin d'améliorer la qualité de vie des patients, les bandelettes neurovasculaires accolées à la prostate peuvent être préservées dans le cas de cancer de risque faible ou intermédiaire, cela permet ainsi une récupération de leur fonction érectile (Gontero and Kirby 2005).

2.4.3 La curiethérapie

La curiethérapie est une technique qui consiste à irradier directement la prostate grâce à l'implantation permanente de grains d'iode 125. C'est une technique peu invasive utilisée pour le traitement des cancers de faible risque ou risque intermédiaire en suivant la classification d'Amico.

2.4.4 La radiothérapie (TR)

Cette technique est à visée curative et contrairement à la curiethérapie, la radiation s'effectue de l'extérieur. La zone irradiée comprend l'ensemble de la prostate et parfois les vésicules séminales pour les groupes à risque intermédiaire et haut. La radiothérapie (RT) est une technique conformationnelle, tridimensionnelle avec si possible une intensité modulable. La modulation d'intensité montre une toxicité réduite à dose équivalente par rapport à la RT conventionnelle et permet donc d'augmenter l'intensité des doses au niveau de la tumeur. La RT peut être guidée par imagerie dans le cas de doses supérieures à 74 Gy. Ainsi, ce traitement peut s'effectuer en escalade de dose ou par hypofractionnement qui permet de délivrer des doses par fraction plus élevées que 2Gy et ainsi diminuer la quantité de séances.

2.4.5 La chimiothérapie

La chimiothérapie (CT) est envisagée dans le cas de cancer métastatique hormono-naïf ou résistant à la castration. Il existe de nombreuses chimiothérapies et elles peuvent être administrées par différentes voies, intraveineuse, orale ou encore intra musculaire. On retrouve dans un premier temps les chimiothérapies néoadjuvantes qui sont prescrites avant tout autre traitement (radiothérapie, chirurgie). Le but de cette approche est d'induire une diminution de la masse tumorale afin d'améliorer la résection de la tumeur, ainsi qu'une prolongation de l'espérance de vie. Le traitement par des néoadjuvants va aussi permettre de connaître les mécanismes moléculaires de la tumeur et d'observer sa réponse au traitement (Cha and Eastham 2015). Dans le cas d'une CT à la suite d'un autre traitement on parle d'une CT adjuvante.

De nombreux agents chimiothérapeutiques administrés seuls ou en association, c'est le cas du Docetaxel (Taxotère®) qui est souvent utilisé en première ligne dans le cas d'une CT. On retrouve ensuite d'autres agents comme le cabazitaxel (Jevtana®) la mitoxantone (Novantrone®) ou encore le cisplatine (Cisplatyl®) (Mongiart-Artus *et al.* 2013). Ces différentes molécules ont différents modes d'actions sur les cellules

cancéreuses, par exemple le Docetaxel va se lier à la tubuline et induire la dépolymérisation du fuseau mitotique induisant ainsi un arrêt de la mitose. Quant au cisplatine il se lie aux nucléotides de l'ADN afin d'inhiber sa réplication (Mongiat-Artus *et al.* 2013).

2.4.6 L'hormonothérapie (HT)

Au sein de la prostate les androgènes jouent un rôle important aussi bien pour le développement que pour le fonctionnement de la glande prostatique. Il est connu que les androgènes stimulent la croissance et la survie des cellules épithéliales prostatiques saines mais aussi des cellules cancéreuses. Différents moyens sont envisageables afin de faire diminuer le taux de testostérone circulante. Ces approches sont mises en place chez les patients ayant un cancer localisé de haut risque ou localement avancé ainsi que pour les patients atteints de métastases. La première approche est l'orchidectomie, elle consiste en l'ablation des testicules qui produisent la testostérone grâce aux cellules de Leydig (Oefelein *et al.* 2000). Cependant, cette technique étant irréversible, il existe d'autres alternatives grâce à l'inhibition de la testostérone circulante. Différentes cibles sont possibles :

- Le blocage complet des androgènes: cette HT associe un agoniste de la *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone* (LHRH) à un anti-androgène. Cependant cette approche montre des résultats assez discordants (Kunath *et al.* 2014).
- Antagoniste et agoniste de la LHRH: vont induire une diminution du taux de cette hormone dans la circulation. Cependant l'administration d'un agoniste de la LHRH induit un pic de testostérone appelé effet « flare-up » qui n'est pas retrouvé avec l'administration d'un antagoniste. Aucune différence d'efficacité n'est décrite entre ces deux approches.

2.4.7 Dans le cas des cancers de la prostate résistants à la castration (CRPC)

L'efficacité des différentes approches thérapeutiques visant à supprimer les androgènes est définie par leur capacité à atteindre un taux de testostérone totale inférieure à 50ng/ dl. Lorsque le cancer continue sa progression malgré le maintien d'un taux hormonal faible, on parle de cancer résistant à la castration ou encore cancer

androgéno-indépendant. Cette progression de la maladie est observée 2 à 3 ans après le début du traitement et induit la mort des patients après 16 à 18 mois (Pienta and Bradley 2006).

Différents traitements sont envisagés dans ce cas et vont dépendre de la thérapie employée en première ligne : nouvelle hormonothérapie ou alors arrêt de celle-ci et chimiothérapie sont les approches mises en place dans ce cas.

3 Implication des androgènes dans le CaP

3.1 Biosynthèse des androgènes

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes comprenant la dihydroxytestostérone (DHT) qui joue un rôle important dans le développement, la croissance et le fonctionnement de la prostate et de la testostérone.

La synthèse des androgènes dans les conditions physiologiques s'effectue selon les axes hypothalamo- hypophyso- testiculaires avec la contribution de la glande surrénale. Environ 90 à 95% de la testostérone est synthétisée par les testicules au niveau des cellules de Leydig. Cette production est stimulée par les hormones lutéinisantes (LH) produites par le lobe antérieur de l'hypophyse, alors que 5 à 10% est produit par la glande surrénale à partir de la déhydroépiandrostérone (DHEA) qui est un précurseur synthétisé après la stimulation par l'hormone corticotrope ACTH (Labrie 2004)(Figure 16). La testostérone est une hormone dont le précurseur est le cholestérol. Une fois formée, la testostérone inactive est relâchée dans la circulation sanguine (Wilson 1978). Cette hormone circulante entre ensuite dans les cellules prostatiques où elle est activée grâce à une enzyme : la 5α - réductase, permettant ainsi la biosynthèse de la DHT (Wilson 1978) (**Figure 17**).

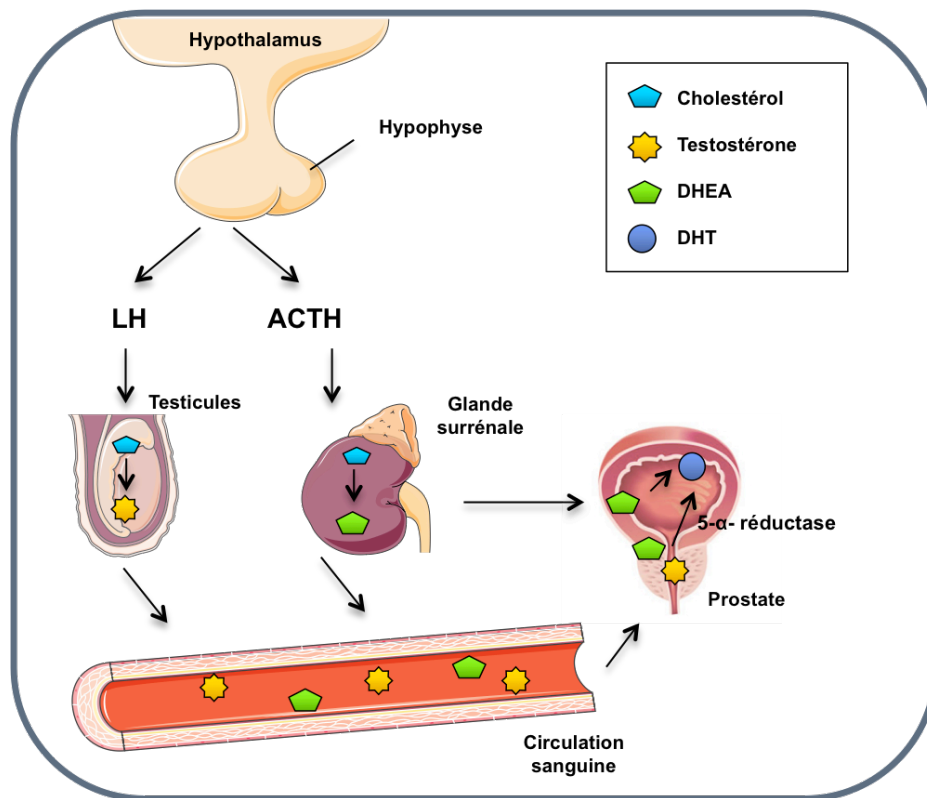


Figure 17: Différentes voies de synthèse des androgènes.

3.2 Activation du récepteur aux androgènes

La protéine AR est un membre de la famille des récepteurs nucléaires fixant les hormones stéroïdiennes. Au niveau structurel, les AR peuvent être divisés en quatre domaines, ① le domaine N terminal impliqué dans la régulation de la transcription, ② un domaine de fixation à l'ADN, ③ une région charnière et ④ un domaine C terminal de liaison du ligand (O'Malley 1990). L'action des androgènes dans la glande prostatique normale ou cancéreuse est médiée par leur fixation sur AR. En absence de ligand, AR forme un complexe avec des protéines chaperones et co-chaperones appelé « foldosome ». Ce complexe AR- foldosome est localisé dans le cytosol de la cellule en absence de ligand et est composé, lorsqu'il est mature, des protéines HSP90, HSP70, p23 ainsi que de FKBP51/52. AR fixé au foldosome mature va ainsi pouvoir fixer les androgènes circulants (Fang *et al.* 1996; Pratt *et al.* 2004). La fixation des androgènes induit une série de changements de conformation et de structure induisant la dissociation d'une partie du foldosome. La séquence de localisation nucléaire située dans la région charnière de AR est ainsi démasquée ce qui permet la relocalisation d'AR dans le noyau *via* les microtubules (Black and Paschal 2004; Cutress *et al.* 2008). AR va

subir différentes interactions avec des coactivateurs ainsi que son homodimérisation induisant sa fixation aux éléments de réponse aux androgènes (ARE : *androgen response element*) situés sur les régions promotrices des gènes cibles d'AR. En plus des coactivateurs, AR peut subir des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation et la méthylation modifiant ainsi la régulation des gènes cibles. (Figure 18).

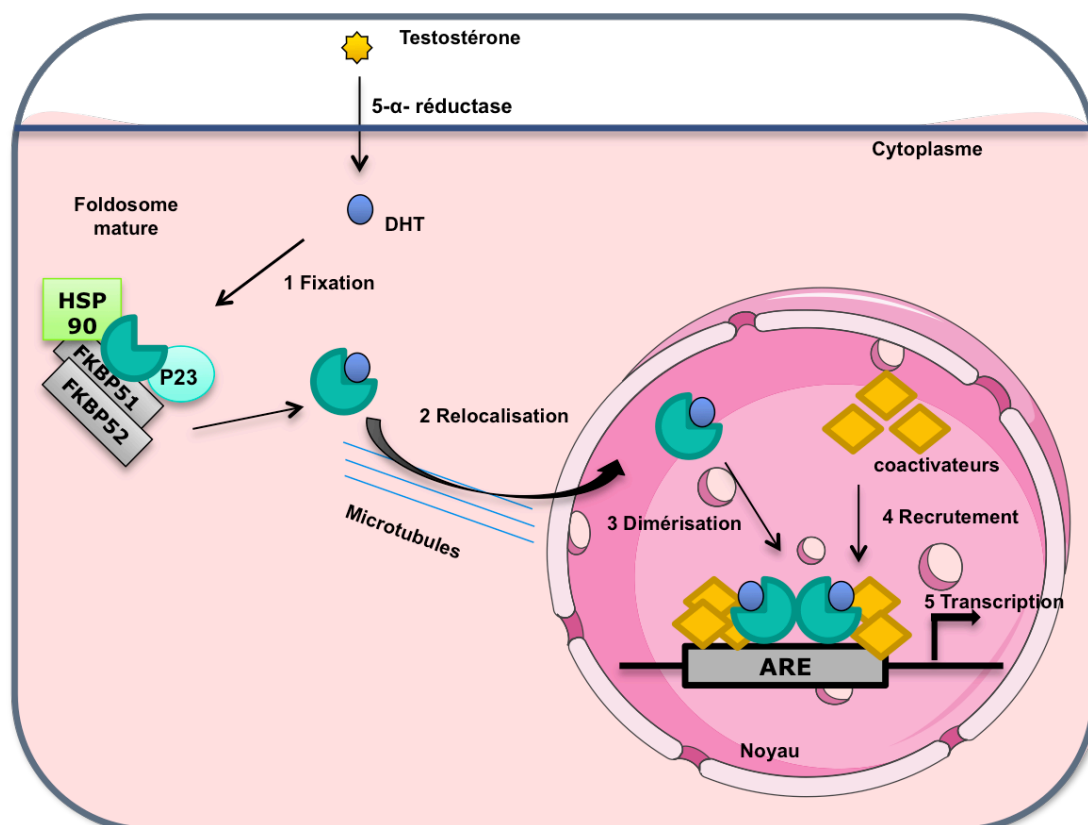


Figure 18: Représentation schématique de l'organisation spatio-temporelle de AR.

3.3 Implication d'AR dans le cancer de le CRPC

La privation d'androgène est une thérapie standard dans le cas de CaP local ou avancé mais la progression vers la résistance à la castration est possible après 2 ou 3 ans de traitement. De nombreux mécanismes de résistance peuvent contribuer à la progression vers le CRPC, ces différents mécanismes sont développés ci-dessous.

3.3.1 Amplification et hypersensibilité d'AR

Un faible niveau d'androgène persiste malgré leur blocage lors de l'hormonothérapie. Dans ce microenvironnement, certaines cellules développent une sensibilité au faible taux d'androgènes grâce à une amplification des AR (Visakorpi *et al.*

1995). De plus, environ 80% des patients présentent une augmentation du nombre de copies et 30% présentent une forte amplification d'AR. Il a aussi été montré que l'amplification d'AR est détectée dans seulement 2 cas sur 205 CaP non traités, ce qui suggère que l'amplification est induite durant l'acquisition de la résistance à la castration (Visakorpi *et al.* 1995; Koivisto *et al.* 1997; Kaltz-Wittmer *et al.* 2000).

3.3.2 Mutation d'AR

Les mutations d'AR sont très rares dans les stades précoces de CaP non traités mais sont communes dans les CRPCs qui sont présentes dans 10 à 30% des cas. Les différentes mutations touchant le gène AR induisent une augmentation de son activité en présence d'un faible taux d'androgène. La majorité des mutations d'AR sont au niveau du domaine de liaison au ligand, cependant des mutations touchant les domaines de fixation à l'ADN et le domaine N terminal sont aussi retrouvées (Gottlieb *et al.* 2004, 2012).

3.3.3 Co-activateurs et co-répresseurs d'AR

Plus de 150 molécules différentes ont déjà été identifiées comme étant des co-activateurs ou co-répresseurs d'AR (Heemers and Tindall 2007). Une série de complexes co-régulateurs peuvent être recrutés au niveau d'AR dans les conditions physiologiques, ils peuvent agir comme activateurs (co-activateurs) ou répresseurs (co-répresseurs) de l'activité transcriptionnelle. Un grand nombre de ces co-régulateurs sont des enzymes modulant d'autres protéines *via* la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation ou l'ubiquitylation, et ont aussi été identifiées comme des molécules chaperones, régulant l'épissage des ARN et participant à la machinerie transcriptionnelle (Wolf *et al.* 2008; Hermanson, Glass, and Rosenfeld 2002; Agoulnik and Weigel 2008). De nombreuses études montrent une augmentation des co-activateurs comme les SRC pour « steroid receptor coactivators » avec la progression du CaP et une diminution des co-répresseurs dans les CRPC (Xu, Wu, and O'Malley 2009).

3.3.4 Activation aberrante d'AR

Un autre mécanisme participant à la résistance à la castration est l'activation constitutive d'AR indépendante du ligand. De nombreuses études *in vivo* montrent que différentes cytokines, facteurs de transcription ou encore des kinases impliquées dans des voies de signalisation, sont capables d'augmenter la signalisation d'AR et participe ainsi à la mise en place du CRPC (Q. Wang *et al.* 2009). Par exemple, l'augmentation de

l'expression de NF- κ B/p52 dans une lignée cellulaire cancéreuse prostatique induit sa résistance à l'hormonothérapie comme l'enzalutamide dont la réponse est médiée par une activation aberrante d'AR. La résistance à l'hormonothérapie peut donc être induite par l'activation de AR par NF- κ B/p52 par exemple (Nadiminty *et al.* 2013).

3.3.5 Variants d'AR

Ces dernières années, différents variants d'épissage d'AR (AR-V : Androgen Receptor-Variant) ont été identifiés et possèdent différentes structures et fonctions. Ces variants sont constitutivement actifs grâce à la perte de la région C-terminale comportant la région de fixation au ligand (Hu *et al.* 2009; Dehm and Tindall 2011; Guo *et al.* 2009; Sun *et al.* 2010). De plus, cette altération d'épissage d'AR est identifiée comme étant un mécanisme permettant la progression du CaP et du CRPC (Dehm and Tindall 2011). L'activation indépendante de ces variants d'AR permet ainsi le ciblage et la transcription des gènes cibles d'AR. Parmi ces nombreux variants, le plus étudié est le ARV7 qui est caractérisé par la perte du domaine de liaison au ligand. Il est localisé dans le noyau et est constitutivement actif (Guo *et al.* 2009). ARV7 va ainsi réguler les gènes cibles qui sont AR-dépendants, mais aussi d'autres gènes AR-indépendants (Hu *et al.* 2009). Ces données suggèrent donc un rôle semblable et distinct des ARV en comparaison à la forme pleine longueur d'AR dans le cancer de la prostate (Dehm and Tindall 2011).

3.3.6 Stéroïdogénèse alternative

Le CRPC se développe grâce à la présence d'androgènes circulants suite à la castration. En effet, le niveau d'androgènes dans les tumeurs CRPC est identique voire plus élevé que chez les hommes eugonadiques, ce qui suggère une production alternative d'androgènes (Montgomery *et al.* 2008; Kumagai *et al.* 2013). Ce phénomène peut s'expliquer par une production d'hormone par la glande surrénale produisant la DHEA. En effet, la DHEA circulante n'est pas ciblée lors de l'hormonothérapie. Cette DHEA est donc transformée en une DHT très active *via* une voie alternative. Cette voie alternative permet la transformation de la DHEA en DHT sans passer par la testostérone grâce à une hormone, la 5 α -dione (K.-H. Chang *et al.* 2011). Cette nouvelle voie de synthèse qui outrepassa la testostérone est prédominante dans le CRPC (K.-H. Chang *et al.* 2011).

4 Altérations génétiques dans le CaP

Le cancer résistant à la castration est une cause de mortalité du CaP. La connaissance de cet événement a permis de progresser dans les traitements de ce cancer grâce à de nouvelles thérapies ciblant les androgènes. Plus récemment ont été découvertes des altérations génétiques dans le cancer de la prostate, et leur compréhension est un autre paramètre important pour améliorer les connaissances biologiques de ce cancer (Grasso *et al.* 2012; Barbieri *et al.* 2012; Berger *et al.* 2011; Robinson *et al.* 2015). En effet, le CaP montre une hétérogénéité qui est reflétée dans la diversité génomique et qui a été mise en évidence grâce à des séquençages et *via* l'étude de microarray. Différentes aberrations autres que les AR dont certaines sont développées ci-dessous, ont ainsi été mises en évidence. Ces mutations vont ainsi participer à l'activité des cellules cancéreuses en augmentant leur prolifération.

4.1 TP53 (Tumor protein p53)

Le gène *TP53* est localisé sur le chromosome 17 et code une protéine de 393 acides aminés. P53 est une protéine suppresseur de tumeur importante pour la stabilité du génome nucléaire et limitant la formation de cancers. Cette protéine est impliquée dans l'activation de facteurs de transcription en présence de différents types de stress cellulaires comme les dommages à l'ADN et l'hypoxie. De plus, p53 exerce une fonction antiproliférative (Petitjean *et al.* 2007). Dans le CaP, une expression anormale de p53 est corrélée avec une augmentation du risque d'apparition de la maladie, ainsi que le développement des métastases (Robles and Harris 2010). Un pourcentage plus important d'altération de p53 est retrouvé dans les échantillons CRPC en comparaison aux échantillons de tumeurs prostatiques primaires (Robinson *et al.* 2015).

4.2 PTEN (Phosphate and Tensin Homolog)

PTEN est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 10 et codant pour une protéine de 403 acides aminés. Cette protéine est localisée dans le cytoplasme et le noyau des cellules. PTEN est impliqué dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire au niveau du point de contrôle G2/S, il prévient ainsi de l'instabilité génomique (Mulholland *et al.* 2012). Une implication importante de PTEN dans

l'initiation, le développement et la progression du CaP a été démontrée (Valkenburg *et al.* 2014; Tian *et al.* 2013). En effet, une étude de la base de donnée COSMIC a mis en évidence un taux de mutation important de *PTEN*, qui joue donc un rôle important dans le développement du CaP (Forbes *et al.*, 2015).

En effet, *PTEN* contrôle la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR, p53 ainsi que des kinases d'adhésion et participe ainsi au contrôle de la propagation et de la migration cellulaire (Jin *et al.* 2010). Dans le CaP, la voie PI3K/Akt est l'une des voies de signalisation les plus altérées. La perte de *PTEN* et l'augmentation de la voie Akt vont permettre l'induction de la prolifération des cellules dans le CaP (Barnett *et al.* 2014). De plus, *PTEN* régule aussi l'expression de GLUT1, qui est un transporteur du glucose situé à la membrane plasmique des cellules. Un dysfonctionnement de *PTEN* induit une surexpression de GLUT1, induisant une augmentation de captation de glucose ce qui participe à l'effet Warburg. L'effet Warburg est connu comme étant un grand générateur d'énergie dans le métabolisme du cancer et participe ainsi à la prolifération et la propagation des cellules cancéreuses (Mulholland *et al.* 2012).

4.3 **KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog)**

Le gène *KRAS* est situé sur le chromosome 12 et est composé de six exons. Ce gène code pour une protéine impliquée dans la voie de signalisation Ras/MAPK. Son action principale est d'interagir avec une protéine activatrice de la GTPase (GAPs : GTPase activating proteins) et d'envoyer des signaux aux noyaux. La majorité des mutations de *KRAS* affecte les codons 12, 13 et 61. Ses anomalies sont retrouvées dans de nombreuses tumeurs comme le cancer du pancréas ou de l'ovaire (Nodin *et al.* 2013). Une analyse des tissus a permis de mettre en évidence de nombreuses anomalies de *KRAS* dans le CaP, de plus, l'activation de *KRAS* en parallèle de la surexpression d'AR ou de la voie de signalisation Akt contribue à la progression du CaP (H. Cai *et al.* 2012).

4.4 **Rb (retinoblastoma protein)**

Rb est une protéine suppresseur de tumeur qui agit sur le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Sa délétion ou sa mutation est retrouvée dans de nombreux cancers chez l'Homme. *RB1*, est localisée sur le chromosome 13 en q14 et est rarement délétée dans les cancers de la prostate localisés ; cependant, *RB1* est inactivé dans plus de 45% des cancers résistants à la castration (Grasso *et al.* 2012; Taylor *et al.* 2010; Beltran *et al.*

2013). Des données récentes suggèrent que Rb module la signalisation d'AR et inhiberait la progression vers la résistance à la castration (Aparicio, Den, and Knudsen 2011).

4.5 Myc

Le gène *MYC* code pour un facteur de transcription c-Myc qui possède de nombreux gènes cibles pouvant être impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la survie cellulaire et la tumorigenèse. Des mutations, amplifications, surexpressions, réarrangements et translocations impliquant *MYC* sont souvent retrouvés dans les cellules tumorales. *MYC* est l'un des activateurs oncogéniques les plus courants dans les cancers chez l'Homme. Il est situé au niveau 8q24 et est couramment amplifié dans le CaP (Barbieri *et al.* 2012; Grasso *et al.* 2012; Taylor *et al.* 2010; Beltran *et al.* 2013). L'amplification du bras entier du chromosome 8 pourrait aussi induire la surexpression d'autres oncogènes retrouvés dans cette région.

De nombreuses autres altérations génétiques par exemple BRAF, KIT, SPOP, KRAS, ont aussi été référencées comme étant impliquées dans la mise en place et/ou le développement du CaP.

5 Les métastases osseuses dans le CaP

5.1 Généralités sur les métastases osseuses

La formation de métastases passe par différents processus qui sont : la perte de la cohésion cellulaire, la migration, l'angiogenèse, l'intravasation, la survie dans la circulation, l'échappement à l'immunité et la croissance dans un tissu ou dans des organes distants. L'os est le site majeur de formation de métastases dans le CaP avec une incidence d'environ 70% (Coleman 2006). Suite à la formation de métastases osseuses dans le CaP, la médiane de survie varie de 12 à 53 mois après le diagnostic (Selvaggi and Scagliotti 2005). Les métastases osseuses sont la cause majeure de mortalité et induisent une forte diminution de la qualité de vie causée par une grande douleur, une perte de la mobilité, l'augmentation du risque de fractures, une compression de la moelle épinière et une hypercalcémie (Selvaggi and Scagliotti 2005).

5.2 Différents types de métastases osseuses

Les métastases osseuses sont classées en trois types : ostéolytiques, ostéoblastiques ou mixtes, qui vont interférer avec le remodelage osseux normal.

- ✓ Ostéolytiques : ces métastases sont caractérisées par la destruction des tissus osseux normaux. Cette destruction est médiée principalement par l'activation des ostéoclastes.
- ✓ Ostéoblastiques : ces métastases sont caractérisées par la formation osseuse. Ce type de métastases est présent dans le cancer de la prostate et implique les cellules ostéoblastiques (Mundy 2002).
- ✓ Mixtes : chez certains patients on retrouve les deux types de métastases ostéolytiques et ostéoblastiques sur le même site métastatique. Bien que la majorité des études montrent un phénotype ostéoblastique majoritairement dans le CaP, d'autres études montrent la présence des deux types de lésion ostéolytique et ostéoblastique au sein d'un même patient (Mundy 2002; Logothetis and Lin 2005).

5.3 Mécanisme de formation des métastases osseuses

L'os est donc le site de formation métastatique préférentiel dans le cas du cancer de la prostate. Cependant, la compréhension du ciblage majoritairement osseux par rapport aux autres sites métastatiques n'est pas encore bien décrite. Il est donc important de connaître les mécanismes majeurs conduisant à la formation des métastases osseuses en se focalisant notamment, sur les interactions entre le cancer de la prostate et le microenvironnement osseux.

Suite à l'EMT, les cellules cancéreuses s'échappent de la tumeur primaire afin de rejoindre la circulation sanguine. Afin de s'extravaser vers un site secondaire, les cellules cancéreuses doivent pouvoir adhérer aux cellules endothéliales. Lors de leur dissémination vers l'os, les cellules cancéreuses prostatiques vont interagir avec les cellules endothéliales de la moelle osseuse (BMECs) *via* la fixation de son ligand, la E-sélectine (Dimitroff *et al.* 2004, 2005; Barthel *et al.* 2009). D'autres facteurs participent aussi à cette adhésion, c'est le cas de CD44, VCAM-1, entre autres, dont l'interaction avec les cellules endothéliales peut être favorisée par la présence d'IGF1 et d'IL-17 (Chong Chen *et al.* 2015).

Le microenvironnement est un critère important pouvant influencer la formation de métastases osseuses en permettant aux cellules tumorales exprimant certaines molécules d'adhésion de se fixer au microenvironnement osseux. Ce mécanisme semble être similaire à celui utilisé par les cellules souches hématopoïétiques (HSC) lors de leur migration à l'os. En effet, les cellules HSC et les cellules cancéreuses prostatiques expriment le récepteur CXCR4 et/ou CXCR7 et CXCR6 (Chemokine C-X-C motif Receptor 4, 7 et 6) et leurs ligands, les chimokines CXCL12 et CXCL16 (Chemokine C-X-C motif Ligand 12 et 16) (Taichman *et al.* 2002; Cojoc *et al.* 2013; Jianhua Wang *et al.* 2008; R. Singh *et al.* 2016). Différentes études montrent l'implication de ces facteurs dans le chimiotactisme des cellules cancéreuses prostatiques à l'os. En effet, l'inhibition de l'interaction CXCL12/ CXCR4 par un antagoniste de CXCR4 induit une diminution de la dissémination des cellules cancéreuses vers l'os (Conley-LaComb *et al.* 2016). De plus, l'expression de CXCL16 à la surface des cellules cancéreuses prostatiques induit le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse qui expriment le récepteur CXCR6 à leur surface. Suite à cette interaction, les cellules dérivées de la moelle osseuse sont différenciées en CAF. Ces CAF permettant ainsi l'EMT des cellules cancéreuses prostatiques favorisant leur dissémination à l'os (Jung *et al.* 2013).

Un autre chemoattractant pouvant induire le recrutement des cellules cancéreuses prostatiques et mammaires a également été mis en évidence. Il s'agit de la glycoprotéine SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) aussi appelée ostéonectine et BM-40 (Jacob *et al.* 1999). SPARC est une glycoprotéine non collagénuse modulant les interactions entre les cellules de la matrice extracellulaire. SPARC est décrite pour son implication dans la formation de la matrice extracellulaire ainsi que dans la minéralisation osseuse (Terminé *et al.* 1981; Delany *et al.* 2000; Framson and Sage 2004; Brekken and Sage 2001), en effet cette glycoprotéine est très abondante lors de remodelage actif du squelette (Delany *et al.* 2000), et joue un rôle significatif dans le remodelage des tissus, dans le maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire ainsi que dans l'assemblage des fibres de collagène (Podhajcer *et al.* 2008). De nombreuses études font état d'un rôle protumorigène et prométastatique de SPARC et l'associe à un facteur de mauvais pronostic. C'est le cas dans le mélanome (Chlenski *et al.* 2002; Ledda *et al.* 1997; Rumpler *et al.* 2003; Sosa *et al.* 2007; D. J. Smit, Gardiner, and Sturm 2007), le cancer du sein (Bellahcène and Castronovo 1995; Jones *et al.* 2004; Barth, Moll, and Ramaswamy 2005; Iacobuzio-Donahue *et al.* 2002; Lakhani *et al.* 2005; Watkins *et al.*

2005), les gliomes (Golembieski *et al.* 2017; Schultz *et al.* 2002) ainsi que dans de nombreux autres cancers (Vaz *et al.* 2015; Golembieski *et al.* 2017; Sansom *et al.* 2007; Sakai *et al.* 2001).

Concernant la formation de métastases osseuses, des études montrent que SPARC favorise leur formation en facilitant la migration cellulaire (Jacob *et al.* 1999; Campo McKnight *et al.* 2006). De plus, une forte migration des cellules cancéreuses de la prostate vers l'os est aussi mise en évidence (Jacob *et al.* 1999); de même une étude montre que les cellules cancéreuses prostatique sauvages migrent d'avantage vers l'os que celles issues de souris transgéniques dont l'expression de SPARC est nulle. Cet effet est reversé lors de la restauration de SPARC (De *et al.* 2003). La formation de métastases osseuses étant la forme majoritairement retrouvée dans le CaP, des études mettent en évidence une surexpression de SPARC dans ce cancer aussi bien au niveau de l'expression transcriptionnelle que protéique, qu'au niveau d'échantillons tumoraux ou de lignées cellulaires cancéreuses prostatiques (Thomas *et al.* 2000; D. Singh *et al.* 2002; Best *et al.* 2005; Z. Wang *et al.* 2016).

6 Les fusions de gènes dans le CaP

D'autres modifications génétiques comme les réarrangements chromosomiques sont caractérisées dans les leucémies, les lymphomes et certains sarcomes (Rowley 2001). Ces réarrangements sont généralement de deux types : ① la fusion entre un promoteur et un gène juxtaposé à celui-ci de façon aberrante et induisant ainsi l'altération de l'expression de celui-ci, ② deux gènes induisant la formation d'une protéine de fusion possédant une activité conservée ou altérée. C'est le cas par exemple de BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique (ROWLEY 1973; de Klein *et al.* 1982).

6.1 Historique de la découverte des fusions de gènes dans le CaP

Tomlins et ses collaborateurs ont développé une méthode bio-informatique permettant d'identifier les réarrangements chromosomiques dans le cancer. Cette méthode est appelée méthode COPA pour « cancer outlier profile analysis », et permet de détecter les réarrangements chromosomiques récurrents dans les données de microarray. C'est ainsi qu'en 2005, Tomlins et ses collaborateurs ont mis en évidence des fusions de gènes impliquant les facteurs de transcription ERG et ETV1 dans le cancer de la prostate (S. a Tomlins *et al.* 2005). Puis d'autres fusions impliquant d'autres

facteurs ETS ont été découvertes dans le CaP dont ETV4 en 2006 et ETV5 en 2008, tout deux appartenant à la même famille que ETV1 (S. a. Tomlins et al. 2006; Helgeson et al. 2008).

6.2 Diversité des fusions ETS dans le CaP

6.2.1 Gènes et promoteurs impliqués

La technique COPA a donc permis de mettre en évidence des réarrangements chromosomiques dans le CaP entre un facteur ETS principalement couplé à un promoteur de gène androgéno-dépendant. Cette large catégorie de fusion implique dans la majorité des cas le promoteur TMPRSS2 avec le facteur ERG. Cependant les promoteurs fusionnés en amont des facteurs ETS sont nombreux, par exemple dans le cas d'ETV1, au moins neuf partenaires de fusion ont été identifiés comme SLC45A3, HERV-K, EST14 entre autres (**Figure 19**). Dans le cas de ERG, en plus du promoteur TMPRSS2 sont retrouvés les promoteurs SLC45A3, HERPUD1 et NDRG1 (**Figure 19**)(Esgueva *et al.* 2010; Han *et al.* 2008; Maher *et al.* 2009; Pflueger *et al.* 2009).

L'avancement des technologies de séquençage a aussi permis de mettre en évidence des fusions moins représentées dans le CaP. C'est les cas des fusions impliquant le gène *RAF*, qui est retrouvé dans de rares cas fusionnés aux promoteurs SLC45A3- BRAF et à RAF1- ESRP1 dans le cas de CaP avancés (**Figure 19**)(Palanisamy *et al.* 2010). Pour finir, une troisième catégorie concernant des fusions avec la protéine SPINK1 a été identifiée dans de rares cas (Scott A. Tomlins et al. 2008).

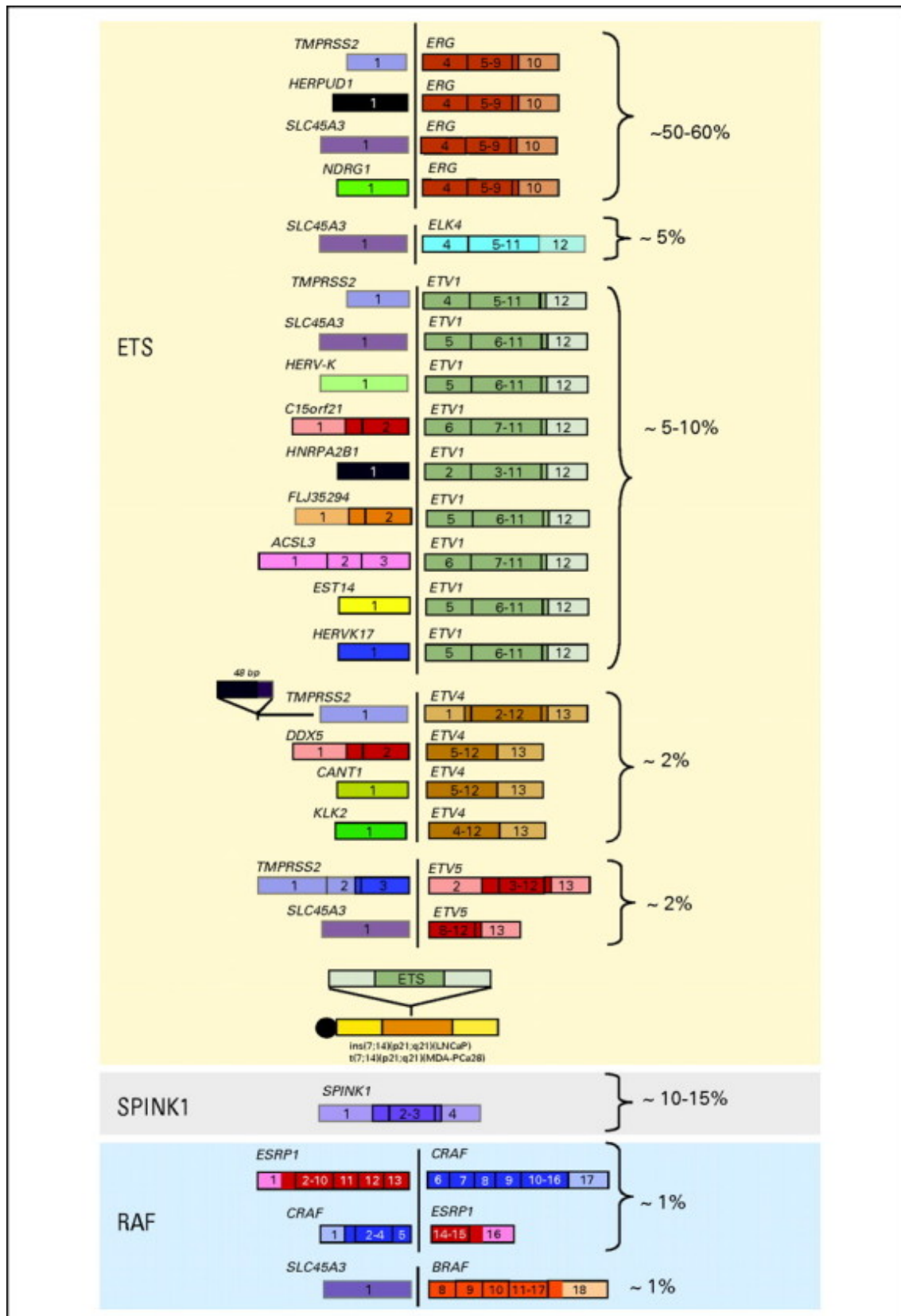


Figure 19: Classification des fusions de gènes dans la CaP.
(Figure extraite de : Rubin, Maher and Chinnaiyan, 2011)

6.2.2 Longueur des transcrits

Une grande diversité est aussi observée dans les transcrits issus de ces fusions. Dans le cas de la fusion TMPRSS2-ERG, le transcrit le plus retrouvé est appelé T1E4, c'est à dire qu'il est composé comme le montre la **Figure 19**, du premier exon de TMPRSS2 fusionné à l'exon 4 d'ERG. Les structures des protéines ETV1, ETV4 et ETV5 sont aussi nombreuses. Dans le cas d'ETV1, quatre fusions avec TMPRSS2 ont été décrites. Une fusion induisant la surexpression de la protéine ETV1 pleine longueur et trois fusions avec différentes délétions en N-terminal (**Figure 20**). Dans le CaP, deux formes de fusion ETV1 sont majoritairement retrouvées, la forme pleine longueur (**Figure 20 I**) et la forme délétée des 131 premiers acides aminés en N-terminal appelée dETV1 (**Figure 20 IV**) (Gasi *et al.* 2011; Hermans, Van Der Korput, *et al.* 2008). On peut ainsi observer la perte du domaine d'activation de la protéine tronquée dETV1 (**Figure 20 IV**).

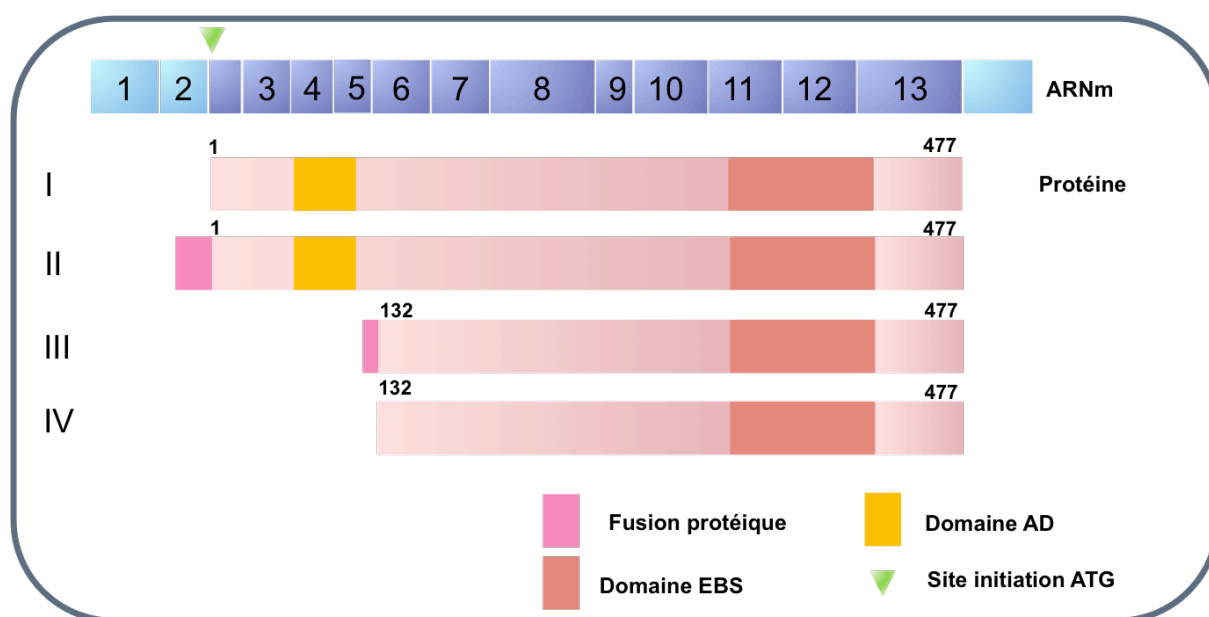


Figure 20: Différentes fusions impliquant le facteur ETV1 dans le CaP.

Les translocations résultent en II et III d'une fusion protéique avec un domaine fonctionnel de TMPRSS2. (Figure adapté de Firlej *et al.* 2008; Chotteau-Lelievre *et al.* 2003; Soriano *et al.* 1995)

6.3 Prévalence des différentes fusions ETS dans le CaP

Depuis la découverte des fusions de gènes dans le CaP par Tomlins, de nombreuses études ont corroboré ces résultats en mettant elles aussi en évidence la présence de fusions TMPRSS2-ETS dans ce cancer. Ces nombreuses études montrent une variabilité

dans la prévalence des différentes fusions. Par exemple la présence de la fusion TMPRSS2-ERG varie de 40 à 70% en fonction de la cohorte étudiée. Une variation est aussi observable pour les fusions impliquant le facteur ETV1, allant de 0 à 24% (**Tableau 7**). Ces différences de prévalence peuvent s'expliquer par la situation géographique des populations. En effet, certaines études montrent des pourcentages de fusions très bas dans certaines populations asiatiques et indiennes (**Tableau 7**)(Miyagi *et al.* 2010; Dong *et al.* 2014; Ateeq *et al.* 2015). De plus, l'étude de Miyagi *et al* montre une faible incidence des fusions de gènes, toutes fusions confondues, dans la population Japonaise (28%) alors que les populations européennes et du nord des Etats Unis présentent un taux supérieur à 50% (Miyagi *et al.* 2010). Différentes études montrent une corrélation entre l'agressivité du CaP et la présence de fusions impliquant le facteur de transcription ETV1 (Attard *et al.* 2008; Singareddy *et al.* 2013).

6.4 Notion de CaP multifocal

Le CaP est donc considéré comme étant une maladie très hétérogène par la diversité des fusions ainsi que par les différences de prévalence en fonction des populations. Cette hétérogénéité est renforcée par la présence potentielle de différents foyers au sein d'un même patient et l'on parle ainsi d'hétérogénéité intra focale. En effet, l'étude de Svensson et collaborateur de 2011 fait état d'un cancer de la prostate présentant différents réarrangement ETS, celui-ci pouvant impliquer soit le même facteur ETS fusionné à différents promoteurs comme par exemple TMPRSS2 :ERG et NDRG1 :ERG soit différents facteurs ETS comme ERG et ETV1 au seins de différents foyers chez un même patient (Svensson *et al.* 2011). D'autres études ont aussi mis en évidence d'autres cas d'hétérogénéité intra focale, par exemple la présence chez le même patient de SLC45A3 :ERG avec un réarrangement impliquant ETV4 (Paulo, Barros-Silva, et al. 2012).

Tableau 7: Prévalence des fusions ETV1 dans le CaP.

Fréquence (%)	Echantillons	Type de fusion	Expérimentation	Référence	Remarque
7/29 (24%)	CaP	TMPRSS2:ETV1	qRT-PCR/ FISH	(S. A. Tomlins <i>et al.</i> 2005)	
1/11 (9%)	CaP, xenogreffes	TMPRSS2:ETV1	q-PCR/ FISH	(Hermans <i>et al.</i> 2006)	
1/53 (2%)	CaP	TMPRSS2:ETV1	FISH	(Mehra <i>et al.</i> 2007)	
0/50 (0%)	CaP		RT-PCR	(Winnes <i>et al.</i> 2007)	
23/429 (5,4%)	CaP	différentes partenaires de fusion, co-localisation chromosome 14 et partenaires inconnus	FISH	(Attard <i>et al.</i> 2008)	Corrélation avec haut score Gleason
2/194 (1%)	CaP	HNRPA2B1: ETV1	RT-PCR	(Miyagi <i>et al.</i> 2010)	Cohorte d'origine asiatique
5/85 (6%)	CaP	SLC45A3:ETV1; TMPRSS2:ETV1	FISH	(Svensson <i>et al.</i> 2011)	Cancer de la prostate localisé
6/66 (9%)	CaP	ETV1 pleine longueur, TMPRSS2:ETV1, HNRPA2B1:ETV1	qRT-PCR	(Gasi <i>et al.</i> 2011)	
14/200 (7%)	CaP		RT-PCR/ FISH	(Paulo, Barros-Silva, <i>et al.</i> 2012)	
8/100 (8%)	CaP	TMPRSS2:ETV1	FISH	(J.-J. Wang <i>et al.</i> 2012)	Cohorte d'origine asiatique
4/67 (6%)	CaP	TMPRSS2:ETV1	RT-PCR	(F. P. Smit <i>et al.</i> 2013)	Surexpression d'ETV1 uniquement dans les cancers de haut grade ou CPRC
0/91 et 0/18	91 Biopsies de CaP et 18 prostatectomies		FISH	(Dong <i>et al.</i> 2014)	Cohorte d'origine asiatique
1/94 (1%)	CaP		IHC/FISH/ RNA <i>in situ</i> hybridation	(Ateeq <i>et al.</i> 2015)	Cohorte d'origine Indienne
6,3% prostatectomies et 8,6% biopsie	4036 prostatectomies et 509 biopsies		Hybridation <i>in situ</i>	(Torres <i>et al.</i> 2017)	

6.5 Implication des fusions de gènes dont ETV1 dans le CaP

6.5.1 Mécanisme des fusions de gènes

La proximité entre *TMPRSS2* et *ERG* est un élément important pouvant expliquer la fréquence élevée de fusion en comparaison aux autres fusions impliquant d'autres facteurs ETS (Mani *et al.* 2009). Bien que tous les autres événements de fusions de gènes ETS s'effectuent avec des gènes contenus sur des chromosomes différents ou à une distance importante au sein du même chromosome, il est possible que ces fusions puissent être facilitées par la proximité nucléaire des partenaires de fusion. Ces remaniements peuvent être établis par la formation de boucles dans certaines régions génomiques et dans certaines conditions de croissance des cellules, facilitant ainsi la rencontre des partenaires de fusions (C. Lin, Yang, and Rosenfeld 2012; Mani *et al.* 2009; Lin *et al.* 2009). D'autres facteurs peuvent aussi favoriser les recombinaisons chromosomiques comme la présence de cassures doubles brins. Des études ont permis de mettre en évidence que les radiations ou la stimulation par les androgènes étaient favorables à ce genre d'événements (C. Lin *et al.* 2009; Mani *et al.* 2009).

6.5.2 Implication de ces translocations

La majorité des fusions impliquant les facteurs ETS dans le CaP s'effectuent avec un promoteur sensible aux androgènes comme par exemple *TMPRSS2*. La présence des androgènes va alors stimuler de façon aberrante les facteurs de transcription ETS induisant ainsi l'expression de leurs gènes cibles (**Figure 21**). Ces gènes vont participer à de nombreux processus physiologiques et participent ainsi au développement du cancer de la prostate. Il existe cependant des exceptions de fusion avec des promoteurs non sensibles aux androgènes ou réprimés par les androgènes, c'est le cas par exemple des promoteurs *HNRPA2B1* et *C15orf21*. *ETV1* est retrouvé fusionné avec deux de ces promoteurs et forme donc un petit sous-groupe de cancers de la prostate androgéno indépendants (Attard *et al.* 2008).

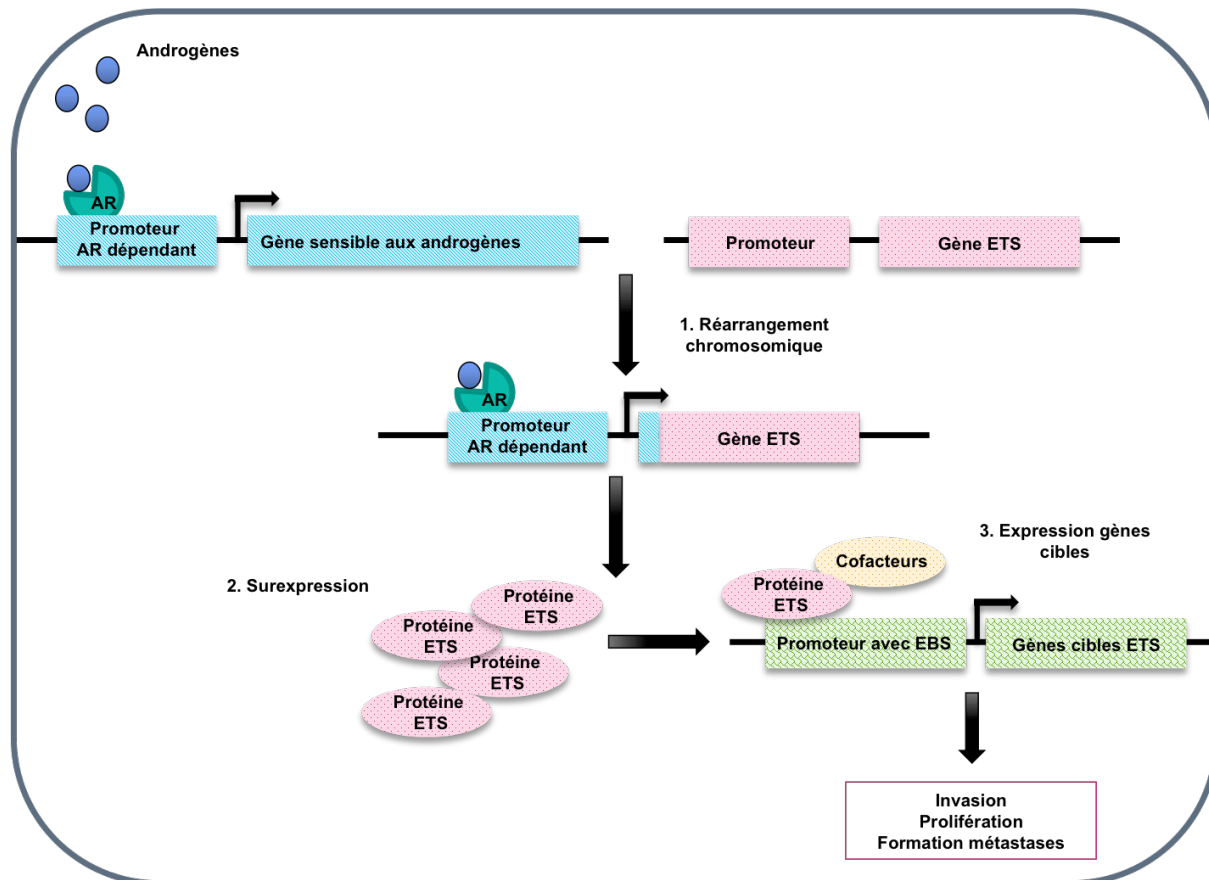


Figure 21: Réarrangements chromosomiques impliquant les facteurs ETS et un promoteur hormono-sensible.

6.6 Fonctions biologiques des facteurs ETV1 et ERG dans le CaP

6.6.1 Impact de la surexpression d'ETV1 ou ERG

Le niveau d'importance des facteurs ERG et ETV1 sur la mise en place du CaP n'est pas encore bien défini. Des études montrent que la surexpression seule des facteurs ETS n'est pas suffisante pour induire le développement d'un cancer de la prostate. Néanmoins, des études *in vitro* montrent que la surexpression d'ERG ou d'ETV1 dans des lignées cellulaires immortalisées d'épithélium de prostate induit une augmentation de la migration et de l'invasion (Tomlins *et al.* 2007; Tomlins *et al.* 2008; Klezovitch *et al.* 2008; J. Wang *et al.* 2008); et qu'à l'inverse leur inhibition dans des lignées cancéreuses prostatiques diminue leur invasion (Scott A. Tomlins *et al.* 2007; Scott A Tomlins *et al.* 2008). De plus, des différences sont mises en évidence entre la forme pleine longueur et la forme tronquée d'ETV1. Ainsi, la forme pleine longueur

présente une activité transcriptionnelle plus importante et seule la surexpression de la forme pleine longueur est capable d'induire une croissance sans ancrage *in vitro* lorsqu'elles sont exprimées dans une lignée cellulaire prostatique épithéliale non cancéreuse (PNT2C2) (Hermans *et al.* 2008).

L'utilisation de souris transgéniques montre que la surexpression des facteurs ERG ou ETV1 est capable d'induire le développement d'une néoplasie intra-épithéliale (PIN : neoplasia intraepithelial) mais pas d'un cancer invasif (Klezovitch *et al.* 2008; Scott A Tomlins *et al.* 2008; Scott A. Tomlins *et al.* 2007). Cependant d'autres résultats montrent que la fusion TMPRSS2:ERG seule n'est pas capable d'induire une néoplasie intra-épithéliale (PIN) (King *et al.* 2009)

6.6.2 Association de la surexpression d'ETV1 ou ERG à la perte de PTEN

La surexpression seule d'ERG ou d'ETV1 n'est donc pas suffisante pour induire le développement d'un CaP, une coopération avec d'autres suppresseurs de tumeur est nécessaire. Nous avons pu voir précédemment que de nombreuses altérations génétiques sont présentes dans le CaP. Ainsi une coopération entre la surexpression de ERG ou ETV1 dans les lignées cellulaires montre une coopération avec l'activation de la voie PI3K dans le cas de cancer plus agressif (King *et al.* 2009; Carver *et al.* 2009; Zong *et al.* 2009; Baena *et al.* 2013). Le suppresseur de tumeur PTEN contrôle la voie PI3K est souvent perdue dans les CaP comme nous avons pu le voir précédemment. Ainsi des modèles de souris génétiquement modifiées ont permis de montrer le développement de cancers localisés lorsque les fusions *TMPRSS2 : ERG* ou *TMPRSS2 :ETV1* sont associées à la perte d'une seule copie de *PTEN*. Cependant seule la fusion *TMPRSS2 :ETV1* couplée à la perte totale de *PTEN* a permis le développement d'un adénocarcinome invasif et une baisse de la survie (Baena *et al.* 2013).

6.6.3 Existe-t-il des différences entre les fusions ERG et ETV1 ?

Suite à cette différence d'agressivité, Baena et ses collaborateurs ont effectué une analyse génomique afin d'identifier les gènes cibles d'ETV1 et d'ERG dans le but de mettre en évidence des différences d'action dans le développement et d'agressivité dans le CaP. Cette étude multidisciplinaire met en évidence différents programmes transcriptionnels ciblés par ERG et ETV1 dans les cellules prostatiques. En effet, certains gènes sont régulés par ces deux facteurs mais de façon opposée, chacun présente également des programmes uniques. ERG est ainsi associé à la régulation du cycle

cellulaire et à la réplication de l'ADN, tandis qu'ETV1 est impliqué dans la synthèse des lipides ainsi que dans d'autres voies moléculaires (**Figure 22**) (Baena *et al.* 2013).

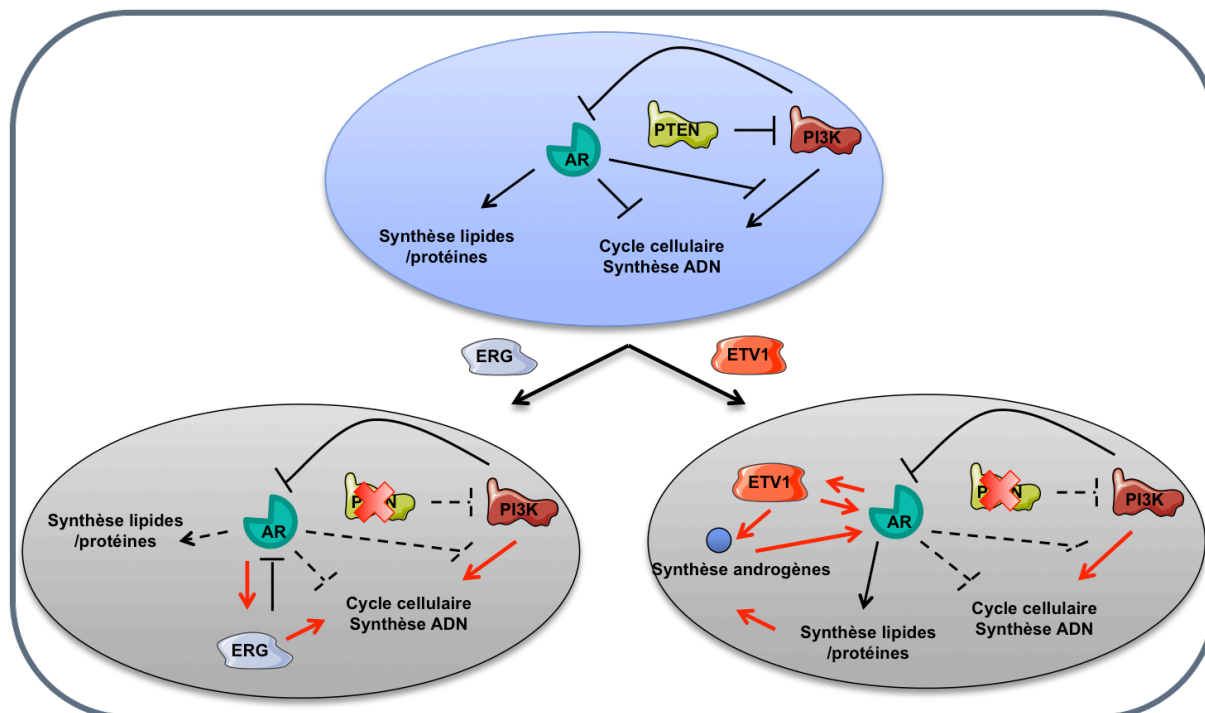


Figure 22: Différences de contribution des facteurs ETV1 et ERG dans la tumorigénèse prostatique suite à la perte de PTEN.
(Adapté de Baena *et al.*, 2013)

6.6.3.1 Différences dans la voie de régulation d'AR par ETV1 et ERG

Comme nous avons pu le voir précédemment, AR joue un rôle important dans le développement et la tumorigénèse prostatiques. Une relation de régulation complexe d'AR par ETV1 et ERG est mise en évidence. En effet, AR est régulé négativement par ERG et positivement par ETV1, le facteur ETV1 va ainsi favoriser la transcription des gènes cibles d'AR (**Figure 22**) (J. Yu *et al.* 2010; Baena *et al.* 2013). De plus, AR régule lui aussi l'expression d'ETV1 ce qui suggère une boucle de régulation positive dans les cellules cancéreuses prostatiques (**Figure 22**) (C. Cai *et al.* 2007b).

6.6.3.2 Différences dans la régulation des voies du métabolisme

La programmation des voies du métabolisme semble être effectuée uniquement par le facteur ETV1 qui va participer à la synthèse des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol et des stéroïdes. La surexpression d'ETV1 dans les cellules prostatiques humaines et dans des souris génétiquement modifiées induit une augmentation de la production de la testostérone (Baena *et al.* 2013). ETV1 semble donc favoriser le développement de cancers agressifs (**Figure 22**).

6.6.3.3 Différences dans l'agressivité de la tumorigenèse prostatique

Des études de méta-analyses mettent en évidence que l'expression d'ERG n'est pas associée à un score de Gleason élevé et qu'il n'est donc pas un marqueur de mauvais pronostic (Pettersson *et al.* 2012). De plus certaines analyses de l'expression d'ERG au niveau transcriptionnel ou protéique confirment que la forte expression d'ERG est un marqueur pronostique favorable (Kimura *et al.* 2012; Suh *et al.* 2012). À l'inverse d'autres études corrélerent une forte expression d'ERG à un mauvais pronostic (Bismar *et al.* 2012).

Une forte expression au niveau transcriptionnel d'ETV1 est souvent associée à un score de Gleason élevé (Attard *et al.* 2008; Shin *et al.* 2009; Baena *et al.* 2013), cependant le manque d'anticorps fonctionnels n'a pas permis de confirmer cette corrélation avec le niveau protéique. Une corrélation entre ETV1 et cancer résistant à la castration a été mise en évidence ce qui suggère que le programme oncogénique induit par le facteur ETV1 est favorable à la progression du cancer de la prostate (Baena *et al.* 2013).

7. Conclusion

Les facteurs du groupe PEA3,ETV1, ETV4 et ETV5, jouent un rôle important au niveau physiologique, notamment au cours de la morphogenèse de branchement. Leur activité est régulée de façon précise par de nombreuses voies de signalisations, par d'autres facteurs de transcription, par des interactions avec d'autres protéines mais aussi par des modifications post traductionnelles. Cette fine régulation peut cependant être perturbée et dévier vers la formation de pathologies comme le développement de divers cancers. La régulation de leurs gènes cibles est alors altérée, et ils vont ainsi participer au développement de cancers. C'est le cas par exemple, du facteur ETV4 dans la tumorigenèse mammaire qui va réguler des nombreux gènes cibles comme MMP13 ou le cas de la translocation de certains facteurs ETS comme ERG et ETV1 dans la tumorigenèse prostatique, qui font l'objet des projets développés lors de la thèse.

Présentation et contexte du projet de thèse

Cette thèse se découpe en deux grandes parties et porte sur deux projets dont le point commun est la famille de facteur de transcription ETS et plus particulièrement des facteurs ETV1, 4 et 5 du groupe PEA3.

La première partie de mon projet porte sur **l'étude de la métalloprotéase MMP13 en tant que relais du facteur de transcription ETV4 dans la tumorigenèse mammaire**. Ce projet m'a été confié lors de ma deuxième année de Master au sein de l'équipe du docteur Dr. Tulasne et sous la direction du Pr A. Chotteau. Ce projet est la continuité d'une étude menée en amont et a porté sur **l'étude du rôle du facteur de transcription ETV4 au cours de la morphogenèse et la tumorigenèse mammaires**. Ces travaux ont permis d'identifier une liste de gènes cibles potentiellement régulés par ETV4 et impliqués dans la tumorigenèse mammaire. Dans cette liste se trouve le gène codant la métalloprotéase MMP13 sur lequel fait l'objet le travail initié en Master 2 et poursuivi au cours de ma première année de thèse. Ces travaux font l'objet d'une publication en cours de reviewing dans le journal Breast Cancer Research et sont présentés dans la première partie de ce manuscrit.

La deuxième partie de mon projet de thèse fait suite au changement d'équipe de ma directrice de thèse qui a intégré l'équipe du Dr M. Dutertre dont la thématique de recherche porte sur **l'étude de la formation des métastases dans le cancer de la prostate**. Dans ce but, des études portant sur l'implication de la fusion de gènes TMPRSS2 :ERG, fusion majoritairement retrouvée dans le cancer de la prostate ont mis en évidence un certain nombre de gènes cibles pouvant être impliqués dans ce processus de métastases. De nombreux facteurs de transcription de la famille ETS sont aussi retrouvés surexprimés dans le cancer de la prostate, dont ETV1 qui est l'un des plus retrouvés après ERG. En effet, le facteur ETV1 est surexprimé dans environ 10% des cas de cancer de la prostate, et dans environ la moitié des cas il se trouve sous une forme tronquée. Ainsi le projet qui m'a été confié porte sur la **comparaison des différences potentielles entre le facteur ERG et le facteur de transcription ETV1 sous sa forme pleine longueur dans la formation des métastases osseuses**. Les résultats de cette étude effectuée lors de mes seconde et troisième années de thèse font l'objet de la deuxième partie de ce manuscrit.

Partie I:
La métalloprotéase 13 relais du facteur de transcription ETV4 dans la
tumorigenèse mammaire

Contexte: Partie I

Le cadre général de la première partie du projet de thèse s'inscrit dans la poursuite de la caractérisation des cibles moléculaires du facteur de transcription ETV4 dans ses fonctions au cours de la morphogenèse et de tumorigenèse mammaires, sur la base de modèle cellulaire murin « normal » (cellules TAC) ou tumoral (cellules MMT).

À l'issue d'un crible des cibles du facteur ETV4, réalisé par une analyse transcriptomique comparative à partir des cellules mammaires murines TAC surexprimant ETV4 et MMT dans lesquelles l'expression de ETV4 est réprimée, le gène *MMP13* a été identifié comme étant une cible de ETV4. Ce gène s'est révélé être une cible pertinente à étudier, de par son niveau de régulation par ETV4, de par son rôle connu dans les processus conduisant à la cancérisation des cellules, notamment dans le modèle mammaire, mais aussi parce que certaines données montraient un lien de régulation potentiel du promoteur *MMP13* par ETV4. Néanmoins aucune démonstration d'un lien de régulation fonctionnel n'avait été décrite.

Dans ce contexte, nous avons entrepris de poursuivre deux objectifs :

- la confirmation du lien de régulation entre ETV4 et *MMP13* au niveau transcriptionnel par des expériences de Q-RT-PCR en temps réel mais aussi par l'analyse du promoteur du gène *MMP13*,
- la caractérisation du lien fonctionnel entre ETV4 et *MMP13* dans les cellules à caractère « normal » (TAC) ainsi que dans les cellules à caractère tumoral (MMT).

Pour ce projet, nous avons utilisé la lignée cellulaire cancéreuse mammaire murine MMT dans laquelle l'expression de ETV4 et/ ou *MMP13* a été modulée. Les différents modèles ont été validés au niveau transcriptionnel par Q-RT-PCR et au niveau protéique par Western Blot.

Ensuite, pour chaque modèle cellulaire établi et validé, différents tests phénotypiques *in vitro* (prolifération, migration, potentiel de clonage sans ancrage) ont été entrepris afin d'étudier le lien fonctionnel entre ETV4 et *MMP13*.

Enfin ce lien fonctionnel a été étudié *in vivo* chez la souris grâce à l'injection sous-cutanée des différents modèles cellulaires et a aussi été analysé en collaboration avec le Dr I. Bièche dans une cohorte d'échantillons de tumeurs mammaires.

Cette étude fait l'objet de la publication : « **ETV4 transcription factor and MMP13 metalloprotease are interplaying actors of breast tumorigenesis** », en révision dans le journal Breast Cancer Research.

Résultats Partie I :
La métalloprotéase 13 relais du facteur de transcription ETV4 dans la
tumorigenèse mammaire

Publication n°1

**ETV4 transcription factor and MMP13 metalloprotease
are interplaying actors of breast tumorigenesis**

Envoyé dans le journal : Breast Cancer Research (le 21 Juillet 2017 puis le
20 Septembre 2017)

Mandy DUMORTIER¹, Franck LADAM², Isabelle DAMOUR¹, Sophie
VACHER³, Ivan BIECHE , Nathalie MARCHAND, Yvan de LAUNOIT , David
TULASNE and Anne CHOTTEAU-LELIEVRE¹

Résumé des résultats

Contexte : Le facteur de transcription ETV4 est impliqué dans les étapes majeures de l'organogenèse et joue également un rôle important lors de la tumorigenèse et la formation de métastases notamment dans le cancer du sein. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires régulés par ce facteur dans ce contexte restent méconnus. Dans les cellules épithéliales mammaires, le facteur ETV4 contrôle l'expression de nombreux gènes, parmi lesquels la métalloprotéase MMP13. Cette étude a pour but de comprendre la fonction de MMP13 lors de la tumorigenèse induite par ETV4.

Méthodes : Différentes constructions du promoteur du gène MMP13 sont utilisées pour étudier la régulation de MMP13 par ETV4. De plus, la prolifération, la migration, l'invasion, la croissance sans ancrage et la tumorigenèse *in vivo* sont étudiés avec différents modèles de cellules épithéliales cancéreuses mammaires dans lesquelles l'expression de ETV4 et/ou MMP13 est modulée. Pour finir, l'expression en ARNm de MMP13 et ETV4 est caractérisée à partir de 456 échantillons de cancers du sein.

Résultats : Notre étude montre que le facteur ETV4 induit la prolifération, la migration, l'invasion et la croissance sans ancrage des lignées cellulaires cancéreuses mammaires MMT. L'étude des événements moléculaires en aval d'ETV4 a permis de mettre en évidence la métalloprotéase MMP13 comme nouveau gène cible d'ETV4. Par la surexpression ou la répression de MMP13, nous avons mis en évidence que cette métalloprotéase contribue aux propriétés de prolifération, migration, invasion et croissance sans ancrage. De plus, l'inhibition de MMP13 perturbe les propriétés cellulaires induites par ETV4 et participe à la formation des tumeurs induites par ETV4 *in vivo* dans des souris immunodéficientes. Enfin, la surexpression d'ETV4 et de MMP13 est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein.

Conclusion : MMP13 agit comme relais du facteur ETV4 lors de la formation et le développement du cancer mammaire.

Introduction

ETV4, with ETV1 and ETV5, constitute the PEA3 group among the 12 subgroups of the ETS transcription factor family, defined by their conserved DNA binding domain (ETS binding domain) [1, 2]. They control the development of various organs and are involved in the progression of many cancers including breast cancer [1, 3–8]. ETV4 directly influences the outcome of mammary tumorigenesis induced by the ERBB2, SRC1 and Wnt1 oncogenes [9– 11]. However, the cellular and molecular mechanisms regulated by the ETV4 factor during mammary cancer progression are still poorly understood.

In most cases, carcinogenesis is associated with an overexpression of ETV4 promoting proliferation, migration and/or invasion involved in the tumorigenic and/or metastatic process. As a consequence, deregulation of ETV4 target genes has a key role in these processes. Few ETV4 target genes involved in the regulation of these biological responses have been described so far, particularly in the mammary cells and tissues. In these latter, ETV4 has been shown to regulate the expression of several matrix metalloproteases such as MMP2 or MMP9, transcription factors involved in epithelial to mesenchymal transition (EMT) such as Twist1 or Snail, or other cancer related factors such as Bax, Cyclin D3 or Cyclin D2 and therefore to play an active role during the acquisition of invasive properties by mammary cancer cells [8, 10, 12–15]. A transcriptomic wide identification of ETV4 responsive genes in mammary cells has shown that many more genes are potentially regulated by ETV4 even if it is still unclear if they are direct targets and what roles they could play in the context of ETV4 driven tumorigenesis [16]. Therefore, the precise characterization of new ETV4 target genes in the context of mammary tumorigenesis will allow a better understanding of the molecular mechanisms involved in this pathology.

MMP13 is one of those genes and was identified as being down-regulated following ETV4 knock-down in mammary epithelial cells. MMP13 (collagenase 3) belongs to the collagenase subfamily of matrix metalloproteases (MMP) and degrades all fibrillary collagens, particularly the type II collagen [17]. MMP13 has a role in different kind of cancer [18] and is overexpressed in a variety of malignant tumors [19]. It was first identified from overexpressing breast carcinomas [20]. Although the role of MMP13 in

mammary tumorigenesis has been reported [18, 21–27] its implication is still misunderstood. Indeed, MMP13 is expressed in the endothelium surrounding breast tumors suggesting a role in the modulation of extracellular matrix degradation and cell-matrix interactions involved in metastasis [20, 28]. Consistently, functional evidence demonstrates that MMP13 increases the invasive capacities of the malignant cells in breast cancer [29–31]. Yet, the precise role of the MMP13 protein and how the *MMP13* gene is transcriptionally regulated during mammary tumorigenesis remain unclear.

In this study, we first report that *MMP13* is a new ETV4 target gene in various mammary cellular models and we identified an ETS binding site necessary for the direct regulation of the *MMP13* gene promoter by ETV4. Second, by establishing ETV4- and MMP13- overexpressing and MMP13-repressing MMT cells to assess modification of the phenotypic cellular properties, we show that ETV4 significantly promotes cell proliferation, migration, invasion and anchorage independent growth. Moreover, we put in evidence that MMP13, to a lesser extent, presents the same contribution. Next, we assess the consequences of MMP13 knock-down in ETV4-controlled events. Interestingly, as MMP13 inhibition disturbs the positive effect of ETV4 on MMT proliferating, migrating and invading activities, we demonstrate that MMP13 acts as a relay of ETV4 in its functional role in the mammary epithelial tumorigenic cells, *in vitro* as well as in tumor xenograft assays *in vivo*. Finally, we investigate the ETV4-MMP13 link in breast cancer samples and depict that the association of both ETV4 and MMP13 overexpression is associated with poor patient outcome.

Ultimately, these data shed light on a new ETV4 relay, the extracellular metalloprotease MMP13, which could be potentially targeted in the context of ETV4-controlled mammary tumorigenesis.

Résultats

***MMP13* is a new ETV4 target gene in mammary epithelial cells**

We previously described ETV4-regulated genes in the mammary tumorigenic MMT cells following ETV4 inhibition [16]. We completed these data by performing transcriptomic analysis by microarrays to identify ETV4-regulated genes in mammary epithelial TAC cells [16, 32] and found that ETV4 positively modulates *MMP13* gene expression (0.16-

fold: p -value 0.02 following ETV4 inhibition and 18.12-fold: p value 0.0014 following ETV4 overexpression). Other MMPs (1-2-3-9-14) were slightly regulated but not as much as MMP13 [16]. In order to characterize the regulation of *MMP13* expression by ETV4, we used the previously described mammary epithelial TAC cell line overexpressing ETV4 [8] as well as the mammary cancerous MMT cell line and the breast epithelial MCF10-A cell line, engineered to overexpress a V5-tagged-ETV4 protein after a retroviral infection (MMT-ETV4 and MCF10A-ETV4) (Fig. 1a & c and Fig. S1a & c). Overexpression of ETV4 upregulates *MMP13* mRNA and protein expression in the mouse TAC, MMT (Fig. 1b & d) and human MCF10A cells (Fig. S1b & d). Moreover, the secretion of the active form of MMP13 is increased in supernatant of ETV4 overexpressing cells as shown by western blot (Fig. 1e) and zymography (Fig. 1f).

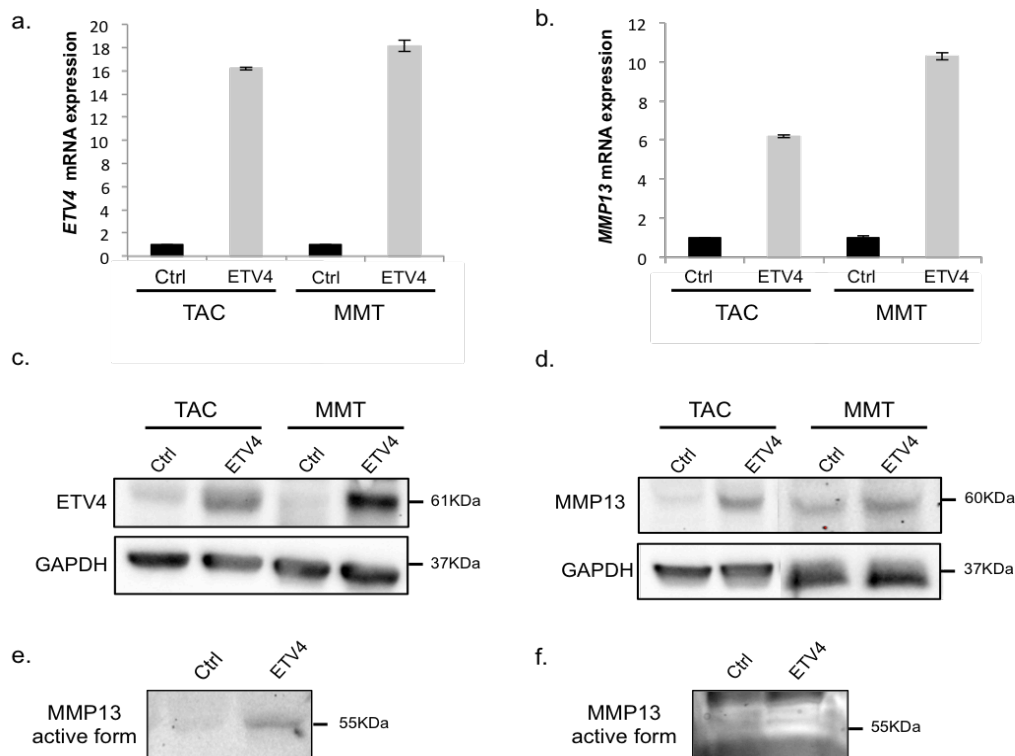


Fig. 1 Expression of ETV4 and MMP13 in TAC-Ctrl/ETV4 and MMT-Ctrl/ETV4 cells. **a/b** Relative *ETV4* (**a**) or *MMP13* (**b**) mRNA expression in TAC/MMT-Ctrl and TAC/MMT-ETV4 cells determined by real-time PCR and normalized to *Cyclophilin A* levels. mRNA expression in TAC/MMT-Ctrl cells was arbitrarily = 1. Error bars indicate SD. **c/d** Western blot analysis of ETV4 protein expression (61 kDa) (**c**) or MMP13 protein expression (60 kDa) (**d**) in TAC/MMT-Ctrl and TAC/MMT-ETV4 cells. GAPDH expression served as the loading control. **e** Western blot analysis of the secreted MMP13 protein expression (55 kDa) issue from the supernatant of MMT-Ctrl and MMT-ETV4 cells. **f** Zymography analysis of MMP13 protein activity (55 kDa) in MMT-Ctrl and MMT-ETV4 cells.

We next completed these data by the analysis of the ETV4 regulated *MMP13* promoter. TAC cells were transfected with various *MMP13* gene promoter fragments cloned into a luciferase reporter vector and ETV4-expression vector or control vector. Our results indicate that the *MMP13* promoter (-1800) is active in TAC cells. Moreover ETV4 transactivates the *MMP13* gene promoter region spanning 1800 bp downstream of the translation start codon (MMP13- 1800) (Fig. 2a & b). To delineate the responsive elements driving the promoter activity, we tested various deletion constructs (Fig. 2a) and identified a region of 91 bp (MMP13-91), which displays an optimal promoter activity as well as induction by ETV4 (Fig. 2b). This region contains a putative ETS Binding Site (EBS) and a putative AP1 binding site. These two sites are very highly conserved among Mouse, Human and Rabbit [36, 37] (Fig. S3c) and the EBS was previously described to be important in the *MMP13 gene* promoter activity [37]. In fact, the mutation of the EBS site in the MMP13-91 and MMP13-391 fragments reduced by half the transactivation by ETV4 (Fig. 2b). Moreover, AP1 synergised the ETV4 induced transactivation effect and AP1 site is required for this activity (Fig. S3a & b). We thereafter evidenced ETV4 recruitment to this chromatin region in TAC and MMT cells, by ChIP using an antibody directed against ETV4 and, as a positive control, we analysed the binding of ETV4 at the *Cyclin D2* promoter, as previously described [8] (Fig. 2c). Noteworthy, the same results were obtained in TAC and MMT cells that overexpress ETV4 (Fig. S2). Therefore, *MMP13* is a new ETV4 target gene in TAC and MMT mammary epithelial cells with AP1 as a likely co-activator.

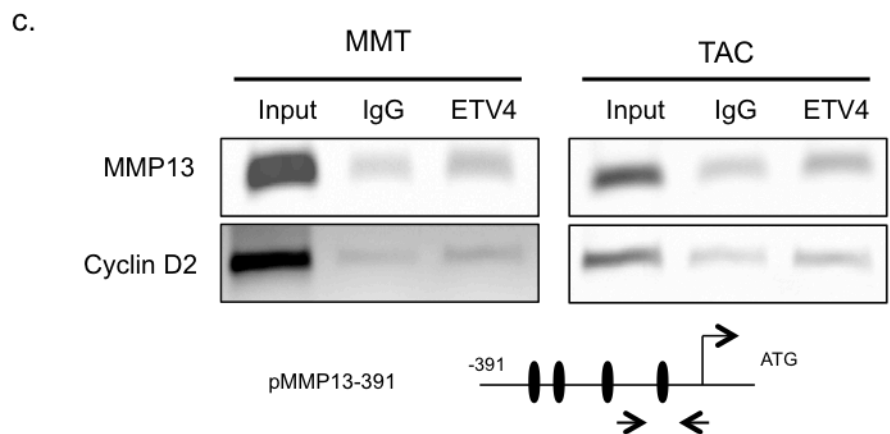
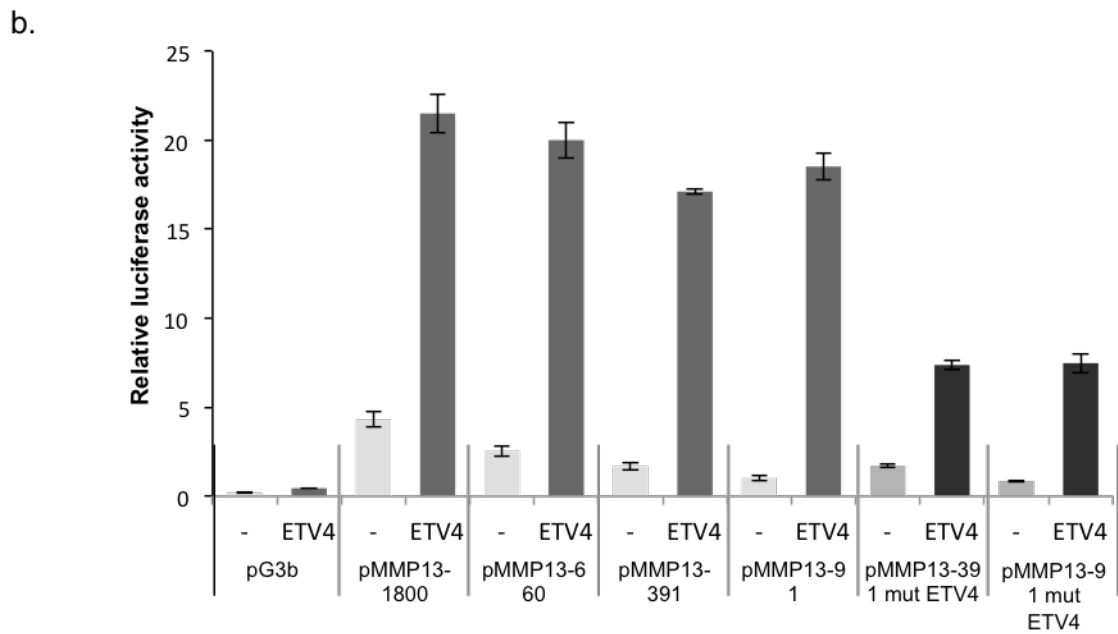
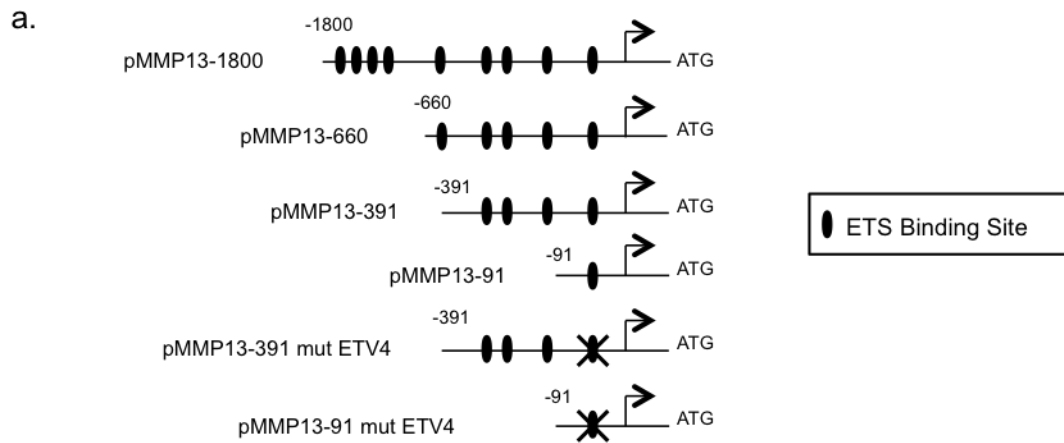



Fig. 2 *MMP13* gene is a new ETV4 target gene in mammary epithelial TAC and MMT cells. **a** Schematic representation of the mouse *MMP13* promoter fragments (pMMP13-1800 to pMMP13-91) cloned into a pG3bLuc reporter vector (pG3b). Position of the conserved ETS binding sites (EBS) is represented by .  : Transcription start site. : Mutation of the ETS site. **b** Histograms representing the relative luciferase activity measured for each promoter construct co-transfected into the TAC cell line with pTracer vector (-) or pTracer-ETV4 expression vector (ETV4). Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. **c** ChIP experiment. PCR detection of the *MMP13* promoter region after ETV4 immunoprecipitation in MMT (left panel) and TAC (right panel). Primers allowing the amplification of the proximal *MMP13* promoter region containing EBS are schematized in the lower panel; Cyclin D2 was used as positive control [8]. Immunoprecipitation with a non-relevant antibody (IgG) was used as negative control.

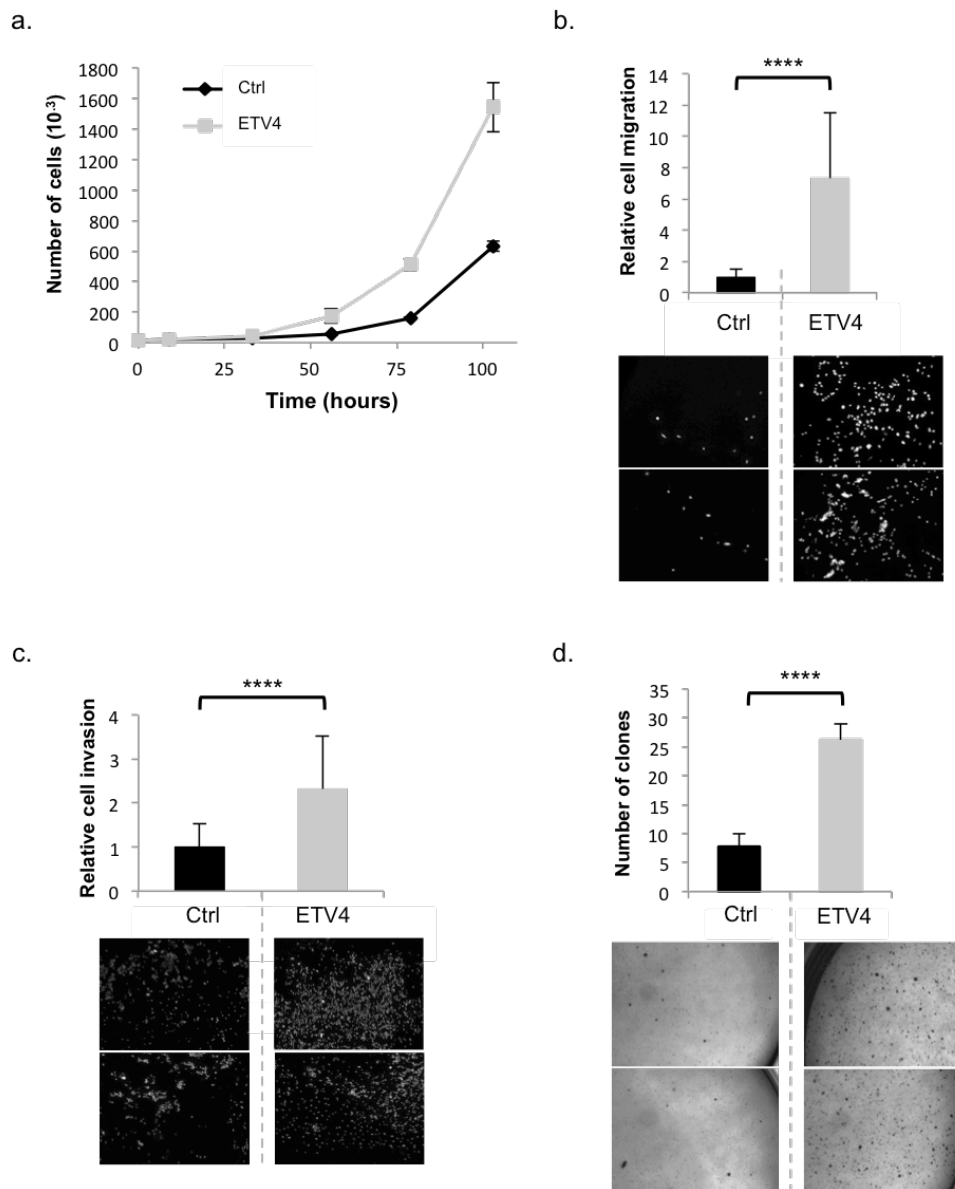


Fig. 3 ETV4 enhances proliferation, migration, invasion and anchorage-independent growth capacity of MMT mammary cancer cells. **a** MMT-Ctrl and MMT-ETV4 cells proliferation analysis by cell counting. The 2 charts represent the number of counted cells at 10, 35, 55, 80 and 100 hours. Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. **b** MMT-Ctrl and MMT-ETV4 cell migration analysis by Boyden chamber culture system. Histograms represent the relative number of counted cells that have migrated to the lower side. The number of MMT-Ctrl cells was arbitrarily = 1. Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. Statistical significance **** $P \leq 0.0001$. The lower panel depicts two representative pictures of each experiment. **c** MMT-Ctrl and MMT-ETV4 cells invasion analysis by Boyden chamber culture system coated with Matrigel®. Histogram represents the relative number of cells that have invaded to the lower side. The number of MMT-Ctrl cells was arbitrarily = 1. Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. Statistical significance **** $P \leq 0.0001$. The lower panel depicts two representative pictures of each experiment. **d** Anchorage independent growth. MMT-Ctrl *versus* MMT-ETV4 cells were cultured 10 days in soft agar. This histogram represents the number of clones counted for experimental point. Soft agar assays were conducted 3 times in triplicate. Magnification x5. Error bars indicate SD. Statistical significance **** $P \leq 0.0001$. The lower panel depicts two representative pictures of each experiment.

ETV4 enhances cell proliferation, migration, invasion and anchorage-independent growth

Proliferation and migration assays showed that MMT cells overexpressing ETV4 display enhanced proliferation and migration abilities as determined using a Boyden chamber (Fig. 3a & b). Similar results were obtained with or without treatment with Mitomycin C, an inhibitor of proliferation, indicating that effect on cell migration was not a consequence of an increase in the cell number (data not shown). Moreover, invasion assay in a Matrigel®-overlayed Boyden chamber and in a clonogenic assay revealed that ETV4 significantly increases invasion (Fig. 3c) and anchorage independent growth (Fig. 3d) *in vitro*. These data confirm that ETV4 is an important actor of the cellular abilities (proliferation, migration, invasion, anchorage independent growth) involved in the tumorigenic properties of the MMT cells.

MMP13 is a regulator of ETV4 dependent tumorigenic properties in mammary cancer cells

Next, we undertook to evaluate the role of MMP13 during MMT cell migration, invasion or clonogenicity by using MMT cells in which MMP13 is overexpressed (MMT-MMP13) or knocked-down by shRNA (MMT-shMMP13). MMP13 overexpression or repression was confirmed by qPCR (Fig. S4a & b), western blot (Fig. S4c) and/or zymography (Fig. S4d). As shown in Fig. 4, MMP13 overexpression increases cell proliferation (Fig. 4a), migration (Fig. 4c) and anchorage independent growth (Fig. 4e). As expected, MMP13 repression leads to a reduction in cell proliferation (Fig. 4b), cell migration (Fig. 4d) and anchorage independent cell growth (Fig. 4f). Thus, similar to ETV4, MMP13 is an inducer of cancer cell proliferation, migration and invasion.

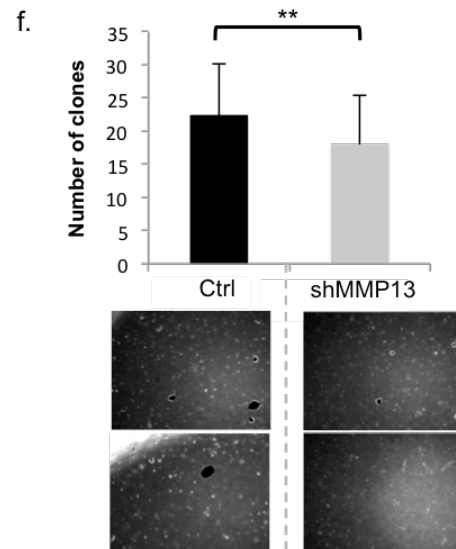
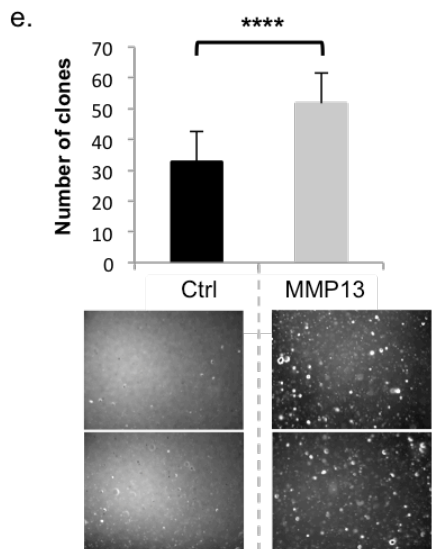
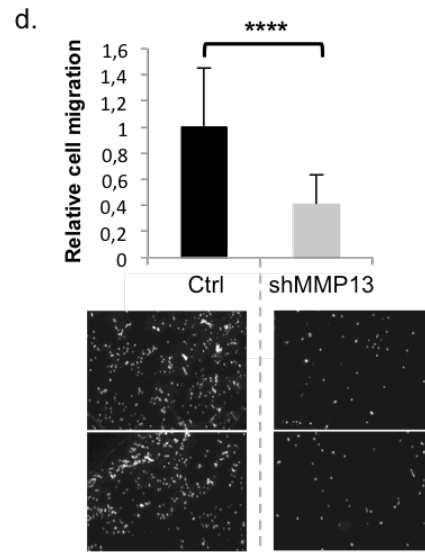
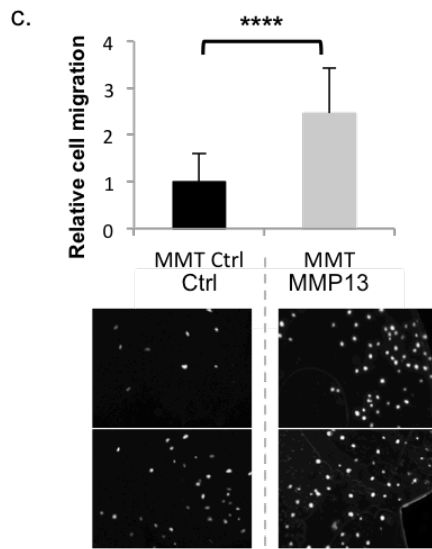
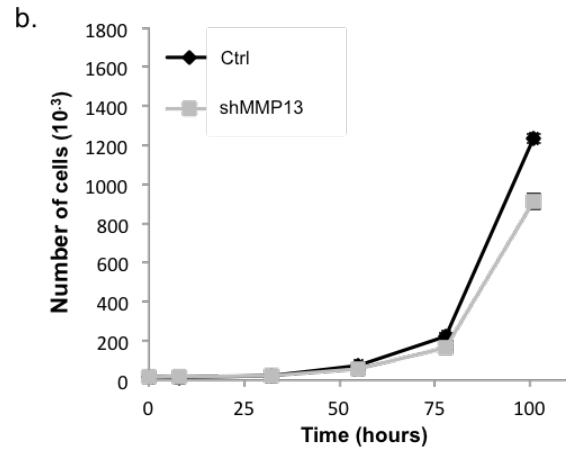
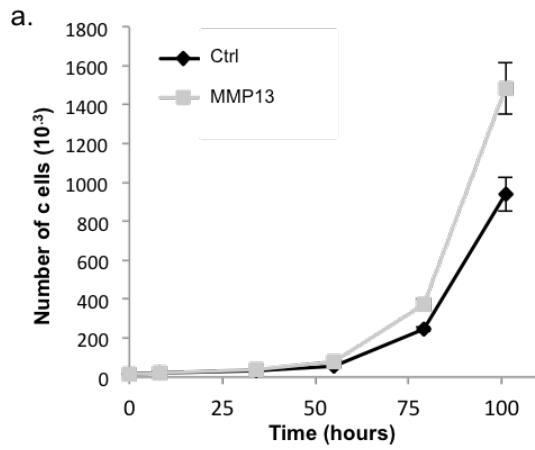


Fig. 4 MMP13 acts as ETV4 in the modification of tumorigenic properties of MMT cells. **a/b** MMT-Ctrl and MMT-MMP13 (**a**) or MMT-shMMP13 (**b**) cell proliferation analysis by cell counting. The 2 charts represent the number of counted cells at 10, 35, 55, 80 and 100 hours. Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. **c/d** MMT-Ctrl and MMT-MMP13 (**c**) or MMT-shMMP13 (**d**) cells migration analysis by Boyden chamber culture system. Histogram represents the relative number of counted cells that have migrated to the lower side. The number of MMT-Ctrl cells was arbitrarily = 1. Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. Statistical significance **** $P \leq 0.0001$. The lower panel depicts two representative pictures of each experiment. **e/f** Anchorage independent growth. MMT-Ctrl *versus* MMT-MMP13 (**e**) or MMT-shMMP13 (**f**) cells were cultured 10 days in soft agar. This histogram represents the number of clones counted for experimental point. Soft agar assays were conducted 3 times in triplicate. Magnification x5. Error bars indicate SD. Statistical significance **** $P \leq 0.0001$; ** $P \leq 0.01$. The lower panel depicts two representative pictures of each experiment.

In order to determine if MMP13 participates in ETV4 regulated cancer cell properties, we repressed MMP13 in the ETV4-overexpressing MMT cell line. To that end, we established the MMT-ETV4-shMMP13 cell line which expresses an shRNA construct allowing for a significant reduction in *MMP13* mRNA and protein expressions and subsequently a reduction in MMP13 metalloprotease activity (Fig. 4a, b & c). Importantly, as determined by qPCR and western blot, ETV4 mRNA and protein expressions remain unchanged in these cells (Fig. S5a & b). The repression of MMP13 in the ETV4-overexpressing MMT cells drastically decreases their proliferation (by 70% 100h after the beginning of the experiment; (Fig. 5c)) and significantly reduces cell migration (2-fold decrease compared to ETV4 control (Fig. 5d)), cell invasion (2-fold decrease compared to ETV4 control (Fig. 5e)) and anchorage independent growth (2.5-fold increase compared to ETV4 control (Fig. 5f)). The latter was confirmed by transient transfection of a siRNA directed against MMP13 in the MMT-ETV4 overexpressing cells which leads to a 50% decrease in MMP13 expression (Fig. S6a) and a significant reduction in the anchorage independent cell growth (Fig. S3b). Altogether, these results show that MMP13 acts as a relay of ETV4 to control mammary cancer cells tumorigenic abilities.

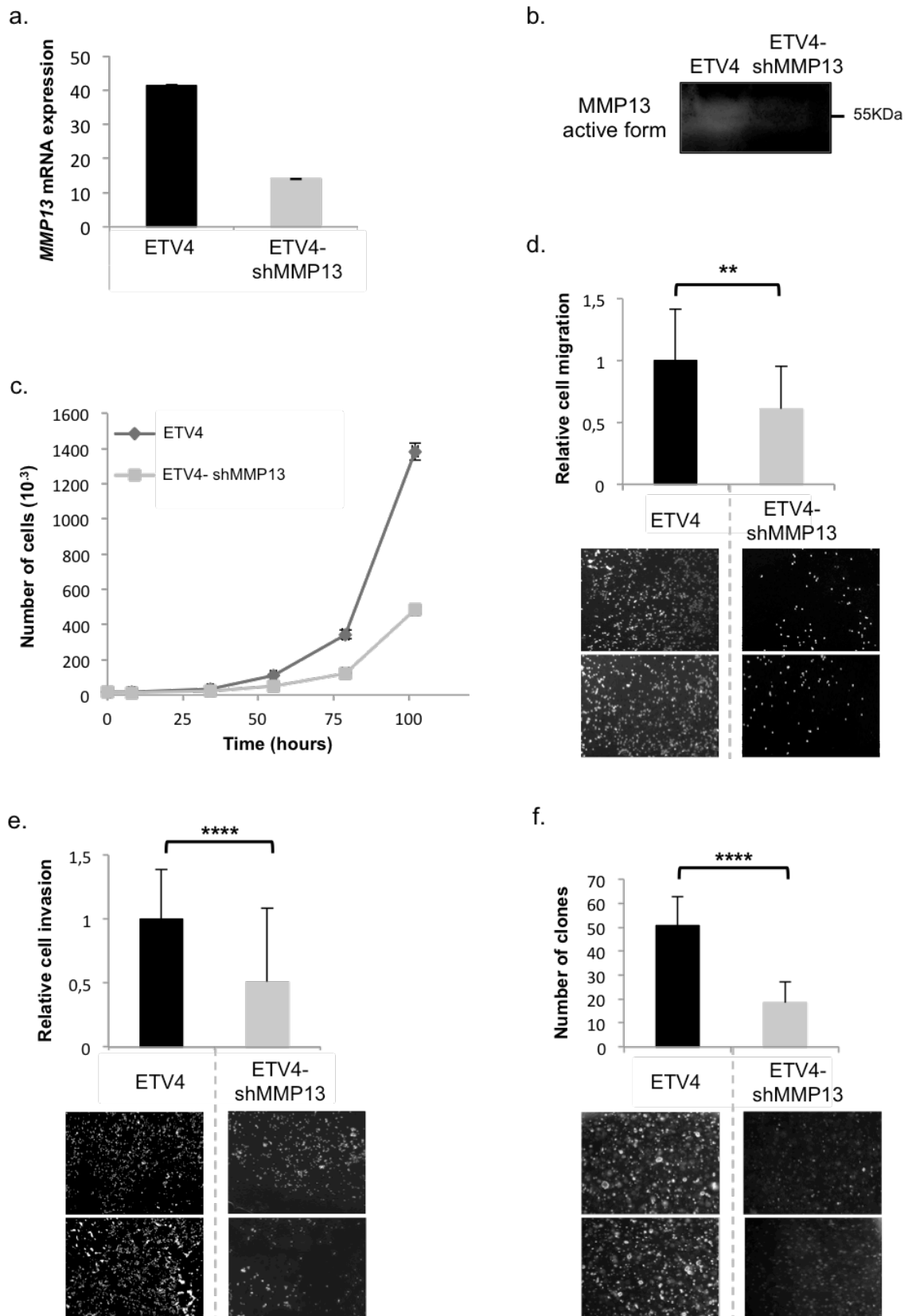


Fig. 5 MMP13 acts as a regulator of ETV4 tumorigenic-induced response in (MMT) mammary epithelial cells. **a** Relative *MMP13* mRNA expression in the MMT-ETV4 and MMT-ETV4-shMMP13 cells determined by real-time PCR and normalized to *Cyclophilin A* levels. mRNA expression in MMT-ETV4 cells was arbitrarily = 1. Error bars indicate SD. **b** Zymography analysis of MMP13 protein activity (55 kDa) issue from the supernatant of MMT-ETV4 and MMT-ETV4-shMMP13 cells. **c** MMT-ETV4 and MMT-ETV4-shMMP13 cell proliferation analysis by cell counting. The 2 charts represent the number of counted cells at 10, 35, 55, 80 and 100 hours. Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. **d** MMT-ETV4 and MMT-ETV4-shMMP13 cell migration analysis by Boyden chamber culture system. Histogram represents the relative number of counted cells that have migrated to the lower side. The number of MMT-ETV4 cells was arbitrarily = 1. Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. Statistical significance $**P \leq 0.01$. The lower panel depicts two representative pictures of each experiment. **e** MMT-ETV4 and MMT-ETV4-shMMP13 cell invasion analysis by Boyden chamber culture system coated with Matrigel®. Histograms represent the relative number of counted cells that have invaded to the lower side. The number of MMT-ETV4 cells was arbitrarily = 1. Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. Statistical significance $****P \leq 0.0001$. The lower panel depicts two representative pictures of each experiment. **f** Anchorage independent growth. MMT-ETV4 *versus* MMT-ETV4-shMMP13 cells were cultured 10 days in soft agar. This histogram represents the number of clones counted for experimental point. Soft agar assays were conducted 3 times in triplicate. Magnification x5.

MMP13 silencing inhibits the tumorigenic activity of ETV4 *in vivo*

To investigate whether MMP13 expression is necessary for the induction of tumors by ETV4 *in vivo*, MMT-ETV4-shMMP13 and MMT-ETV4-control cells were injected in the inguinal flank of immuno-compromised mice and tumor growth was evaluated daily (Fig. 6). Three days post-injection, all of the MMT-ETV4 control cells injected mice showed a palpable tumor whereas none could be detected at this stage in the MMT-ETV4-shMMP13 cells injected group. By day 6 post-injections all MMP13 injected mice developed palpable tumors. However a daily measure of tumor size over the course of 10 more days (until animal sacrifice) indicate that MMP13 expression is required for optimal tumor growth as shRNA expressing ETV4 cells are on average 2-fold smaller than controls. Therefore, MMP13 is a mediator of ETV4 tumorigenic promoting activity in MMT cancer cells.

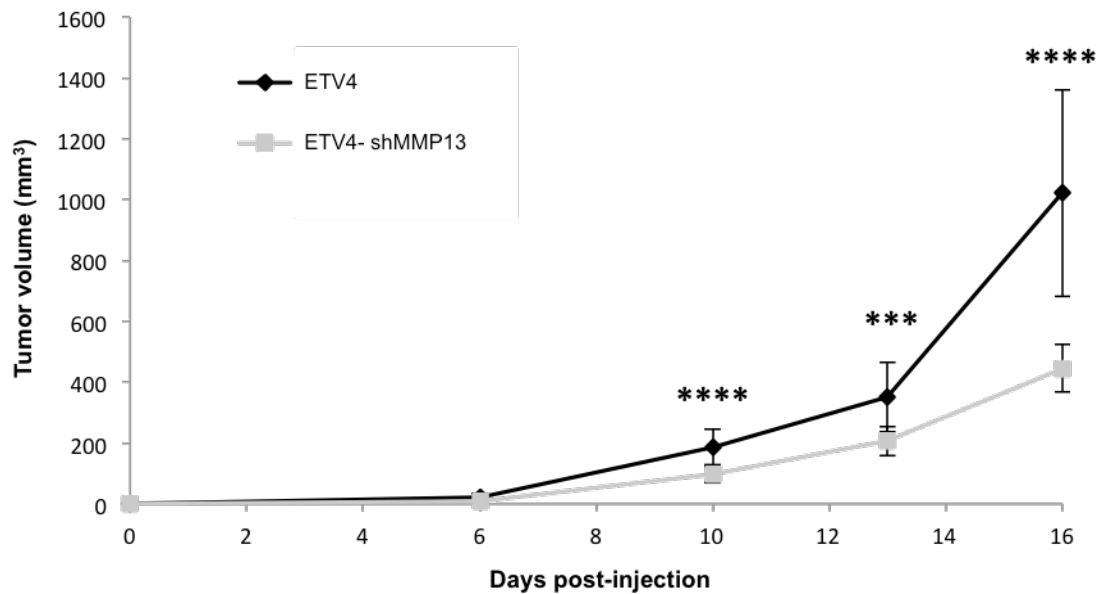


Fig. 6 MMP13 reinforces the tumorigenic activity of ETV4 *in vivo*. *In vivo* tumor growth assay. Tumor presence was determined by palpation of the mammary gland every week. The graph represents the volume of tumor (mm³) versus time in weeks after xenograft of MMT-ETV4 (n=14) versus MMT-ETV4-shMMP13 (n=15) cells into the fat pad of the mammary gland of SCID-deficient mice. Three independent experiments were conducted. Statistical significance ***P≤ 0.001 and ****P≤ 0.0001.

MMP13 and ETV4 expression in breast tumors is associated with a poor prognosis

In order to corroborate the relevance of the phenotypic and mouse *in vivo* data and to explore the link between ETV4 and MMP13 in human breast cancer, we assessed *MMP13* and *ETV4* mRNA expression levels in a series of 456 primary unilateral invasive primary breast tumors from patients with known clinical and pathological status and long-term outcome. We used a log-rank test to identify relations between MFS (Metastasis-free survival) and *MMP13* and/or *ETV4* expression. Combined analysis (as described in the “Patients and Samples” section of Methods) of *MMP13* and *ETV4* mRNA expression level defined three separate prognostic groups of 82 (Low-ETV4), 255 (High-ETV4/Low-MMP13), and 119 patients (High-ETV4/High-MMP13) with significantly different survivals (p=0.000041) (Fig. 7). The patients with the poorest prognosis were observed in the subgroup of 26.1% (119/456) patients characterized by association of high *MMP13* and high *ETV4* mRNA expression levels.

We sought links between the three prognostic groups and classical clinicopathological

parameters in breast cancer (Table 1). Using HR (ER α and PR) and ERBB2 status, we also subdivided the total population (n=456) into four breast cancer molecular subtypes: HR+/ERBB2+ (n=54), HR+/ERBB2- (n=289), HR-/ERBB2+ (n=45) and HR-/ERBB2- (n=68). High *MMP13* and *ETV4* mRNA expression levels were associated with negative ER status (p=0.00067) and the HR-/ERBB2+ subtype (p=0.0015), two parameters associated with breast cancer aggressiveness (Table 1). We did not observe correlation between the three prognostic groups and mutations of *PIK3CA* that is the most frequently mutated oncogene in breast cancer (p=0.96) as well as mRNA level of the *MKI67* gene that encodes for the proliferation-related Ki-67 antigen (p=0.073).

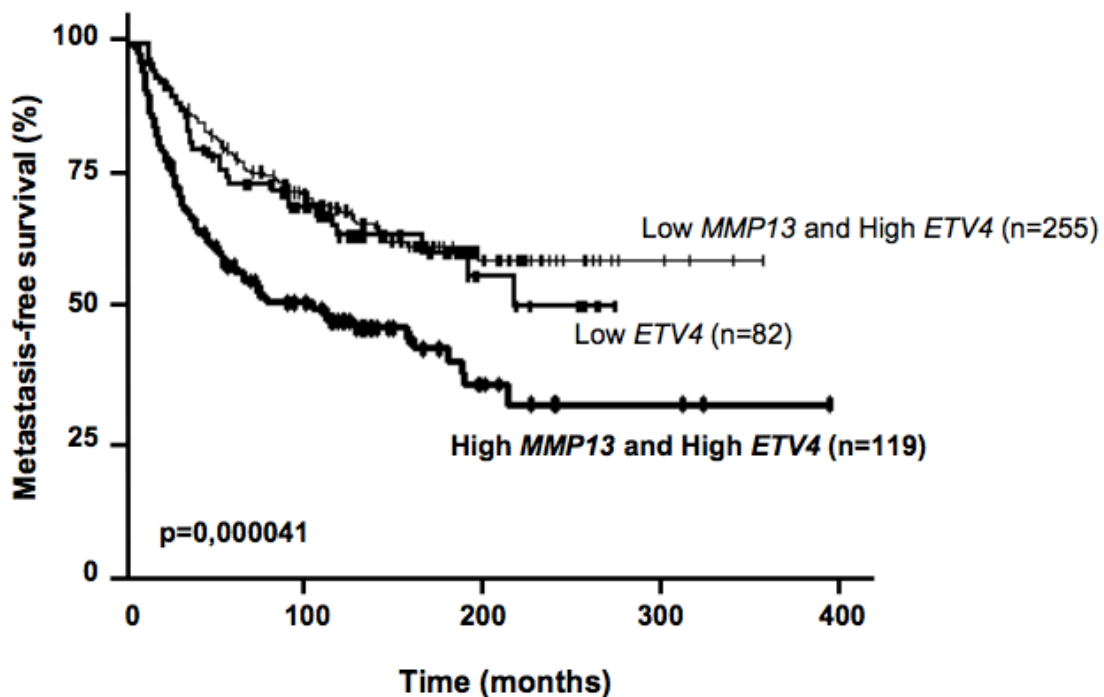


Fig. 7 *MMP13* and *ETV4* are associated to a poor prognosis in breast cancer. Metastasis-free survival (MFS) curves for breast-tumor patients according to Low-*ETV4* (n=82), High-*ETV4* and Low-*MMP13* (n=255) or High-*ETV4* and High-*MMP13* (n=119) mRNA levels. Statistical significance ****P \leq 0.0001.

Table 1: Relationship between MMP13 and ETV4 transcripts levels and classical clinical biological parameters in the series of 456 breast cancers. Numbers represent the part of the 456 patients in each condition (age, SBR histological grade, etc) and in regard with the expression level group (Low ETV4/High ETV4-Low MMP13/High ETV4-High MMP13). For these 3 groups, percentages in bracket correspond to the proportion of patients in the group (82 for Low ETV4; 255 for High ETV4-Low MMP13; 119 for High ETV4-High MMP13).

	Total population (%)	Number of patients (%)			p^a
		Low ETV4	High ETV4-Low MMP13	High ETV4-High MMP13	
<i>Total</i>	456 (100.0)	82 (18.0)	255 (55.9)	119 (26.1)	
<i>Age</i>					
≤50	98 (21.5)	10 (12.2)	60 (23.5)	28 (23.5)	0.075 (NS)
>50	358 (78.5)	72 (87.8)	195 (76.5)	91 (76.5)	
<i>SBR histological grade</i> ^{b,c}					
I	58 (13.0)	10 (12.3)	37 (15.0)	11 (9.2)	0.24 (NS)
II	229 (51.2)	48 (59.3)	122 (49.4)	59 (49.6)	
III	160 (35.8)	23 (28.4)	88 (35.6)	49 (41.2)	
<i>Lymph node status</i> ^d					
0	119 (26.1)	21 (25.9)	67 (26.5)	31 (26.3)	0.085 (NS)
1-3	237 (52.1)	37 (45.7)	144 (56.9)	56 (47.5)	
>3	96 (21.8)	23 (28.4)	42 (16.6)	31 (26.3)	
<i>Macroscopic tumor size</i> ^e					
≤25mm	223 (49.8)	40 (50.0)	132 (52.4)	51 (44.0)	0.32 (NS)
>25mm	225 (50.2)	40 (50.0)	120 (47.6)	65 (56.0)	
<i>ERα status</i>					
Negative	118 (25.9)	9 (11.0)	67 (26.3)	42 (35.3)	0.00067
Positive	338 (74.1)	73 (89.0)	188 (73.7)	77 (64.7)	
<i>PR status</i>					
Negative	194 (42.5)	31 (37.8)	103 (40.4)	60 (50.4)	0.12 (NS)
Positive	262 (57.5)	51 (62.2)	152 (59.6)	59 (49.6)	
<i>ERBB2 status</i>					
Negative	357 (78.3)	71 (86.6)	200 (78.4)	86 (72.3)	0.052 (NS)
Positive	99 (21.7)	11 (13.4)	55 (21.6)	33 (27.7)	
<i>Molecular subtypes</i>					
RH- ERBB2-	68 (14.9)	8 (9.8)	41 (16.1)	19 (16.0)	0.0015
RH- ERBB2+	45 (9.9)	1 (1.2)	22 (8.6)	22 (18.5)	
RH+ ERBB2-	289 (63.4)	63 (76.8)	159 (62.4)	67 (56.3)	
RH+ ERBB2+	54 (11.8)	10 (12.2)	33 (12.9)	11 (9.2)	
<i>PIK3CA mutation status</i>					
wild type	307 (67.3)	56 (68.3)	172 (67.5)	79 (66.4)	0.96 (NS)
mutated	149 (32.7)	26 (31.7)	83 (32.5)	40 (33.6)	
<i>MKI67 mRNA expression</i>					
median	12.5 (0.80-117)	11.7 (1.74-117)	12.1 (0.80-94.5)	13.6 (2.1-58.5)	0.073 (NS)

Abbreviations: ERα: oestrogen receptor alpha; PR: progesterone receptor; ERBB2: human epidermal growth factor receptor 2; HR: hormone receptor; PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; MKI67: marker of proliferation Ki-67. The bold values are statistically significant (p -value<0.05).

^a χ^2 Test; ^b Scarff Bloom Richardson classification; ^c Information available for 447 patients; ^d Information available for 452 patients; ^e Information available for 448 patients.

Discussion

ETV4 is an ETS transcription factor involved in important steps of organ development as in mammary gland morphogenesis. ETV4 is also a significant mediator of tumorigenesis through the activation of several downstream pathways that are associated with migration and invasion. ETV4 is overexpressed in breast tumors and is associated with distant metastasis and poor prognosis [1, 5, 38, 39]. However, the cellular and molecular events regulated by this factor remain poorly understood. We previously identified new target genes implicated in phenotypic cellular modulation induced in mammary tumorigenesis as Bax or Cyclin D2 [8, 12]. We also described that ETV4 overexpression in a mammary epithelial cell line confers tumorigenic like properties as well as an increased ability to grow [32] and that ETV4 repression reduces tumorigenesis in mammary cancer cells [16].

In this work, we demonstrate that ETV4 enhances tumorigenic properties of mammary epithelial cancer cells (MMT cells) and that MMP13, as a new ETV4 target genes, relays these effects. ETV4 is now well-known to be involved in events participating to tumor development and progression. For example, repression of ETV4 in colorectal carcinoma cells significantly impairs their invasive capacity [40] and several EMT markers and MMPs were down-regulated in shETV4 expressing cells. In the same way, in gastric adenocarcinoma cell lines, ETV4 increases MMP1 and MMP7 expression and stimulates invasion *in vitro* [41]; ectopic overexpression of ETV4 in non-metastatic human breast cancer cells increases their invasiveness and their metastasis potential in nude mice [42]. Therefore, deregulated metalloprotease expression and/or activity have been often associated with ETV4 tumorigenic properties [1, 43]. However, the precise molecular mechanism by which they act during mammary tumorigenesis is currently unknown.

The MMT cells, a mammary tumorigenic cell model, have been previously used to explore the functional involvement of ETV4 in their tumorigenic properties [16]. ETV4 down-regulation in MMT cells leads to a decrease in their forming tumor abilities. Similarly, we show here that ETV4 overexpression in MMT cells promotes cell proliferation, migration, invasion and anchorage-independent growth, demonstrating that ETV4 is an actor of tumorigenic development, as previously described.

Among the well-known MMPs associated to tumorigenic occurrences, MMP13 is a metalloprotease playing an important role in tissue remodelling during fetal and subsequent post-natal bone development [44, 45]. Nevertheless, MMP13 was first identified in a breast tumor library [17] and an increasing number of data demonstrate its role in tumorigenesis and particularly in breast cancer [22, 24, 27, 46, 47]. In accordance, we initially described by a transcriptomic analysis a regulation of MMP13 expression by ETV4 in a mammary epithelial cell line [16].

To shed light into the functional relevance of the ETV4-MMP13 interplay, we explored MMP13 expression in different contexts of murine (TAC, MMT) or human (MCF10A) ETV4 expressing cells and analyzed the regulation of the *MMP13* gene by ETV4. MMP13 expression and activity are positively correlated with ETV4 expression. Moreover, ETV4 is a trans-activator of the *MMP13* gene promoter since we identified a 91pb minimal promoter that contains putative ETS and AP1 binding sites. We detected the binding of ETV4 to this chromatin region, the cooperation between ETV4 and AP1 to enhance the transactivation effect of ETV4 and the importance of the proximal EBS and the requirement of the AP1 binding motif a known co-factor of various ETS proteins [42, 48–51]. This synergistic action between AP1 and ETV4 in the MMP13 regulation could emphasise the role of MMP13 in the ETV4-dependent tumorigenic effects and serve as a potential target to treat ETV4 driven diseases.

Given that MMP are key actors of the tumorigenic and metastatic processes, we evaluated the influence of MMP13 on phenotypic modification of mammary cancer cells and in a context of ETV4 overexpression. On the one hand, MMP13 overexpression is able to slightly increase cell proliferation, migration and anchorage-independent growth, and on the other hand, MMP13 repression has the reverse effect. In fact, MMP13 has the same behaviour as ETV4 in these cancer cells but is less potent. These are relevant findings considering that MMP13 is overexpressed in a variety of malignant tumors as in breast carcinomas [20, 52, 53] and is implicated in bone metastasis in breast cancer [23, 54, 55].

In order to determine if MMP13 is a relay of ETV4 tumorigenic activity, we compared the behaviour of MMT cells overexpressing ETV4 and at the same time have a downregulation of MMP13 expression and activity. These ETV4-

overexpressing/MMP13-silencing cells show a significant decrease of their proliferation, migration and anchorage-independent growth rate. Furthermore, we provide evidence that the silencing of MMP13 inhibits ETV4-induced tumor formation in mice, confirming the *in vitro* data and highlighting the importance of MMP13 activity in ETV4 tumorigenic functions.

Even though numerous data suggested the importance of MMP13 in tumor progression and metastasis development, by describing its up- or down-regulation, very few of them analyzed the impact of these modulations. One of them, by using a similar approach on the role of Pit1, a POU class 1 homeobox 1 transcription factor, revealed that it regulates MMP13 expression in human breast cancer cells and that MMP13 knock-down blocks cancer cell invasion into the lungs, suggesting that MMP13 is a mediator of Pit1 induction of breast cancer lung metastasis [56]. These data underline the importance of MMP13 in the mediation of tumorigenesis and invasiveness and corroborate our findings.

The MMT cell model was considered to be a useful model to realize the *in vitro* and *in vivo* phenotypic assays according to the previously data and characterization we obtained regarding their ability to form tumors in immunodeficient mice [8, 16]. Nevertheless, to decipher the relevance of ETV4 and MMP13 association in breast cancer, we assessed *MMP13* and *ETV4* mRNA expression levels in a series of 456 breast cancer samples. By combining *MMP13* and *ETV4* mRNA expression status, we identified three distinct prognostic groups with significantly different metastasis-free survival (MFS) curves ($p=0.000041$) (Fig. 7). These data revealed that the tumor group overexpressing both ETV4 and MMP13, are correlated with the poorest prognosis. ETV4 overexpression is associated with increased metastatic risk and poor patient survival in Triple Negative Breast Cancers (TNBC) distant metastasis and poor survival of the patients [57]. Similarly, high levels of MMP13 expression are associated with high tumor aggressiveness and poor survival rate [58]. Thus, these data corroborate our findings and in combination, underline the importance of these two factors, ETV4 and its relay MMP13, in mammary tumorigenesis. Further investigations should be done to evaluate their potential as prognosis and diagnosis markers as well as potential therapeutic targets to prevent or treat the disease.

Conclusion

The ETV4 transcription factor is involved in tumorigenesis and metastatic process, particularly in breast cancer, a heterogeneous illness with different subtypes. Here, we showed that ETV4 promotes proliferation, migration, invasion and anchorage independent growth of mammary tumorigenic MMT cells. In parallel, we identified MMP13, an extracellular metalloprotease, as a new ETV4 target gene. By overexpressing or repressing MMP13 expression, we showed that this metalloprotease contributes to the ETV4-induced proliferation, migration and clonogenicity capacities. Thus, MMP13 acts as a relay of ETV4 in its functional role in the mammary epithelial tumorigenic cells, *in vitro* as well as in tumor development in animal models. Finally, we showed that ETV4 and MMP13 co- overexpression is correlated with poor prognosis in breast cancer. Taken together, these data highlighted the role of these actors in mammary tumorigenesis and breast cancer progression.

Méthodes

Cell culture and reagents

TAC murine mammary epithelial cell line [32, 33] was cultured on collagen-coated plates in high glucose DMEM (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (110 IU/ml), and streptomycin (110 µg/ml). Wild-type mouse mammary tumor (MMT) cell line (ATCC® CCL-51™) was cultured in DMEM (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, Invitrogen), gentamycin (100 IU/ml) and non-essential amino acids (Gibco, Invitrogen). MCF-10A cell line (ATCC® CRL-10317™) was propagated in DMEM F/12 medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 5% horse serum, 20 ng/ml epidermal growth factor, 100 ng/ml cholera toxin, 500 ng/ml hydrocortisone and 0.01 mg/ml insulin.

Plasmids

pTracer-ETV4 and pLPCX-ETV4-V5 plasmids were described previously [8, 12, 32]. pMX- MMP13 was generated by PCR amplification of the mouse *MMP13* cDNA and cloned into the pMX-puro retroviral vector. pRS-shMMP13 retroviral plasmid was kindly provided by S. Meierjohann [34]. pGL3 constructions containing different part of the *MMP13* promoter were kindly provided by J.M. Davidson [35]. Mutations to proximal

ETS and AP-1 binding site in MMP13 promoter were made using Quick Change®II XL Site Directed Mutagenesis Kit. The proximal ETS site was changed from **GGAA** to **CCAA** and the proximal AP-1 site was changed from **TGACT** to **GCACT**. The sequence of all promoter constructs was verified by DNA sequencing.

Retroviral infections and stable selection

3×10^6 HEK 293 GP cells were transfected with pLPCX, pMX or pRS retroviral construction and 1.2×10^6 MMT cells or 1×10^6 TAC cells per 100-mm dish were incubated with supernatant as previously described [16]. The selection procedure started the next day using the Puromycin (Life Technologies).

RNA interference

MMP13 and control oligonucleotides used for RNA interference have been purchased from Thermofisher (SMARTpool ON-Target plus *MMP13* and *control* siRNA). 3.5×10^5 MMT cells were seeded in 6-well plates for reverse transfection with 75 pmole of each siRNA and 5 μ l of Lipofectamine® 2000 (Life Technologies) as recommended by the manufacturer. Cells were incubated for another 24 hours under standard conditions before being assayed.

Cell proliferation assays

1.5×10^4 cells were seeded in 6-wells plates. The cells were trypsinized and counted after 10, 34, 55, 80 and 100 hours using a Tali Image-Based Cytometer (life technologies). Each time point was counted three times.

Anchorage-independent growth

3×10^5 cells were seeded in 500 μ l of medium mixed with 1 ml of 0.35% agar in growth medium (MEM with 10% FBS). The cell suspension was cast onto 12-well plates with 500 μ l of 0.65% agar in growth medium, which was used as an underlay. Growth medium was added onto the agar layer and changed weekly. Colonies were photographed after 10 days using a light microscope.

Cell migration assays

Boyden chamber cell migration was assayed using a cell culture-chamber-insert system (BD Biosciences) with an 8µm polyethylene terephthalate (PET) membrane. 4×10^4 cells were seeded on the upper chamber in DMEM 10% FBS. The same medium was added in the lower chamber. After 18 hours, cells that did not cross the membrane were scraped off the upper side of the membrane with a cotton swab. Cells that had migrated to the lower side were fixed with methanol at -20°C and stained with Hoechst 33258 (Sigma). The membrane was excised from its support and mounted on a glass slide with Glycergel (DAKO).

Cell invasion assays

Boyden chamber cell invasion was assayed using a cell culture-chamber-insert system (Corning® BioCoat™ Growth Factor Reduced Matrigel® Invasion Chamber) with an 8µm polyethylene terephthalate (PET) membrane coated with Matrigel®. 8×10^4 cells were seeded on the upper chamber in DMEM 0% FBS and 0.1% BSA. DMEM 5% FBS was added in the lower chamber. After 36 hours, cells that did not cross the membrane were scraped off the upper side of the membrane with a cotton swab. Cells that had migrated to the lower side were fixed with methanol at -20°C and stained with Hoechst 33258 (Sigma). The membrane was excised from its support and mounted on a glass slide with Glycergel (DAKO).

Zymography

The gelatin zymography was used to determine the activity of MMP13. The medium was collected and the cells were removed by centrifugation. Then, 25µl of sample with 50 µl of buffer load was loaded onto a 10% precast polyacrylamide gel with gelatin (BioRad). After electrophoresis, the gels were renatured by soaking for 30 min at room temperature in 2.5% Triton X-100. The gels were then incubated in a developing buffer (50mM Tris, 200mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.02% Brij-35, pH 7.5) overnight at 37°C . The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and de-stained in demineralized water. The transparent bands of gelatinolytic activity were visualized as clear bands against the blue-stained gelatin background.

Tumor xenografts

MMT pLPCX-ETV4-pRS and MMT pLPCX-ETV4-pRS-shMMP13 cells were trypsinized, resuspended in PBS (5×10^6 cells/ml). 5×10^5 cells were injected subcutaneously into 6-7 weeks old female SCID-deficient mice. Tumor size was assessed by measuring the length and width of tumor every 3-4 days. Tumor volume was estimated using the formula: $(\text{length} \times \text{width}^2) \div 2$. Results are expressed as the mean of tumor volume for each experimental group. All animal procedures were conducted with approval of and in compliance with the Nord Pas de Calais Regional for Ethical Animal Care and Use Committee (CEEA-003243.01).

Western blotting

Cells were lysed in a 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40 (v/v), 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10g/ml leupeptin, and 10g/ml aprotinin buffer. After scraping, cellular debris was removed by centrifugation at 10,000g for 5 min. Protein concentrations were determined by the Bradford assay. 50µg of whole cell extracts were separated in precast gels (Mini-PROTEAN[®] TGX Stain-Free™ BioRad) gel and transferred onto nitrocellulose membrane (Trans-Blot Turbo transfer, BioRad). After blocking with Tris-buffered saline, 0.1% Tween, and 3% bovine serum albumin, the membrane was probed with the primary and the secondary antibodies. The enzymatic activity was detected using a chemiluminescent-enhanced kit (Amersham). Equal transfer of proteins from the gel was controlled by Stain Free system of the gel and the membrane and by using an anti-GAPDH antibody. We used anti-ETV4 1/500 (N3C3-GTX114393 Genetex), anti-MMP13 (18165-1-AP Proreintech), anti-GAPDH (6C5-sc-32233, Santa Cruz Biotechnology) and secondary antibodies anti-mouse or anti-rabbit coupled to horseradish peroxidase (Amersham).

RNA extraction, retro-transcription and real-time PCR (qPCR)

Total RNA was extracted using the RNAeasy minikit according to the manufacturer's instructions (Qiagen). 1 µg of total RNA was retro-transcribed using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies). Specific gene expression was determined by real-time PCR using the Fast SYBR[®] green master mix (Life

Technologies) and the Mx3005P qPCR system (Agilent Technologies). The results were analyzed with the Δ - Δ Ct method normalized to *Cyclophilin A* and compared with a comparator sample. The nucleotide sequences of the primers used were as follows: MMP13-F (5'-TCCCTGCCCTTCCCTATGG-3') and MMP13-R (5'-CTCGGAGCCTGTCAACTGTGG-3') for *MMP13* gene (PCR product of 173bp), ETV4-F (5'-CCGCTCGCTGCGATACTATT-3') and ETV4-R (5'-CGGTCAAACCTCAGCCTTCAGA-3') for *ETV4* gene (PCR product of 162bp), PPIA-F (5'-GGGAACCGTTTGTGTTTGGT-3') and PPIA-R (5'-TGTGCCAGGGTGGTGACTTT-3') for *PPIA* gene.

Luciferase reporter assays

3×10^4 TAC cells were seeded in 12-well plates and transfected with ExGen-500 (Euromedex) and 250 ng of DNA (200 ng of expression vector; 25 ng of firefly luciferase reporter vector; 25 ng of the renilla luciferase pRL-TK (Promega), according to the protocol previously described [12].

Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP)

TAC pLNCX, pLNCX-ETV4 and MMT pLPCX, pLPCX ETV4 were fixed, lysed and used for Chromatin Immuno-Precipitation with an anti-ETV4 IgG (sc-113x, Santa Cruz Biotechnology) or a non-relevant antibody Normal Rabbit IgG (sc-2027), as described in the supplementary data. Detection of specific DNA regions was performed by PCR using *MMP13* gene promoter region and *Cyclin D2* gene promoter region. The nucleotide sequences of the primers used were as follows: MMP13-F (5'-TCCATTTCCCTCAGATTCTGCCAC-3') and MMP13-R (5'-TCTCTCCTTCCCAGGGCAAGCAT-3') for *MMP13* gene (PCR product of 164 bp), and Cyclin D2-F (5'-GAGAGGGAGGGAAAGATTGAAAGGA-3') and Cyclin D2-R (5'-AGGTGGGCGAGCGGAGCCTCAAG-3') for *Cyclin D2* gene (PCR product of 212 bp).

Patients and samples for MMP13 and ETV4 expressions

Samples of 456 primary unilateral invasive breast tumors excised from women managed at Curie Institute-René Huguenin Hospital (Saint-Cloud, France) from 1978 to 2008 have been analyzed. Immediately after biopsy or surgery, the tumor samples were stored in liquid nitrogen until mRNA extraction. Tumor samples were considered suitable for our

study if the proportion of tumor cells exceeded 70%. All patients (mean age 61.7 years, range 31–91 years) met the following criteria: primary unilateral non-metastatic breast carcinoma for which complete clinical, histological and biological data were available; no radiotherapy or chemotherapy before surgery; and full follow-up at Curie Institute-René Huguenin Hospital.

Treatment consisted of modified radical mastectomy in 278 cases (63.6%) and breast-conserving surgery plus locoregional radiotherapy in 159 cases (36.4%) (information available for only 437 cases). The patients had a physical examination and routine chest radiography every 3 months for 2 years, then annually. Mammograms were done annually. Adjuvant therapy was administered to 369 patients, consisting of chemotherapy alone in 91 cases, hormone therapy alone in 176 cases and both treatments in 102 cases. The histological type and the number of positive axillary nodes were established at the time of surgery. The malignancy of infiltrating carcinomas was scored according to Scarff Bloom Richardson's (SBR) histoprognostic system. Hormone receptor (HR) [estrogen receptor (ER α), progesterone receptor (PR)] and human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2) status were determined at the protein level by using biochemical methods (dextran-coated charcoal method, enzyme immunoassay or immunohistochemistry) and confirmed by qPCR assays as described in supplementary data.

The population was divided into four groups according to HR (ER α and PR) and ERBB2 status, as follows: two luminal subtypes [HR+ (ER α + or PR+)/ERBB2+ (n = 54)] and [HR+ (ER α + or PR+)/ERBB2- (n = 289)]; an ERBB2+ subtype [HR- (ER α - and PR-)/ERBB2+ (n = 45)] and a triple negative subtype [HR- (ER α - and PR-)/ERBB2- (n = 68)].

The median follow-up is 8.9 years (range 130 days to 33.2 years), 181 patients had a metastasis. Clinicopathological characteristics of patients in relation to metastatic free survival (MFS) are provided in Table S1.

Ten specimens of adjacent normal breast tissue from breast cancer patients or normal breast tissue from women undergoing cosmetic breast surgery were used as sources of normal mRNA.

Statistical analysis

For *in vitro* and *in vivo* analysis: all values are expressed the means of triplicate sample

+/- SE. Data were analyzed using unpaired t-test (****, $P < 0.0001$; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$). For human statistical analysis: relationships between mRNA expression of genes and clinical parameters were identified using nonparametric tests, the Chi2 nonparametric test (relationship between two qualitative parameters) and the Kruskal-Wallis H test (relationship between one quantitative parameter and two or more qualitative parameters). Differences were considered significant at confidence levels greater than 95% ($p < 0.05$).

Metastasis-free survival (MFS) was determined as the interval between initial diagnosis and detection of the first metastasis. To visualize the efficacy of MMP13 and ETV4 mRNA levels to discriminate between two populations (patients that developed/did not develop metastases) in the absence of an arbitrary cut-off value, data were summarized in a ROC (receiver operating characteristic) curve. The AUC (area under curve) was calculated as a single measure to discriminate efficacy. The population was divided into four patient subgroups according to MMP13 ROC curve value in the series of 456 breast cancer and then according to ETV4 ROC curve value in the high and the low MMP13 mRNA expression level subpopulations. Finally, the very small subgroup ($n=16$) of high MMP13 / low ETV4 mRNA expression level was merged with the subgroup ($n=66$) of low MMP13 / low ETV4 mRNA expression level, to obtain a unique group of 82 patients with low ETV4 mRNA expression level. Survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method, and the significance of differences between survival rates were ascertained with the log-rank test.

Références de l'article

1. de Launoit Y, Baert J-L, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S, et al. The Ets transcription factors of the PEA3 group: Transcriptional regulators in metastasis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2006;1766:79–87.
2. Laudet V, Hanni C, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene*. 1999 Feb 11;18(6):1351-9.
3. Chotteau-Lelievre A, Desbiens X, Pelczar H, Defosse P-A, De Launoit Y. Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene*. 1997 Aug 18;15(8):937-52.
4. Chotteau-Lelievre A, Dolle P, Peronne V, Coutte L, De Launoit Y, Desbiens X. Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early

stages of mouse development. *Mech Dev.* 2001 Oct;108(1-2):191-5.

5. Kurpios NA, Sabolic NA, Shepherd TG, Fidalgo GM, Hassell JA. Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003;8:177–90.

6. Oh S, Shin S, Janknecht R. ETV1, 4 and 5: An oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Aug;1826(1):1-12.

7. Shepherd T, Hassell JA. Role of Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001;6:129–40.

8. Ladam F, Damour I, Dumont P, Kherrouche Z, de Launoit Y, Tulasne D, et al. Loss of a Negative Feedback Loop Involving Pea3 and Cyclin D2 Is Required for Pea3-Induced Migration in Transformed Mammary Epithelial Cells. *Mol Cancer Res.* 2013;11:1412–24.

9. Baker R, Kent C V, Silbermann RA, Hassell JA, Young LJT, Howe LR. Pea3 transcription factors and wnt1-induced mouse mammary neoplasia. *PLoS One.* 2010;5:e8854.

10. Qin L, Liu Z, Chen H, Xu J. The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2009;69:3819–27.

11. Shepherd TG, Kockeritz L, Szrajber MR, Muller WJ, Hassell JA. The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis. *Curr Biol.* 2001;11:1739–48.

12. Firlej V, Bocquet B, Desbiens X, de Launoit Y, Chotteau-Lelievre A. Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site. *J Biol Chem.* 2005;280:887–98.

13. Jiang J, Wei Y, Liu D, Zhou J, Shen J, Chen X, et al. E1AF promotes breast cancer cell cycle progression via upregulation of Cyclin D3 transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358:53–8.

14. Qin L, Liao L, Redmond A, Young L, Yuan Y, Chen H, et al. The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression. *Mol Cell Biol.* 2008;28:5937–50.

15. Yuen H-F, Chan Y-K, Grills C, McCrudden CM, Gunasekharan V, Shi Z, et al. Polyomavirus enhancer activator 3 protein promotes breast cancer metastatic progression through Snail-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol.* 2011;224:78–89.

16. Firlej V, Ladam F, Brysbaert G, Dumont P, Fuks F, de Launoit Y, et al. Reduced

tumorigenesis in mouse mammary cancer cells following inhibition of Pea3- or Erm-dependent transcription. *J Cell Sci.* 2008;121 Pt 20:3393–402.

17. Knäuper V, López-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem.* 1996;271:1544–50.

18. Nielsen BS, Rank F, López JM, Balbin M, Vizoso F, Lund LR, et al. Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. *Cancer Res.* 2001;61:7091–100.

19. Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:717–24.

20. Freije JM, Díez-Itza I, Balbín M, Sánchez LM, Blasco R, Tolivia J, et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem.* 1994;269:16766–73.

21. Leeman MF, Curran S, Murray GI. The Structure, Regulation, and Function of Human Matrix Metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2002;37:149–66.

22. Rizki A, Weaver VM, Lee S-Y, Rozenberg GI, Chin K, Myers CA, et al. A Human Breast Cell Model of Preinvasive to Invasive Transition. *Cancer Res.* 2008;68:1378–87.

23. Nannuru KC, Futakuchi M, Varney ML, Vincent TM, Marcusson EG, Singh RK. Matrix metalloproteinase (MMP)-13 regulates mammary tumor-induced osteolysis by activating MMP9 and transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface. *Cancer Res.* 2010;70:3494–504.

24. Vargas AC, McCart Reed AE, Waddell N, Lane A, Reid LE, Smart CE, et al. Gene expression profiling of tumour epithelial and stromal compartments during breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;135:153–65.

25. Nielsen BS, Egeblad M, Rank F, Askautrud HA, Pennington CJ, Pedersen TX, et al. Matrix metalloproteinase 13 is induced in fibroblasts in polyomavirus middle T antigen-driven mammary carcinoma without influencing tumor progression. *PLoS One.* 2008;3:e2959.

26. Chang H-J, Yang M-J, Yang Y-H, Hou M-F, Hsueh E-J, Lin S-R. MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. *Oncol Rep.* 2009;22:1119–27.

27. Wang L, Wang X, Liang Y, Diao X, Chen Q. S100A4 promotes invasion and angiogenesis in breast cancer MDA-MB-231 cells by upregulating matrix metalloproteinase-13. *Acta Biochim Pol.* 2012;59:593–8.

28. Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V, Lemaire R, Hemon B, Grard G, et al. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18:171–8.
29. Jiang W, Crossman DK, Mitchell EH, Sohn P, Crowley MR, Serra R. WNT5A inhibits metastasis and alters splicing of Cd44 in breast cancer cells. *PLoS One*. 2013;8:e58329.
30. Li H, Huang F, Fan L, Jiang Y, Wang X, Li J, et al. Phosphatidylethanolamine-binding protein 4 is associated with breast cancer metastasis through Src-mediated Akt tyrosine phosphorylation. *Oncogene*. 2014;33:4589–98.
31. Datar I, Feng J, Qiu X, Lewandowski J, Yeung M, Ren G, et al. RKIP Inhibits Local Breast Cancer Invasion by Antagonizing the Transcriptional Activation of MMP13. *PLoS One*. 2015;10:e0134494.
32. Chotteau-Lelievre A, Montesano R, Soriano J, Soulie P, Desbiens X, de Launoit Y. PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro. *Dev Biol*. 2003;259:241–57.
33. Soriano J V, Pepper MS, Nakamura T, Orci L, Montesano R. Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells. *J Cell Sci*. 1995;108 (Pt 2):413–30.
34. Meierjohann S, Hufnagel A, Wende E, Kleinschmidt MA, Wolf K, Friedl P, et al. MMP13 mediates cell cycle progression in melanocytes and melanoma cells: in vitro studies of migration and proliferation. *Mol Cancer*. 2010;9:201.
35. Wu N, Opalenik S, Liu J, Jansen ED, Giro MG, Davidson JM. Real-time visualization of MMP-13 promoter activity in transgenic mice. *Matrix Biol*. 2002;21:149–61.
36. Mengshol JA, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:4361–72.
37. Otero M, Plumb DA, Tsuchimochi K, Dragomir CL, Hashimoto K, Peng H, et al. E74-like factor 3 (ELF3) impacts on matrix metalloproteinase 13 (MMP13) transcriptional control in articular chondrocytes under proinflammatory stress. *J Biol Chem*. 2012;287:3559–72.
38. Kurpios NA, MacNeil L, Shepherd TG, Gludish DW, Giacomelli AO, Hassell JA. The Pea3 Ets transcription factor regulates differentiation of multipotent progenitor cells during mammary gland development. *Dev Biol*. 2009 Jan 1;325(1):106-21.

39. de Launoit Y, Chotteau-Lelievre A, Beaudoin C, Coutte L, Netzer S, Brenner C, et al. The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol.* 2000;480:107–16.
40. Mesci A, Taeb S, Huang X, Jairath R, Sivaloganathan D, Liu SK. Pea3 expression promotes the invasive and metastatic potential of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20:17376.
41. Yamamoto H, Horiuchi S, Adachi Y, Taniguchi H, Nosho K, Min Y, et al. Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis.* 2004;25:325–32.
42. Kaya M, Yoshida K, Higashino F, Mitaka T, Ishii S, Fujinaga K. A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene.* 1996;12:221–7.
43. Verger A, Duterque-Coquillaud M. When Ets transcription factors meet their partners. *Bioessays.* 2002;24:362–70.
44. Stähle-Bäckdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jiménez MG, Vega JA, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest.* 1997;76:717–28.
45. Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn.* 1997;208:387–97.
46. Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer.* 2004;4:42.
47. Chang H-J, Yang M-J, Yang Y-H, Hou M-F, Hsueh E-J, Lin S-R. MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. *Oncol Rep.* 2009;22:1119–27.
48. Majérus MA, Bibollet-Ruche F, Telliez JB, Wasylyk B, Bailleul B. Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:2699–703.
49. Zhang M, Maass N, Magit D, Sager R. Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin. *Cell Growth Differ.* 1997;8:179–86.
50. Li Z, Tognon CE, Godinho FJ, Yasaitis L, Hock H, Herschkowitz JI, et al. ETV6-NTRK3 fusion oncogene initiates breast cancer from committed mammary progenitors via activation of AP1 complex. *Cancer Cell.* 2007;12:542–58.

51. Newberry EP, Willis D, Latifi T, Boudreaux JM, Towler DA. Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element. *Mol Endocrinol.* 1997;11:1129–44.
52. Yamada T, Oshima T, Yoshihara K, Tamura S, Kanazawa A, Inagaki D, et al. Overexpression of MMP-13 gene in colorectal cancer with liver metastasis. *Anticancer Res.* 2010;30:2693–9.
53. Kominsky SL, Doucet M, Thorpe M, Weber KL. MMP-13 is over-expressed in renal cell carcinoma bone metastasis and is induced by TGF- β 1. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25:865–70.
54. Ibaragi S, Shimo T, Hassan NMM, Isowa S, Kurio N, Mandai H, et al. Induction of MMP-13 expression in bone-metastasizing cancer cells by type I collagen through integrin α 1 β 1 and α 2 β 1-p38 MAPK signaling. *Anticancer Res.* 2011;31:1307–13.
55. Shah M, Huang D, Blick T, Connor A, Reiter LA, Hardink JR, et al. An MMP13-selective inhibitor delays primary tumor growth and the onset of tumor-associated osteolytic lesions in experimental models of breast cancer. *PLoS One.* 2012;7:e29615.
56. Sendon-Lago J, Seoane S, Eiro N, Bermudez MA, Macia M, Garcia-Caballero T, et al. Cancer progression by breast tumors with Pit-1-overexpression is blocked by inhibition of metalloproteinase (MMP)-13. *Breast Cancer Res.* 2014;16:505.
57. Yuan Z-Y, Dai T, Wang S-S, Peng R-J, Li X-H, Qin T, et al. Overexpression of ETV4 protein in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *Onco Targets Ther.* 2014;7:1733–42.
58. Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, Zhang F, Zhang S, et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:83.

Figures et tableau supplémentaires

Table S1: Pathological and clinical characteristics of patients in relation to metastasis free survival (MFS).

	Number of patients (%)	Number of relapse (%)	MFS <i>p</i> -value ^a
<i>Total</i>	456 (100.0)		
<i>Age</i>			
≤50	98 (21.5)	39 (39.8)	0.88 (NS)
>50	358 (78.5)	142 (39.7)	
<i>SBR histological grade</i> ^{b, c}			
I	58 (13)	11 (19.0)	0.0011
II	229 (51.2)	93 (40.6)	
III	160 (35.8)	73 (45.6)	
<i>Lymph node status</i> ^d			
0	119 (26.1)	36 (30.3)	0.00000012
1-3	237 (52.1)	83 (35.0)	
>3	96 (21.8)	60 (62.5)	
<i>Macroscopic tumor size</i> ^e			
≤25mm	223 (49.8)	69 (30.9)	0.000014
>25mm	225 (50.2)	111 (49.3)	
<i>ERα status</i>			
Negative	118 (25.9)	50 (42.4)	0.077 (NS)
Positive	338 (74.1)	131 (38.8)	
<i>PR status</i>			
Negative	194 (42.5)	86 (44.3)	0.013
Positive	262 (57.5)	95 (36.3)	
<i>ERBB2 status</i>			
Negative	357 (78.3)	138 (38.7)	0.27 (NS)
Positive	99 (21.7)	43 (43.4)	
<i>Molecular subtypes</i>			
RH- ERBB2-	68 (14.9)	26 (38.2)	0.055 (NS)
RH- ERBB2+	45 (9.9)	23 (51.1)	
RH+ ERBB2+	289 (63.4)	112 (38.8)	
RH+ ERBB2-	54 (11.8)	20 (37.0)	
RH+ ERBB2-	54 (11.8)	20 (37.0)	
<i>PIK3CA mutation status</i>			
wild type	307 (67.3)	129 (42.0)	0.071 (NS)
mutated	149 (32.7)	52 (34.9)	

Abbreviations: ERα: oestrogen receptor alpha; PR: progesterone receptor; ERBB2: human epidermal growth factor receptor 2. The bold values are statistically significant (*p*-value<0.05).

^a Log-rank test.

^b Scarff Bloom Richardson classification.

^c Information available for 447 patients.

^d Information available for 452 patients.

^e Information available for 448 patients.

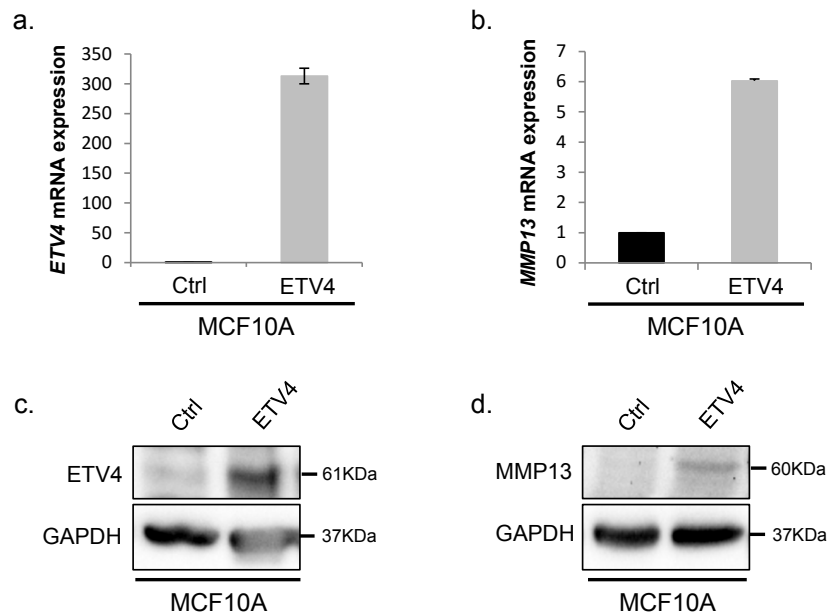


Fig. S1 Validation of the overexpression of ETV4 and MMP13 in MCF10A cells. **a/b** Relative *ETV4* mRNA (**a**) and *MMP13* mRNA (**b**) expression in the MCF10A-Ctrl and MCF10A-ETV4 cells determined by real-time PCR and normalized to *Cyclophilin A* levels. mRNA expression in MCF10A-Ctrl cells was arbitrarily = 1. Error bars indicate SD. **c/d** Western blot analysis of ETV4 protein expression (61 kDa) (**c**) and MMP13 protein expression (60kDa) (**d**) in the MCF10A-Ctrl and MCF10A-ETV4 cells. GAPDH expression served as the loading control.

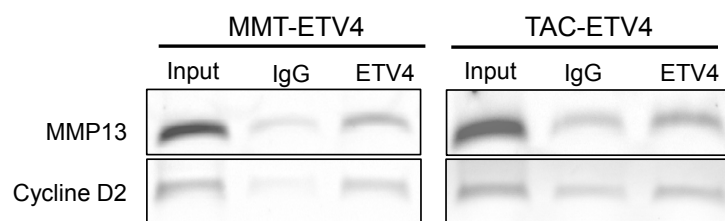


Fig. S2 ChIP experiment for ETV4 and MMP13 in MMT and TAC cells. PCR detection of the *MMP13* promoter region after ETV4 immunoprecipitation in MMT-ETV4 (left panel) and TAC-ETV4 (right panel). Primers allowing the amplification of the proximal *MMP13* promoter region containing EBS are schematized in the lower panel of Fig. 2; Cyclin D2 was used as positive control [8]. Immunoprecipitation with a non-relevant antibody (IgG) was used as negative control.

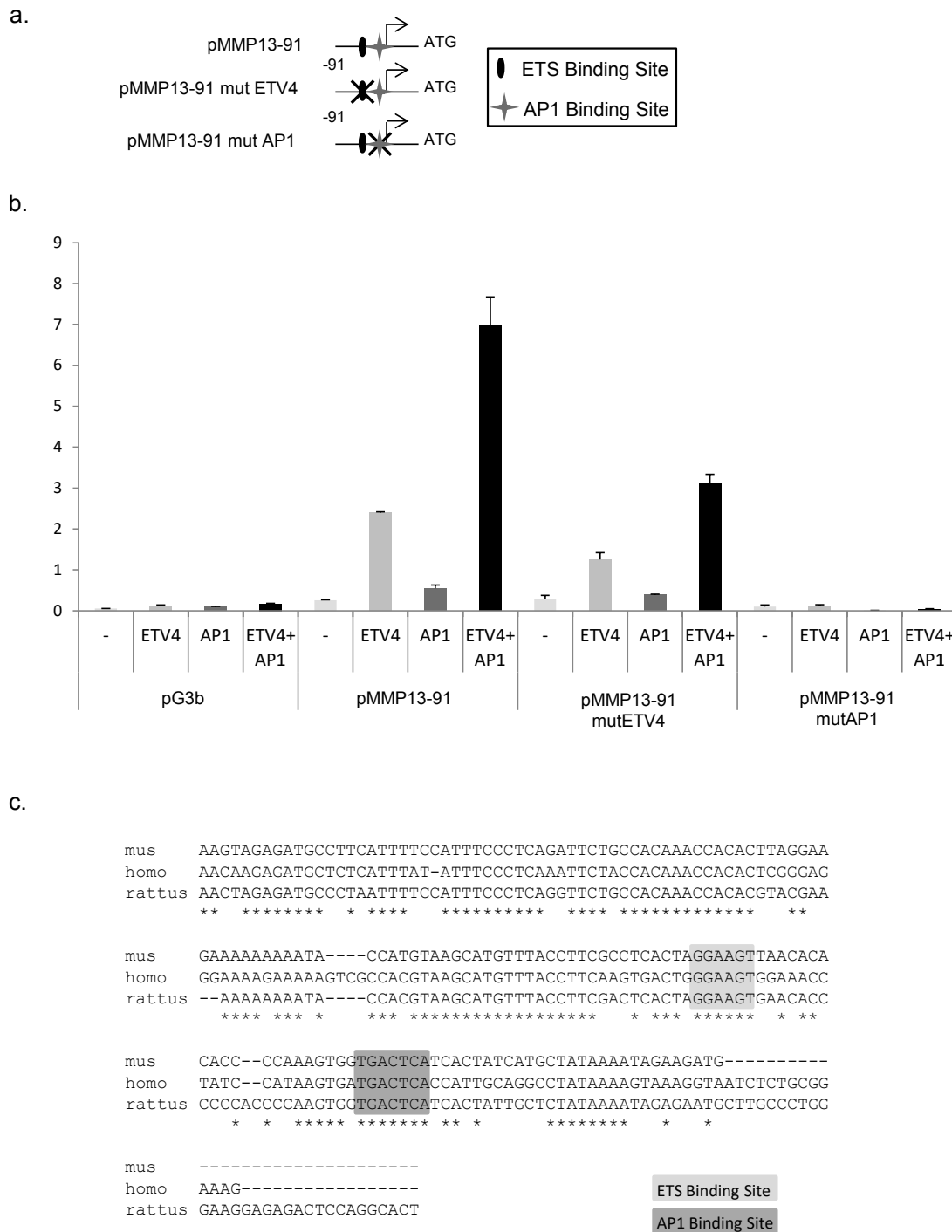


Fig. S3 Effect of ETS/AP1 binding site mutations in the *MMP13* promoter regulation. **a** Schematic representation of the mouse *MMP13* promoter fragments (pMMP13-91) and AP1 and/ or ETV4 mutant versions cloned into the pG3bLuc reporter vector (pG3b). Position of the conserved ETS binding sites (EBS) is represented by: , AP1 binding site is represented by , Transcription start site: , Mutation of the ETS and AP1 site: . **b** Histogram representing the relative luciferase activity measured for each promoter construct cotransfected into the TAC cell line with pTracer vector (-) or pTracer-ETV4 expression vector (ETV4) and/or AP1 expression vector (AP1). Experiments were conducted 3 times in triplicate. Error bars indicate SD. **c** Nucleotide sequence comparison of mouse, human and rat proximal *MMP13* promoters. Shaded boxes indicate the conserved ETS and AP1 binding site sequences.

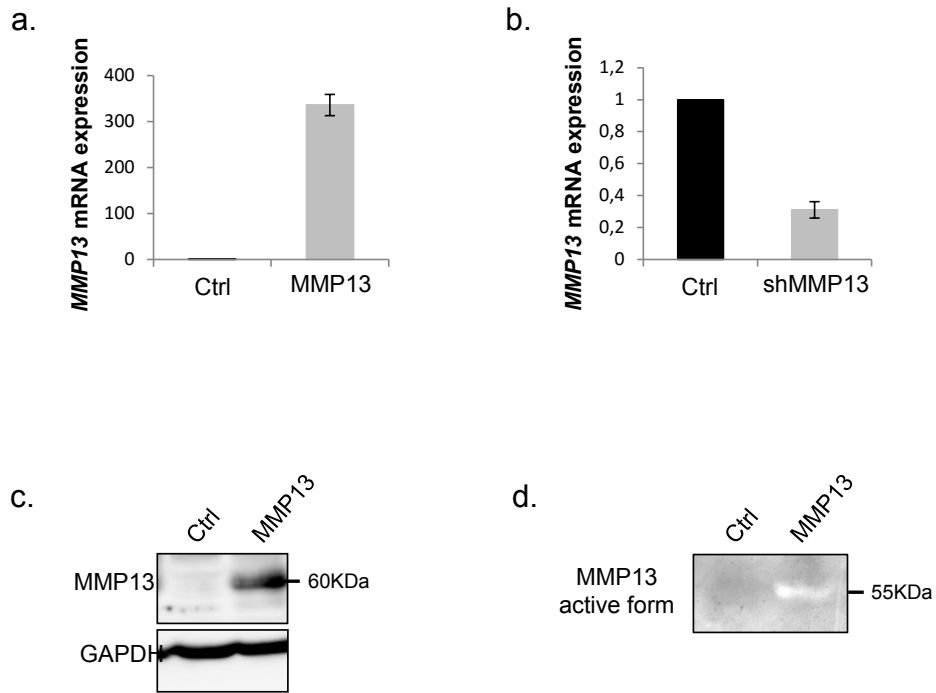


Fig. S4 Expression of MMP13 in MMT cells overexpressing or repressing MMP13. **a/b** Relative *MMP13* mRNA expression in the MMT-Ctrl and MMT-MMP13 (**a**) and MMT-shMMP13 (**b**) determined by real-time PCR and normalized to cyclophilin A levels. mRNA expression in MMT-Ctrl cells was arbitrarily = 1. Error bars indicate SD. **c** Western blot analysis of MMP13 protein expression (60 kDa) in the MMT-Ctrl and MMT- MMP13 cells. GAPDH expression served as the loading control. **d** Zymography analysis of MMP13 protein activity (55 kDa) issue from the supernatant of MMT-Ctrl and MMT-MMP13 cells.

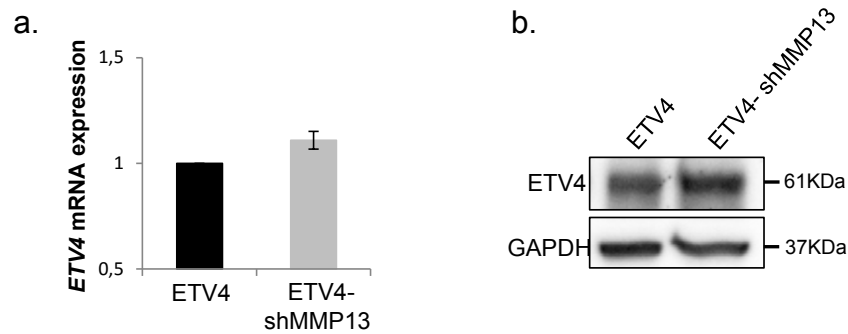


Fig. S5 Expression of ETV4 in MMT-shMMP13 repressing cell. **a** Relative *ETV4* mRNA expression in the MMT-ETV4 and MMT-ETV4-shMMP13 cells determined by real-time PCR and normalized to *Cyclophilin A* levels. mRNA expression in MMT-Ctrl cells was arbitrarily = 1. Error bars indicate SD. **b** Western blot analysis of ETV4 protein expression (61 kDa) in the MMT-ETV4 and MMT- ETV4-shMMP13 cells. GAPDH expression served as the loading control.

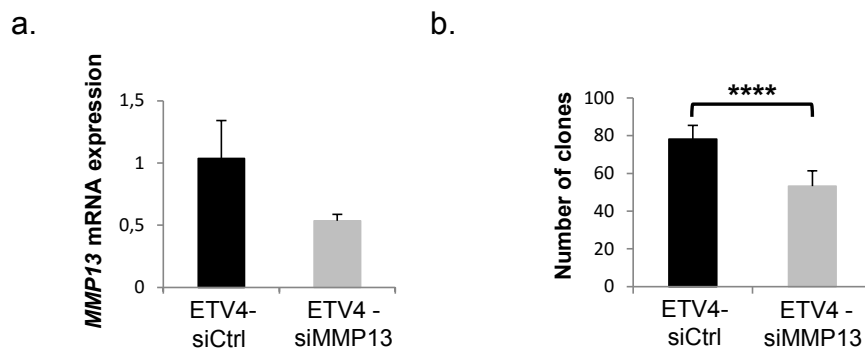


Fig. S6 The repression of MMP13 reduces the anchorage independent growth capacity of MMT-ETV4 overexpressing cells. **a** Relative *MMP13* mRNA expression in the transiently transfected MMT-siCtrl and MMT- siMMP13 cells determined by real-time PCR and normalized to *Cyclophilin A* levels. mRNA expression in MMT-siCtrl cells was arbitrarily = 1. Error bars indicate SD.

Discussion et Conclusion Partie I :
La métalloprotéase 13 relais du facteur de transcription ETV4 dans la
tumorigenèse mammaire

Le facteur de transcription ETV4 joue un rôle lors des étapes importantes du développement et de la morphogénèse de la glande mammaire. ETV4 est également impliqué lors de la tumorigénèse grâce à l'activation de nombreuses voies en aval participant ainsi aux processus de migration et d'invasion. De nombreuses études montrent que le facteur de transcription ETV4 est surexprimé dans le cancer du sein et qu'il est associé avec la formation de métastases ainsi qu'à un mauvais pronostic (Yvan de Launoit *et al.* 2006; Kurpios *et al.* 2003, 2009; Y de Launoit *et al.* 2000). Cependant, l'implication du facteur ETV4 dans la régulation des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués lors de la cancérisation mammaire est encore mal comprise. Une étude menée par l'équipe d'accueil, dans laquelle le facteur de transcription ETV4 a été surexprimé dans une lignée cellulaire mammaire normale (TAC) et réprimé dans une lignée cancéreuse mammaire murine (MMT), montre l'importance de ce facteur dans le processus de cancérisation de la glande mammaire. De plus, la recherche de gènes cibles a permis de mettre en évidence de nombreux gènes pouvant agir comme relais du facteur ETV4 ; c'est le cas par exemple des gènes *Bax* et de la *Cycline D2* pouvant être impliqués dans la morphogénèse et tumorigénèse mammaires (Firlej *et al.* 2005; Ladam *et al.* 2013). Cette étude de recherche de gènes cibles a aussi fait ressortir la métalloprotéase MMP13 en tant que gène cible et relais potentiel d'ETV4 dans la tumorigénèse mammaire.

Ainsi, la première partie de mon travail de thèse a consisté à étudier le rôle de la métalloprotéase MMP13 en tant que gène cible et relais potentiel du facteur ETV4 dans la tumorigénèse mammaire.

- MMP13 est un gène cible du facteur de transcription ETV4

Nous avons démontré un lien de régulation entre le facteur ETV4 et la métalloprotéase MMP13 dans différentes lignées cellulaires humaines et murines (MCF10A, MMT et TAC) dans lesquelles l'expression du facteur ETV4 et MMP13 a été modulée. Puis, l'étude du promoteur *MMP13* a permis d'identifier différents sites de fixation EBS permettant la transactivation de celui-ci mais également la fixation du facteur de transcription ETV4 à ce niveau. De plus, ce promoteur présente un site de fixation AP1 permettant une coopération avec le facteur ETV4 en augmentant ainsi

Discussion Partie I

l'activité transactivatrice. Ces résultats sont appuyés par des données déjà publiées montrant la présence sur le promoteur MMP13 à la fois des sites AP1 et ETV4 (Mengshol *et al.* 2000; Tardif *et al.* 1997). La régulation d'autres métalloprotéases par le facteur ETV4 est déjà documentée, c'est le cas de la surexpression de MMP2 et MMP9 induites par la coopération entre le facteur AIB1 et ETV4 dans le cancer du sein (Qin *et al.* 2008), mais aussi de la surexpression de MMP1 et MMP9 par le facteur ETV4 dans des cellules squameuses de carcinome oral (Hanzawa *et al.* 2000). Tous ces éléments vont donc dans le sens d'un lien de régulation entre le facteur de transcription ETV4 et la métalloprotéase MMP13.

- ETV4 est un facteur favorisant la tumorigénèse

Lors de notre étude, la surexpression du facteur ETV4 dans la lignée MMT a permis de confirmer son implication dans le développement tumoral comme l'équipe l'avait précédemment montré (Firlej *et al.* 2008). Cette étape a aussi permis de confirmer l'effet protumorigène de ce facteur de transcription dans notre modèle cellulaire mammaire. En effet, l'implication d'ETV4 dans les processus de cancérisation a été de nombreuses fois étudiée et mise en évidence, non seulement dans la tumorigénèse mammaire ou sa surexpression est associée à la formation de métastases ainsi qu'à un mauvais pronostic (Yvan de Launoit *et al.* 2006; Kurpios *et al.* 2003, 2009; Y de Launoit *et al.* 2000), mais aussi dans de nombreux autres cancers comme dans les carcinomes colorectaux (Mesci *et al.* 2014), les adénocarcinomes gastriques (Hiroyuki Yamamoto *et al.* 2004) ainsi que dans les mélanomes (S. Li *et al.* 2013) par exemple.

- MMP13 est un relais du facteur de transcription ETV4 dans ses effets pro-tumorigènes

Afin de définir si la métalloprotéase MMP13 agit ou pas en tant que relais du facteur ETV4 dans la tumorigénèse mammaire, nous avons étudié les effets phénotypiques induits lors de la surexpression/ répression de MMP13 dans les lignées MMT surexprimant ou pas le facteur ETV4. Dans un premier temps la modulation de l'expression de MMP13 montre son implication dans les processus de migration, de prolifération, d'invasion et de croissance sans ancrage et participe donc à la tumorigénèse mammaire. En effet, de nombreuses données de la littérature montrent que cette métalloprotéase est surexprimée dans les tumeurs mammaires (Freije *et al.*

Discussion Partie I

1994b; B. Zhang *et al.* 2008b) et que cette surexpression est également présente dans les métastases osseuses formées lors de la tumorigenèse mammaire (Nannuru *et al.* 2010). De plus, l'expression de MMP13 est plus importante dans les lignées cellulaires mammaires agressives (Balduyck *et al.* 2000).

L'étude du lien de régulation a été effectuée par l'inhibition de l'expression de MMP13 dans une lignée MMT surexprimant ETV4 et met en évidence une diminution significative des effets pro-tumorigènes. De plus, l'inhibition de MMP13 dans les cellules surexprimant ETV4 induit une diminution du volume tumoral formé lors de l'injection sous-cutanée de ces cellules dans des souris immunodéficientes en comparaison aux cellules MMT surexprimant ETV4 uniquement. Cela confirme les résultats obtenus *in vitro* et montre l'importance de MMP13 lors de la tumorigenèse induite par ETV4.

Bien que de nombreuses études montrent l'implication de la métalloprotéase MMP13 dans la progression tumorale et le développement des métastases, peu d'études ont analysé l'impact de la modulation de l'expression de celle-ci. L'une de ces études montre le rôle de Pit1 dans la régulation de MMP13 dans le cadre du cancer du sein et l'importance de cette métalloprotéase dans la formation des métastases aux poumons (Sendon-Lago *et al.* 2014). Notre étude va donc dans le même sens et a permis de mettre en évidence l'implication de MM13 dans la tumorigenèse mammaire.

- MMP13 et ETV4 sont des facteurs de mauvais pronostic

Pour finir, nous nous sommes intéressés à la relation entre la surexpression d'ETV4, de MMP13 et l'agressivité des tumeurs mammaires. L'étude de l'expression en ARNm de *MMP13* et *ETV4* dans une cohorte de tumeurs mammaires a permis de mettre en évidence que l'association de la surexpression à la fois de la métalloprotéase MMP13 et du facteur ETV4 est corrélée à un mauvais pronostic.

Ces résultats corroborent les résultats que nous avons obtenus *in vitro* et *in vivo* et démontrent l'importance de ces deux facteurs dans la tumorigenèse mammaire, et de l'action de la métalloprotéase MMP13 agissant comme relais de ETV4.

- Conclusion

Lors de cette première partie du projet de thèse, nous avons donc confirmé l'implication du facteur de transcription ETV4 dans la tumorigenèse mammaire et

Discussion Partie I

identifié un nouveau gène cible : la métalloprotéase MMP13. La modulation de l'expression de MMP13 montre également son implication dans les processus pro-tumorigènes induits par ETV4. Ainsi, nous avons mis en évidence que MMP13 agit en tant que relais du facteur de transcription ETV4 lors de la tumorigenèse mammaire et que la surexpression d'ETV4 associée à celle de MMP13 est corrélée à des cancers du sein de mauvais pronostic. Toutes ces données mettent en évidence le rôle d'ETV4 dans la tumorigenèse mammaire et l'importance de la métalloprotéase MMP13 dans l'induction de ces effets.

Il serait donc potentiellement intéressant de cibler spécifiquement la métalloprotéase MMP13 afin d'évaluer son potentiel rôle en tant que cible thérapeutique. De plus, l'association de la surexpression d'ETV4 et MMP13 pourrait servir comme potentiel marqueur de diagnostic et de pronostic. Dans ce contexte une étude portant sur le ciblage et le dosage de la métalloprotéase MMP13 chez les patientes atteintes d'une tumeur mammaire serait intéressante afin de développer de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques.

Contexte: Partie II

**Étude de l'implication du facteur de transcription ETV1 dans la
formation des métastases du cancer de la prostate**

Projet de thèse : Partie II

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé la seconde partie de mes travaux de thèse s'attache à l'étude de la formation des métastases osseuses dans le cancer de la prostate. Suite à la découverte des fusions de gènes impliquant les facteurs ETS, en particulier les facteurs ERG et ETV1 qui sont les plus représentées, 50% et 10% des cas respectivement, l'équipe s'est attachée à comprendre leurs implications et les différences potentielles entre ses deux facteurs.

L'équipe s'est tout d'abord intéressée à la fusion impliquant le facteur ERG qui est la fusion la plus retrouvée dans le CaP. Afin d'étudier l'implication de ce facteur et de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués, une recherche des gènes cibles à partir d'un modèle cellulaire PC-3M exprimant la fusion TMPRSS2-ERG a été effectuée par une analyse transcriptomique. Cette étude qui sera utile pour notre projet, a permis d'identifier un certain nombre de gènes cibles dont certains sont des marqueurs osseux. Cette étude met en évidence par exemple la régulation du gène codant l'*Endothéline-1* connu pour stimuler la différenciation des ostéoblastes. Ce gène cible d'intérêt, ainsi que d'autres, font actuellement l'objet d'une étude afin d'améliorer la compréhension des mécanismes de formation des métastases osseuses dans le but d'améliorer la compréhension et la contribution de la fusion de gène TMPRSS2 :ERG.

Dans le but de compléter cette étude, le projet qui m'a été confié pour cette seconde partie de thèse porte sur la deuxième fusion majoritairement retrouvée dans le CaP. Elle implique le facteur de transcription ETV1 qui peut être présent soit sous une forme pleine longueur (ETV1-FL), soit sous une forme tronquée (dETV1) dans la moitié des cas. L'intérêt d'étudier ce facteur ETV1 est alimenté par une étude récente de la littérature suggérant des différences en terme d'agressivité entre les fusions impliquant les facteurs ERG ou ETV1. En effet, une agressivité plus importante dans les tumeurs présentant une surexpression du facteur ETV1 ainsi que de nombreuses différences en terme de cibles moléculaires ont été mis en évidence.

C'est dans ce contexte que le second objectif de ma thèse s'est ainsi focalisé sur les fusions impliquant le facteur de transcription ETV1 afin de rechercher les modalités de participation lors de la tumorigénèse prostatique mais aussi les

spécificités d'action entre ETV1 et ERG. De plus, l'étude des différences potentielles entre la forme pleine longueur et tronquée d'ETV1 dans la formation et le tropisme des métastases constitue un autre centre d'intérêt.

Afin de mener à bien ce projet, mon travail de thèse s'est découpé en différentes étapes sur la base de trois lignées prostatiques cancéreuses choisies pour les caractéristiques suivantes :

MDA-PCa-2b

Les MDA-PCa-2b présentent la fusion ETV1, elles sont AR et PSA positives et elles sont capables de former des tumeurs *in vivo* chez la souris.

IGR-CaP1

Les IGR-CaP1 sont complémentaires des MDA-PCa-2b car elles sont AR et PSA négatives et induisent la formation de métastases osseuses qui sont les métastases majoritairement retrouvées dans le CaP.

PC-3M

Les PC-3M ont la capacité à former des métastases, cette lignée cellulaire a été utilisée par l'équipe dans le cadre de l'étude de l'implication des fusions TMPRSS2-ERG dans la formation des métastases osseuses et servira donc de modèle comparatif aux résultats obtenus avec ETV1.

Pour mener à bien le projet, des lignées MDA-Pca-2b, IGR-CaP1 et PC-3M exprimant le gène de la luciférase ont été utilisées et sont à la base de l'ensemble des expériences menées et ceci dans le but de pouvoir observer la formation des tumeurs primaires ou la formation des métastases *in vivo*.

Les IGR-CaP1 Luc déjà établies nous ont été fournies par A. Chauchereau. Pour les lignées MDA-PCa-2b, nous avons établi par infection rétrovirale les MDA-PCa-2b Luc. Les PC-3M Luc ont été acquises commercialement (Caliper CVCL_9555). L'activité luciférase de ces lignées a été validée par la mesure de l'activité de la luciférase par un lumonimètre.

Sur la base de l'utilisation de ces différentes lignées avec différents profils quant à leur comportement tumorigénique et métastatique, les objectifs du projets se sont orientés sur les axes suivants :

1 -La mise en place de modèles cellulaires de répression du facteur de transcription ETV1 *via* l'utilisation d'ARN interférents dans la lignée cellulaire MDA-Pca-2b ; ou de la surexpression de la forme pleine longueur et tronquée d'ETV1 dans les lignées cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M.

2- La réalisation de tests phénotypiques *in vitro* de prolifération, migration, invasion et croissance sans ancrage afin de définir le rôle d'ETV1

3 - L'injection des modèles cellulaires établis dans des souris immunodéficientes afin de suivre la formation des métastases et d'en établir le tropisme. Nous avons engagé ce travail sur le modèle IGR-CaP1.

4- Une analyse transcriptomique comparative afin de rechercher les gènes cibles impliqués était envisagée afin de la comparer à celle déjà effectuée par l'équipe sur ERG. Cependant l'ensemble des résultats *in vitro* n'étant pas finalisé nous avons décalé ce projet. Néanmoins, une recherche dans la littérature de gènes régulés par ETV1 et impliqués dans la formation de métastases osseuses nous a permis d'identifier un gène potentiellement intéressant : SPARC dont nous avons initié l'étude.

5- L'analyse de l'expression du facteur de transcription ETV1 sous sa forme pleine longueur ou tronquée dans une cohorte d'échantillons de cancer de la prostate et la corrélation avec l'expression des gènes cibles identifiés ; à ce jour SPARC.

Matériels et Méthodes Partie II

L'ensemble des méthodes non décrites dans la publication (Partie I) dont fait l'objet la première partie des travaux de thèse est développée ci-dessous.

1 Oligonucléotides utilisés

Tableau 8: Nom et séquences des oligonucléotides utilisés pour la deuxième partie du projet.

Utilisation	Nom	Séquences des nucléotides
Clonage des séquences ETVA-FL et dETV1	ETV1-5'-pTRACER	CAGTGGCGGCCCGCCGAAGAGCAGCAGCATGGATGGA
	ETV1-3'-pTRACER	CTCGAGCGGCCCGCCAGTAATACACGTAGCCTTCGTTGTA
	dETV1-5'-pTRACER	CAGTGGCGGCCCGCAGCCACAAGTGGGAATGAGGCC
	InFus-pTRA-pMX-F	GGTGGTACGGGAATTTCGGAATTAGCTTGGTACTAATA
	InFus-pTRA-pMX-R	CGCTCAGCTGGAATTCATGCGATGCAATTTCCCTCAT
Clonage des plasmides servant à la répression d'ETV1	shETV1-1 S	CCGGCGACCCAGTGTATGAACACAACCTGCAGTTGTGTTTCATACACTGGGTCGTTTTTTG
	shETV1-1 AS	AATTCAAAAACGACCCAGTGTATGAACACAACCTGCAGTTGTGTTTCATACACTGGGTCG
	shETV1-2 S	CCGGTTCGATGGAGACATCAAACCTGCAGGTTTGATGTCTCCATCGAATTTTTG
	shETV1-2 AS	AATTCAAAAATTCGATGGAGACATCAAACCTGCAGGTTTGATGTCTCCATCGAA
	shETV1-3 S	CCGGGTGCCTGTACAATGTCAGTCTGCAGACTGACATTGTACAGGCACTTTTTG
	shETV1-3 AS	AATTCAAAAAGTGCCTGTACAATGTCAGTCTGCAGACTGACATTGTACAGGCAC
	shSrc (Ctrl) S	CCGGCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTGCAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTTTG
	shSrc (Ctrl) AS	AATTCAAAAACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTGCAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG
RT-PCR	ETV1 S (OL-1)	CTGAACCCTGTAACCTCCTTTCC
	ETV1 AS (OL-1)	AGACATCTGGCGTTGGTACATA
	ETV1 S (OL-2)	GCAAGTGCCTTACATGGTCAC
	ETV1 AS (OL-2)	AGCCTGATAGTCTGGTACAAACT
	ERG- S	AACGAGCGCAGAGTTATCGT

ERG-AS	GTGAGCCTCTGGAAGTCGTC
ETV4-S	GATGAAAGCCGGATACTTGGAC
ETV4-AS	TTCGCGCAAGCTCCCATTT
ETV5-S	TCAGCAAGTCCCTTTTATGGTC
ETV5-AS	GCTCTTCAGAATCGTGAGCCA
SPARC-S	GTGCAGAGGAAACCGAAGAG
SPARC-AS	TGTTTGCAGTGGTGGTTCTG
GAPDH-S	AACGGATTTGGTCGTATTGGGC
GAPDH-AS	TTGATTTTGGAGGGATCTCG

2 Stratégie de clonage

- **Stratégie de surexpression du facteur ETV1 sous ses formes pleine longueur et tronquée**

Les vecteurs rétroviraux d'expression de la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1 ont été construits suite à l'amplification des ADN complémentaires des différents fragments par PCR à partir des cellules MDA-PCa-2b. Ces fragments d'ADN complémentaire ETV1-FL ou dETV1 ont ensuite été insérés dans un plasmide pTRACER A (PTR A) servant de plasmide intermédiaire afin d'étiqueter la séquence ETV1 ou dETV1 d'un épitope V5. Une fois le clonage des formes pleine longueur (pTRA-ETV1) et délétée (pTRA-dETV1) obtenu et validé par séquençage, le sous-clonage des séquences étiquetées a été réalisé dans le vecteur plasmidique rétroviral pMX puro grâce à la technique de In-Fusion® HD Cloning (Clontech) (**Figure 23**). Les différents plasmides ainsi obtenus ont été validés par séquençage et ont servi à la mise en place des différentes lignées cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M *via* une infection rétrovirale.

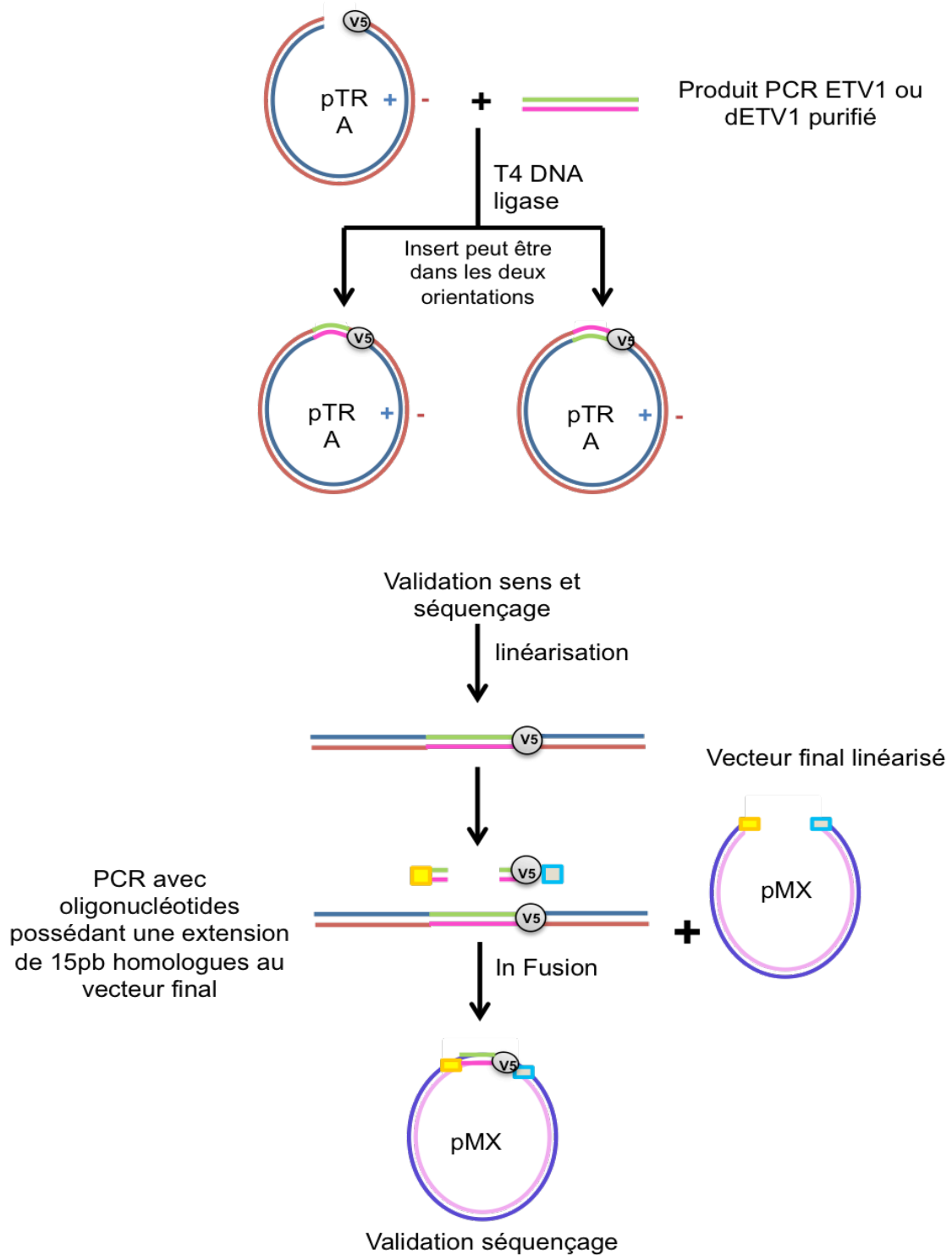


Figure 23: Représentation schématique de la stratégie de clonage des séquences ADN complémentaires ETV1 ou dETV1 dans le vecteur rétroviral pMX puro.

- **Stratégie de répression stable d'ETV1 par shRNA**

L'infection lentivirale a été réalisée en suivant les étapes décrites dans la **Figure 24**. Les séquences shRNA dont deux sont des séquences publiées (Ran *et al.* 2015; Pop *et al.* 2014; Oh *et al.* 2013) et une troisième conçue à partir du site « RNAi Consortium portal » (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/>) ont été synthétisées puis clonées dans un vecteur pLKO-1 avant d'être envoyées en séquençage pour validation.

Les cellules servant à la production du virus sont ensuite transfectées avec les différents plasmides nécessaires à la production lentivirale (plasmide VSV-G, plasmide pLKO-1 shETV1 et le $\Delta 8.9$ comportant les gènes gag, pol et rev nécessaires à la production virale). Les cellules sont transfectées avec 3 plasmides contenant des séquences shRNA-ETV1 différentes qu'on nommera shETV1-1, shETV1-2 et shETV1-3. Les cellules HEK-293 FT produisent ainsi les lentivirus pendant 48h puis les virus sont récoltés et déposés sur les cellules MDA-PCa-2b. L'infection s'effectue pendant 48h avant de changer le milieu par un milieu contenant l'antibiotique permettant la sélection des cellules infectées. En effet le plasmide pLKO-1 possédant un gène de résistance à la puromycine les cellules ayant intégrées le virus vont échapper à la sélection.

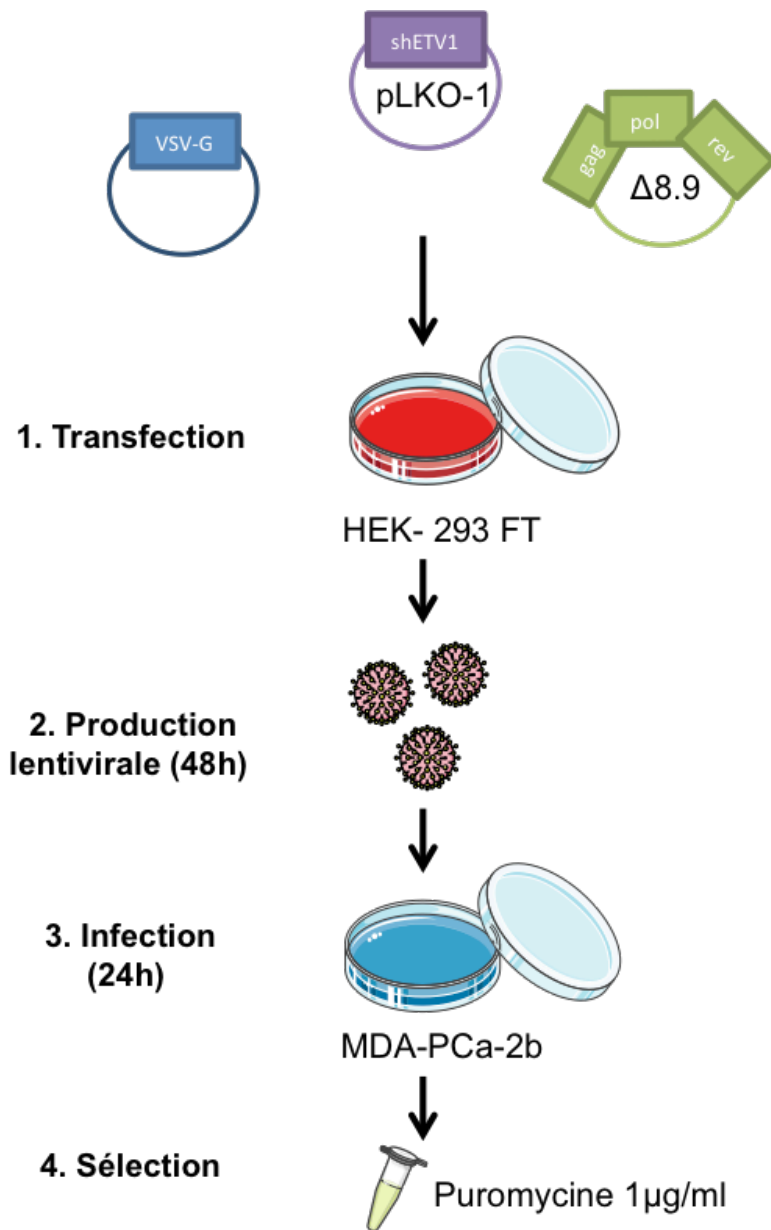


Figure 24: Schéma décrivant les différentes étapes permettant une infection rétrovirale afin d'établir des clones stables d'expression.

3 Mesure de la prolifération cellulaire par l'IncuCyte® (SARTORIUS)

7000 cellules sont ensemencées à un temps T0 dans une plaque 12 puits, 4 puits pour chaque condition. La plaque est ensuite placée dans un incubateur dans lequel se trouve l'IncuCyte® permettant de photographier et de mesurer la confluence de chaque puits toutes les heures. La mesure de la confluence permet de comparer la prolifération des cellules. Cette expérience a été reproduite 3 fois.

4 Injection en intra cardiaque

Lors de cette étude, nous avons utilisé des souris mâles immunodéficientes de 6 semaines dans lesquelles nous avons injecté les différentes lignées cellulaires en intra-cardiaque. Pour cela, les cellules sont décollées puis comptées et rincées au PBS 1x, les cellules sont suspendues dans une solution stérile de PBS 1x à température ambiante à une concentration de 5.10^6 cellules par ml, 100µl de ces cellules sont ensuite injectés en intra-cardiaque.

Chaque souris est anesthésiée grâce à l'inhalation d'isoflurane à 2% pour un débit d'oxygène à 1L/min dans une boîte adaptée puis est placée sous masque au moment de l'injection. Les cellules sont injectées en intra-cardiaque grâce à l'utilisation d'une seringue à insuline 1ml.

Environ 40 à 50 min après injection, la souris est de nouveau anesthésiée afin de réaliser l'injection de la Luciférine (150mg/ ml) en sous-cutanée. 10 minutes après l'injection, la bonne dissémination des cellules injectées est contrôlée par l'observation de la bioluminescence au Lumina qui est l'appareil dédié à l'imagerie du petit animal.

Les souris ainsi injectées et validées comme positives à l'injection sont ensuite contrôlées au Lumina une fois par semaine afin de suivre la formation et le tropisme des métastases puis sacrifiées après 12 semaines. Les parties osseuses (pattes avant, pattes arrière, queue, colonne, côtes) sont prélevées et leur bioluminescence est observée au Lumina afin de détecter la présence de métastases osseuses (**Figure 25**).

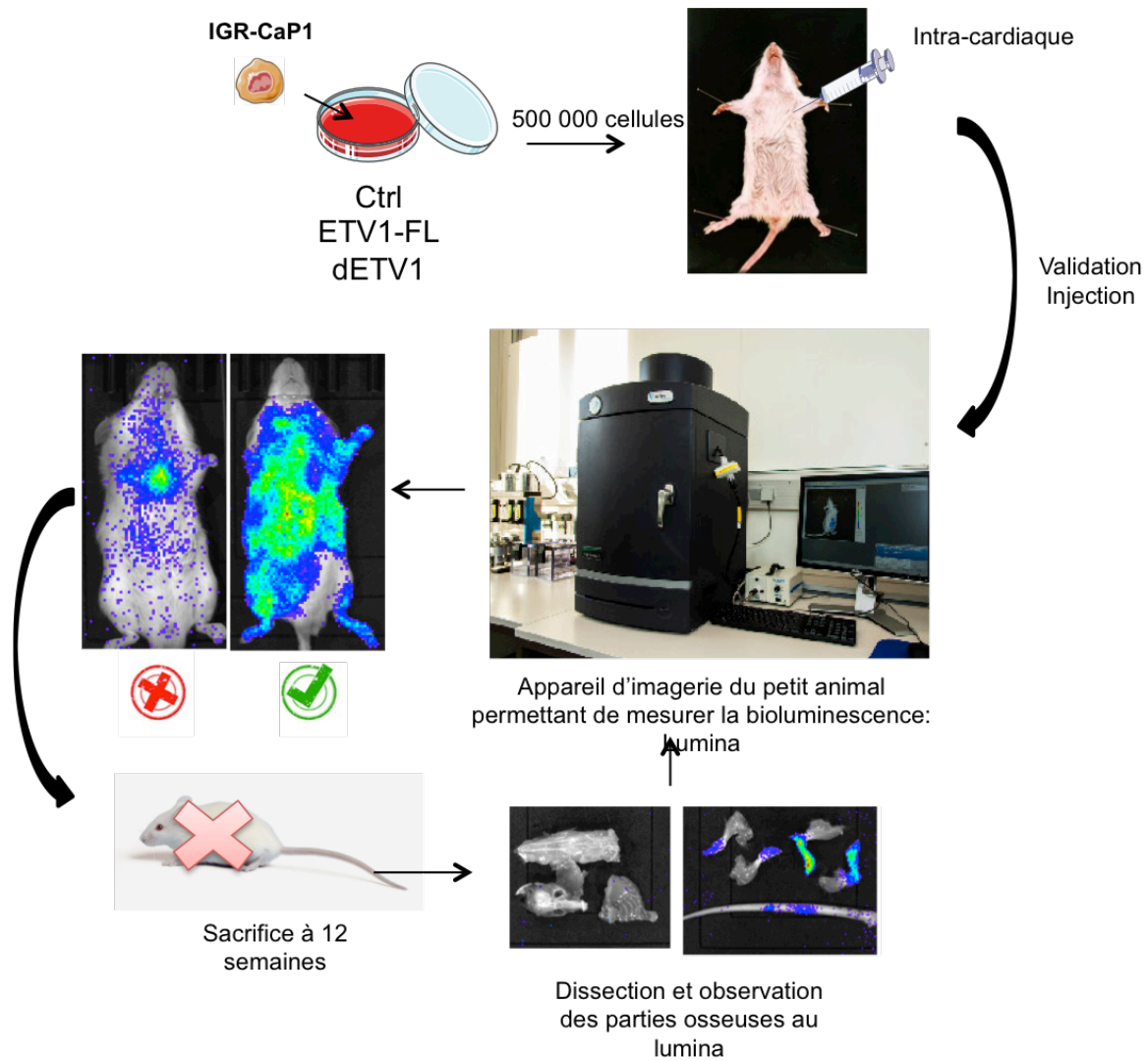


Figure 25: Représentation de la stratégie expérimentale d'injection intra-cardiaque des cellules prostatiques cancéreuses.

Résultats Partie II:
Étude de l'implication du facteur de transcription ETV1 dans la
formation des métastases du cancer de la prostate

1 Comparaison du statut d'expression du facteur ETV1 dans les lignées cancéreuses prostatiques MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M

Avant d'initier les démarches expérimentales liées au projet, nous avons dans un premier temps entrepris de confirmer ou de définir le statut d'expression du facteur ETV1 dans les lignées MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M choisies et de le comparer à d'autres lignées prostatiques disponibles au laboratoire : PC-3, VCaP, DU145, LNCaP et RWPE-1. Pour ce faire, l'analyse de l'expression d'ETV1 a été effectuée au niveau transcriptionnel et au niveau protéique.

De plus, nous avons aussi comparé le statut d'expression d'autres facteurs de la famille ETS, ERG mais aussi ETV4 et ETV5 qui appartiennent au même titre que ETV1 au groupe PEA3, dans les lignées MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M.

- Au niveau transcriptionnel

Le statut d'expression du facteur ETV1 effectué sur les lignées cellulaires MDA-PCa-2b, IGR-CaP1, PC-3M, PC-3, VCaP, DU145, LNCaP et RWPE-1 montre une faible voire très faible expression dans les lignées cancéreuses prostatiques IGR-CaP, PC-3M, PC-3, VCaP, DU145 et également un niveau très faible dans la lignée cellulaire prostatique « normale » RWPE-1. En revanche, et comme décrit dans la littérature, on observe une expression en ARNm plus importante dans les lignées LNCaP et MDA-PCa-2b de 3,5 et 17,5 fois respectivement par rapport à la lignée PC-3M (**Figure 26**).

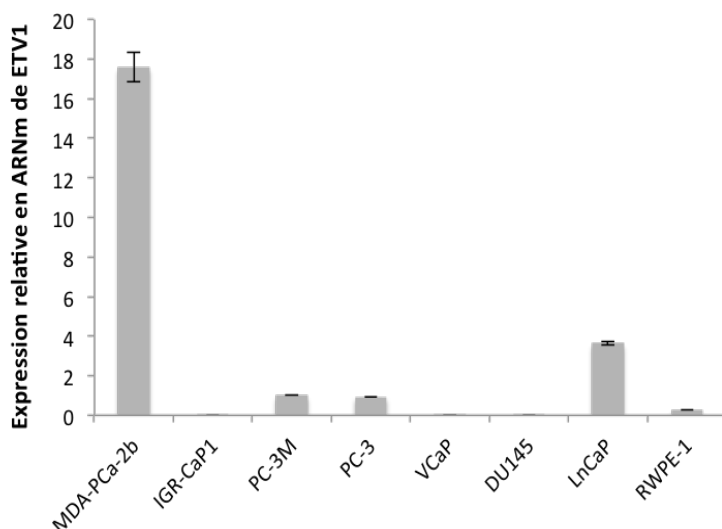


Figure 26: Analyse de l'expression transcriptionnelle d'ETV1 par Q-RT-PCR dans différentes lignées cellulaires prostatiques.

L'expression en ARNm d'ETV1 est rapportée à celle des ARNm du gène référent GAPDH dans les lignées cancéreuses prostatiques, MDA-PCa-2b, IGR-CaP1, PC-3M, PC-3, VCaP, DU145, LNCaP, et la lignée « saine » RWPE-1.

Résultats Partie II

L'analyse de l'expression transcriptionnelle des facteurs ERG, ETV4 et ETV5 montre que leur expression est très faible dans les MDA-PCa-2B par rapport à celle d'ETV1, qu'elle est supérieure à celle d'ETV1, qui est quasi nulle, dans les IGR-CaP1 et que l'expression des quatre facteurs est similaire dans les PC-3M (**Figure 27**).

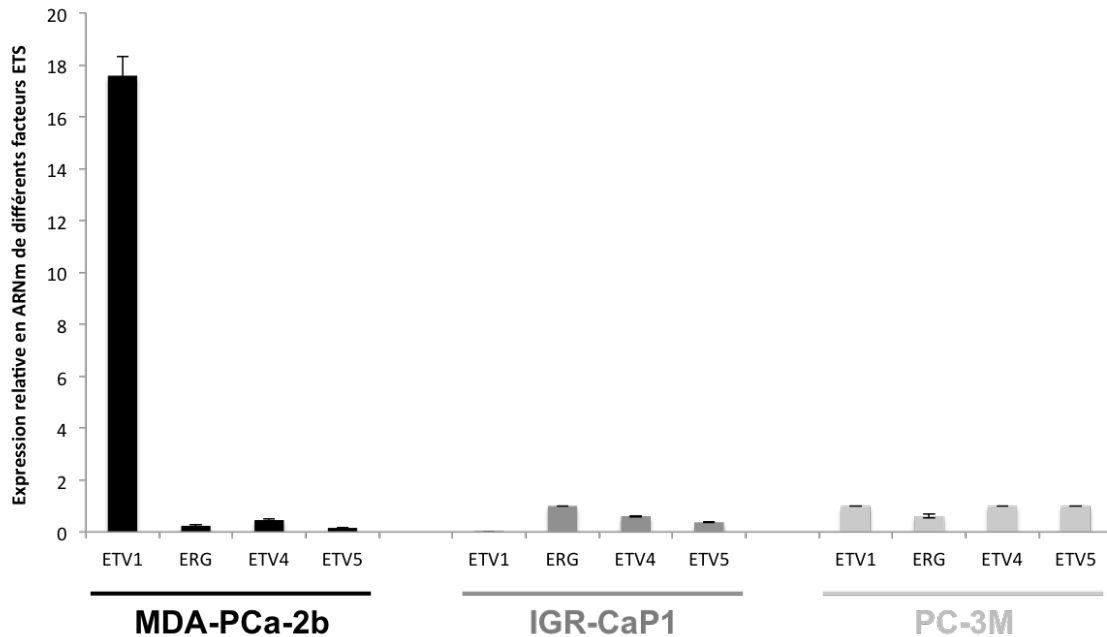


Figure 27: Analyse de l'expression transcriptionnelle des facteurs ERG, ETV1, 4 et 5 par Q-RT-PCR dans les lignées MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M.

L'expression en ARNm d'ETV1, ERG, ETV4 et ETV5 est rapportée à celle des ARNm du gène référent GAPDH dans les lignées prostatiques cancéreuses MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M.

- Au niveau protéique

L'analyse de l'expression protéique du facteur de transcription ETV1 s'est avérée compliquée tout au long de ce projet. Nous avons envisagé et mis en place de nombreuses stratégies afin de réussir à visualiser cette protéine. Pour cela nous avons testé quatre anticorps ciblant la protéine ETV1, essayé différents tampons de lyse protéique, inhibé le protéasome et aussi modifié de nombreux paramètres dans la technique du Western Blot (Cf tableau Annexe 1). Nous avons cependant réussi à observer, dans une de ces expériences, l'expression de la protéine ETV1 dans la lignée MDA-PCa-2b mais très faiblement avec un mauvais signal et aucun signal n'est détecté dans les IGR-CaP1 et PC-3M ce qui serait en accord avec les données observées au niveau transcriptionnel (**Figure 28**).

Résultats Partie II

De ce fait, pour cette étude et pour l'ensemble des lignées mises en place au cours de ce projet, nous n'avons pu valider l'expression protéique d'ETV1.

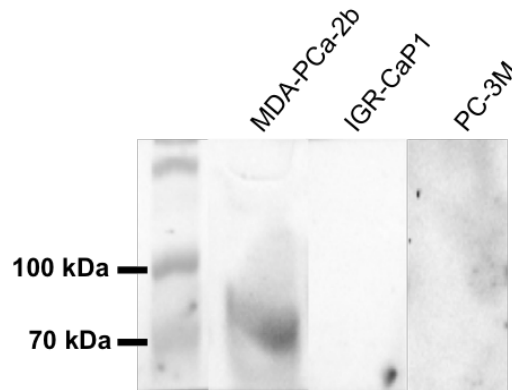


Figure 28: Analyse de l'expression protéique par Western Blot d'ETV1 dans les modèles cellulaires MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M.

Détection par Western Blot de l'expression d'ETV1 dans les lignées MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M.

Pour mener à bien ce projet, les lignées cellulaires MDA-PCa-2b, IGR-CaP1, et PC-3M exprimant le gène de la luciférase (Luc) sont à la base de l'ensemble des expériences menées.

2 Établissement des modèles cellulaires nécessaires à notre étude

Après avoir validé le statut d'expression d'ETV1 dans les lignées MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M, deux stratégies ont été utilisées :

- une stratégie de répression de l'expression du facteur ETV1 dans la lignée MDA-PCa-2b,
- une stratégie de surexpression de la forme pleine longueur et tronquée d'ETV1 dans les lignées IGR-CaP1 et PC-3M.

2.2 Modèles cellulaires MDA-PCa-2b de repression de l'expression du facteur ETV1

Deux séquences ARN dirigées contre ETV1 (siETV1-1 et siETV1-2) ont été utilisées en parallèle d'un si contrôle (siCtrl) dans la lignée MDA-PCa-2b. La validation de leur efficacité a été analysée par Q-RT-PCR suite à une transfection transitoire. On observe ainsi après quarante huit heures de transfection une diminution de l'expression transcriptionnelle d'ETV1 de l'ordre de 70% pour le siETV1-1 et de 80% pour le siETV1-2 en comparaison au siCtrl (**Figure 29**).

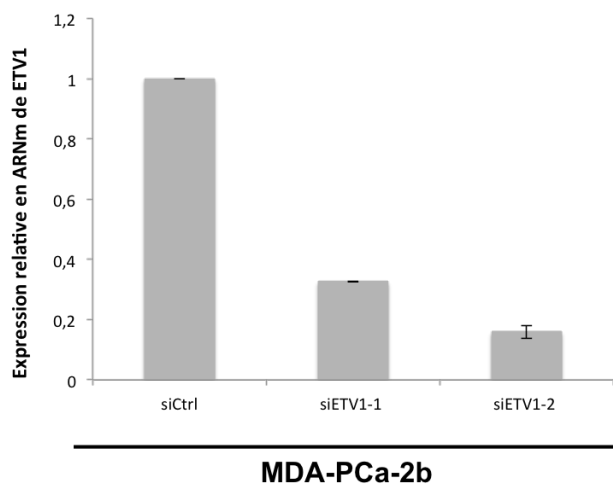


Figure 29: Répression de l'expression transcriptionnelle du facteur ETV1 par interférence à l'ADN dans la lignée cellulaire MDA-PCa-2b.

L'expression transcriptionnelle d'ETV1 est analysée 48 heures après transfection des siRNA Ctrl, siETV1-1 et siETV1-2 dans les MDA-PCa2b. L'expression est normalisée par l'expression du gène référent *GAPDH*.

2.3 Modèles cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M de surexpression de l'expression du facteur ETV1

Nous avons établi par infection rétrovirale différentes lignées de cellules cancéreuses prostatiques IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant soit la forme pleine longueur d'ETV1 (ETV1-FL) soit la forme tronquée d'ETV1 (dETV1) en parallèle des lignées contrôles.

Six lignées cellulaires ont ainsi été mises en place :

- IGR-CaP1 Ctrl
- IGR-CaP1 ETV1-FL
- IGR-CaP1 dETV1
- PC-3M Ctrl

Résultats Partie II

- PC-3M ETV1-FL
- PC-3M dETV1

La validation de la surexpression d'ETV1 a été analysée par Q-RT-PCR grâce à la mesure de l'expression relative d'ETV1. Cette expression est analysée à l'aide de deux couples d'oligonucléotides, un couple (OL 1) permettant l'amplification des deux formes et un couple (OL 2) situé dans la partie 5' permettant l'amplification de la forme pleine longueur uniquement.

On observe ainsi avec le couple OL1 une augmentation de l'expression relative des ARNm d'ETV1 dans les IGR-CaP1 d'environ 6 fois, que ce soit pour la forme pleine longueur ou tronquée (**Figure 30 A**). De même on observe une augmentation de l'expression relative des ARNm d'ETV1 dans les PC-3M d'environ 22 et 454 fois respectivement pour la forme pleine longueur et tronquée respectivement (**Figure 30 C**).

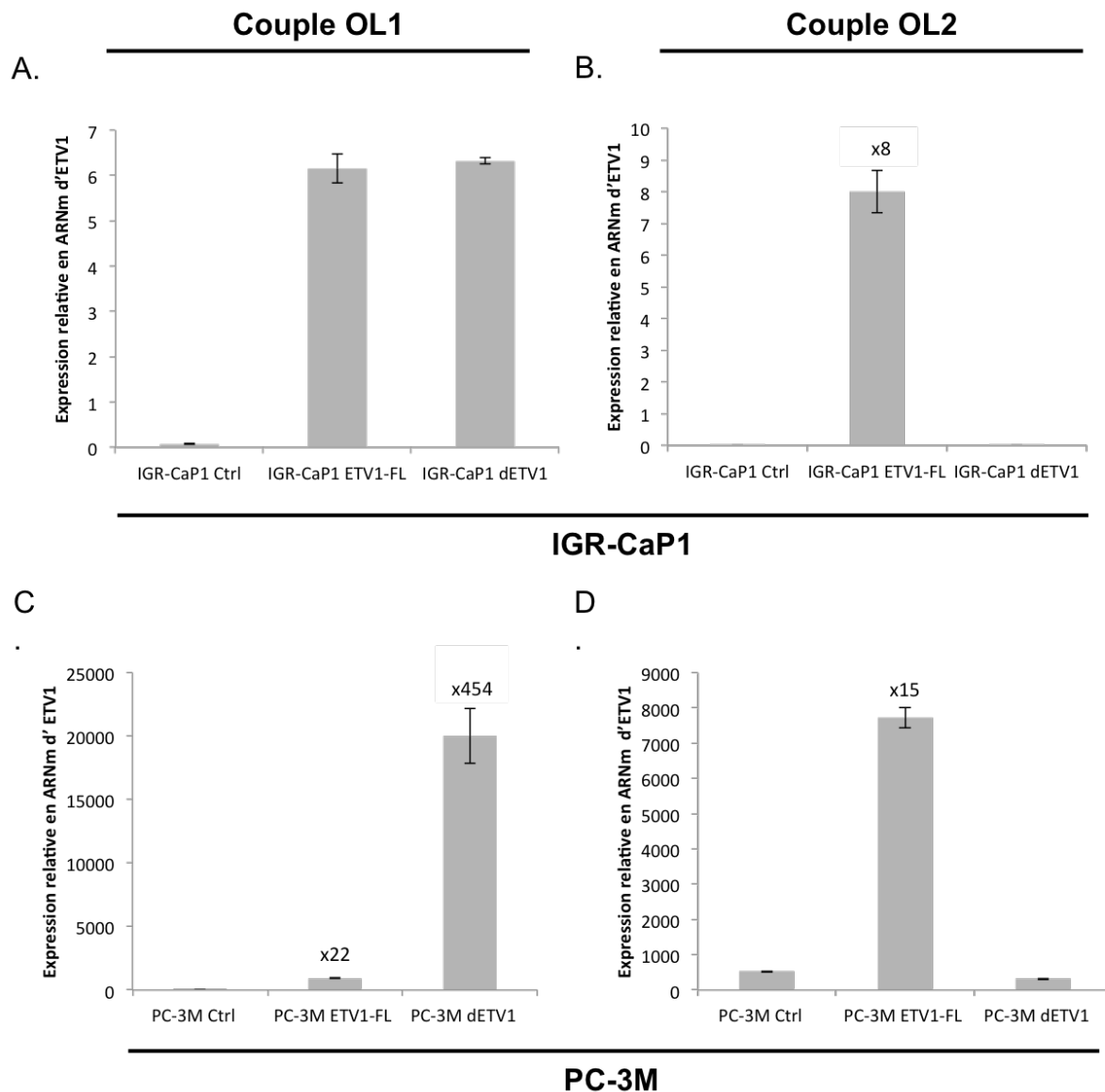


Figure 30: Analyse de l'expression transcriptionnelle par Q-RT-PCR de la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1 dans les modèles cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M.

A. et B. dans la lignée IGR-CaP1 et C et D. dans la lignée PC-3M. A. et C. Utilisation du couple OL1 afin de détecter l'expression transcriptionnelle des deux formes du facteur ETV1. B. et D. Utilisation du couple OL2 afin de détecter l'expression transcriptionnelle de la forme pleine longueur d'ETV1 uniquement. L'expression en ARNm d'ETV1-FL et d'ETV1 est rapportée à celle des ARNm du gène référent GAPDH

L'utilisation du couple OL2 a permis de confirmer l'expression dans les clones IGR-CaP1 et PC-3M de la forme pleine longueur (**Piste 2**) par rapport aux cellules contrôle (**Piste 1**) et l'absence d'expression dans les clones exprimant la forme tronquée (**Piste 3**).

À partir des modèles cellulaires MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M, mis en place et validés, des tests phénotypiques *in vitro* et *in vivo* ont ensuite été envisagés afin de mettre en évidence l'implication du facteur ETV1 dans les propriétés tumorales des cellules prostatiques et leur potentiel métastatique.

- *In vitro* : tests de prolifération, migration, invasion et croissance sans ancrage
- *In vivo* : injection des cellules en intra cardiaque dans des souris immunodéficientes

3 Exploration du rôle d'ETV1 dans les propriétés des cellules prostatiques cancéreuses MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M

3.1 Cas de la répression du facteur ETV1 dans les MDA-PCa-2b

Les différents tests phénotypiques précités ont été envisagés dans cette étude avec les cellules MDA-PCa-2b mais seul le clonage sans ancrage a pu être mené à bien pour des raisons techniques. En effet, les cellules poussant sur un support recouvert de collagène, les mises au point techniques des tests de migration et d'invasion n'ont pas été concluants et n'ont pas permis de réaliser les expériences comparatives.

Les tests phénotypiques de clonage sans ancrage ont donc été effectués suite à la transfection par des MDA-PCa-2b, ce test a été effectué trois fois et on observe une faible diminution du nombre de clones dans les conditions de répression de l'expression d'ETV1 : siETV1-1 et siETV1-2 en comparaison au siCtrl mais ces résultats ne sont pas significatifs (**Figure 31**).

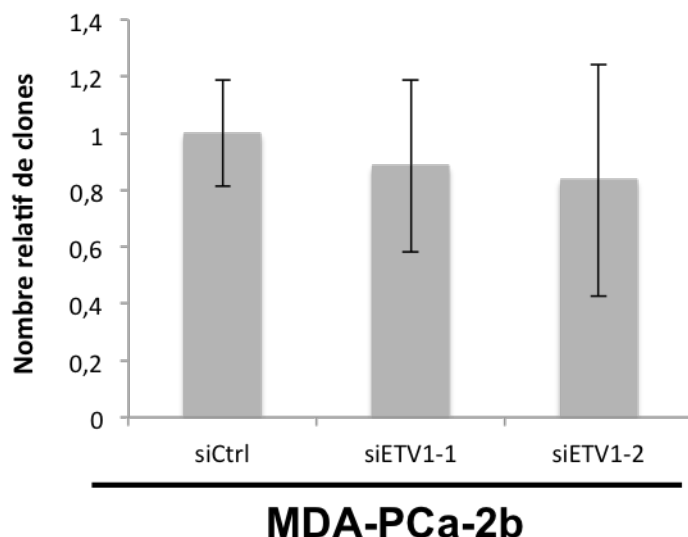


Figure 31: Analyse du potentiel clonogénique sans ancrage dans les MDA-PCa-2b réprimant l'expression d'ETV1.

Comptage du nombre relatif de clones par champs en fonction des différentes conditions : siCtrl, siETV1-1 et siETV1-2.

Même si pour le moment ces modèles de répression d'ETV1 ne sont pas au point/ utilisables pour les analyses phénotypiques, ces cellules MDA-PCa-2b dans lesquelles l'expression d'ETV1 est réprimée par siRNA ont été utilisées pour l'étude de l'expression du gène SPARC (cf [paragraphe5](#)) et seront utiles pour l'analyse transcriptomique qui sera menée par la suite.

3.2 Cas de la surexpression du facteur ETV1

L'ensemble des expériences a été mené sur les deux lignées IGR-CaP1 et PC-3M mais seules celles ayant permis l'obtention de résultats statistiquement probants seront décrites ci après.

➤ Analyse de la prolifération cellulaire

L'étude de la prolifération cellulaire a été effectuée par mesure de la confluence au cours du temps. On observe ainsi que les IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1 (ETV-FL) prolifèrent autant que les cellules IGR-CaP1 contrôle. En revanche, on observe une diminution de la prolifération des cellules surexprimant la forme tronquée d'ETV1 (dETV1) en comparaison aux cellules contrôle et ETV1-FL (**Figure 32**).

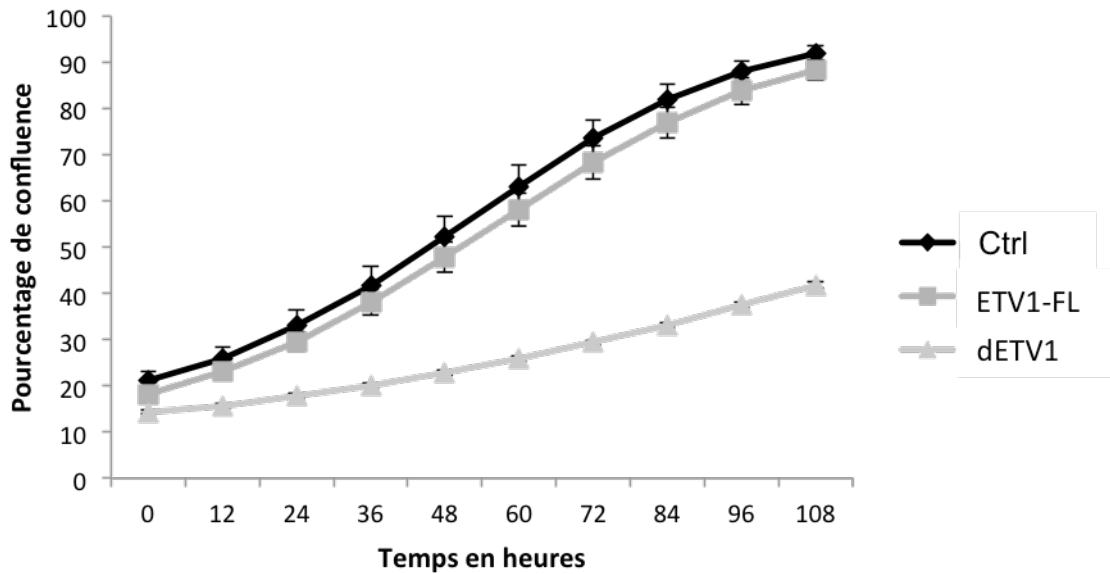


Figure 32: Analyse de la prolifération cellulaire des lignées cancéreuses IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1 au cours du temps.

La prolifération cellulaire est mesurée par le comptage du pourcentage de confluence au cours du temps et est représentée sous forme d'un graphique. La prolifération des lignées IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur (ETV1-FL) ou tronquée (dETV1) d'ETV1 est comparée à celle de la lignée IGR-CaP1 contrôle (Ctrl).

➤ Analyse de la migration cellulaire

L'analyse de la migration cellulaire a été réalisée selon deux procédés :

- Blessure par Insert IBIDI

Le test de blessure effectué grâce à un insert IBIDI montre une fermeture plus rapide de la blessure des lignées surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1 en comparaison aux cellules contrôle, que ce soit après 45h de migration pour les IGR-CaP1, ou 27h pour les PC-3M (**Figure 33 A et B**). En revanche, une migration plus lente est observée dans les lignées surexprimant la forme tronquée d'ETV1 (dETV1) en comparaison au contrôle (Ctrl), que ce soit après 45h de migration pour les IGR-CaP1, ou 27h pour les PC-3M (**Figure 33 A et B**).

Résultats Partie II

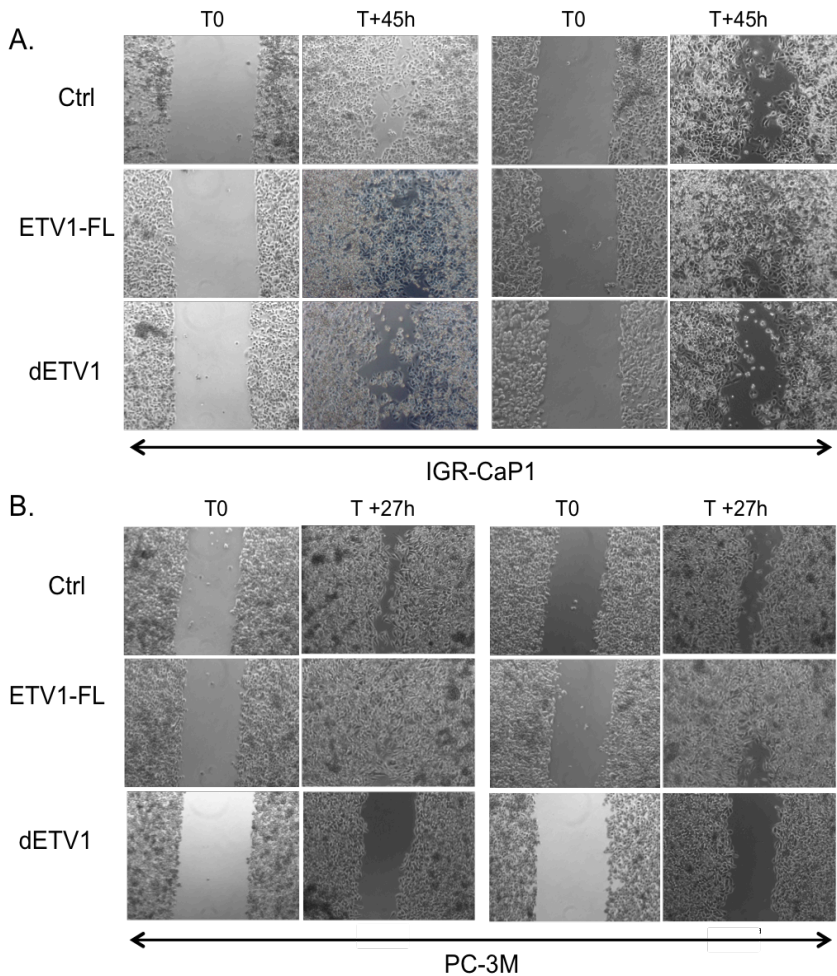


Figure 33: Analyse de la migration cellulaire des lignées cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.

Suivi de la migration des cellules ensemençées dans un insert IBIDI. A. Migration des cellules IGR-CaP1 contrôle, surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1 (ETV1-FL) ou tronquée (dETV1). B. Migration des cellules PC-3M contrôle, surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1 (ETV1-FL) ou tronquée (dETV1).

Afin de s'assurer que la différence de migration n'est pas due à une différence de prolifération cellulaire, la prolifération cellulaire a été bloquée grâce à un traitement à la Mitomycine C. Les mêmes résultats ont été obtenus c'est à dire une migration plus rapide pour les cellules IGR-CaP1 ETV1-FL en comparaison aux cellules contrôle, de même les cellules contrôle migrent légèrement plus rapidement que les cellules IGR-CaP1 dETV1 (**Figure 34**).

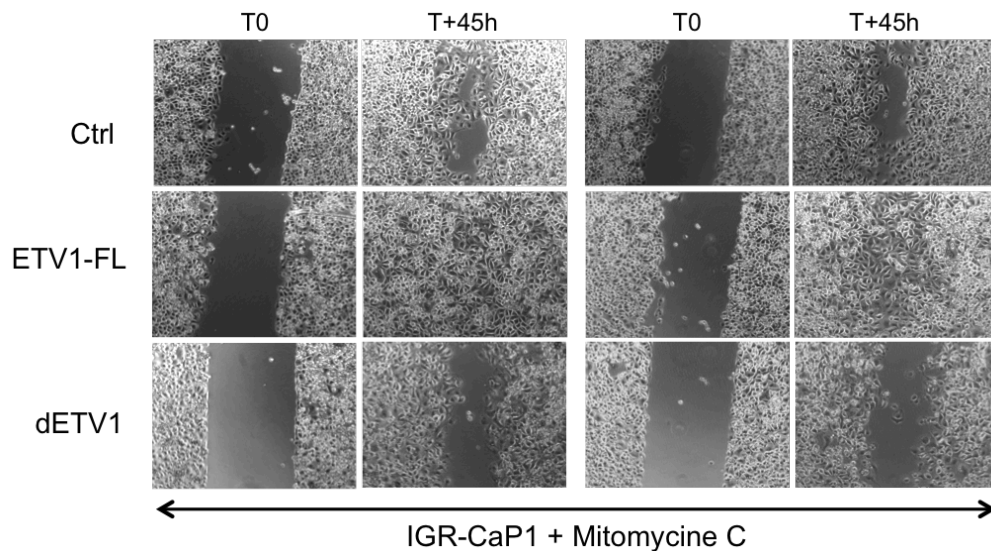


Figure 34: Analyse de la migration après inhibition de la prolifération cellulaire, des lignées IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.

Suivi de la migration des cellules ensemencées dans un insert IBIDI des cellules IGR-CaP1 contrôle, surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1 (ETV1-FL) ou tronquée (dETV1) après blocage de la prolifération grâce à un traitement à la mitomycine C.

- Migration en chambre de Boyden

Les tests de blessure ont été complétés par l'étude de la migration à travers une membrane grâce à l'utilisation d'une chambre de Boyden. On observe ainsi une migration relative plus importante dans les cellules IGR-CaP ETV1-FL en comparaison à la lignée contrôle et cela de façon significative ($p= 0,03$). De même on retrouve une nouvelle fois une migration plus importante pour la lignée contrôle en comparaison à la lignée surexprimant la forme tronquée d'ETV1 (dETV1) et ce de façon très significative ($p= 0,001$) (**Figure 35**).

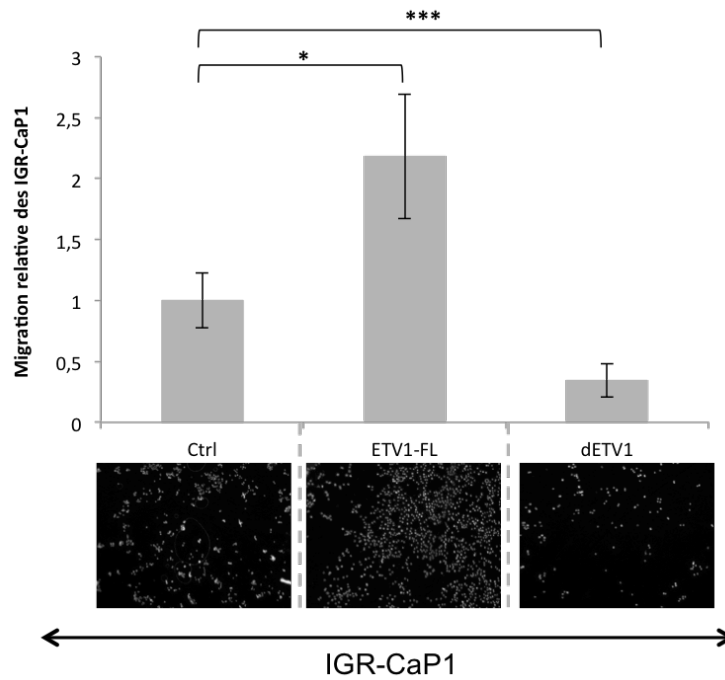


Figure 35: Analyse de la migration cellulaire par chambre de Boyden des lignées IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.

Panel du haut : représentation de la migration relative des lignées IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1 en comparaison à la lignée contrôle. Panel du bas : photographie d'un champ représentant les cellules ayant traversé la membrane pour chaque lignée.

➤ Analyse de l'invasion cellulaire

L'analyse de l'invasion cellulaire est basée sur l'utilisation d'une chambre de Boyden dont la membrane est recouverte d'une couche de Matrigel®. On observe que les cellules surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1 (ETV1-FL) présentent une capacité d'invasion significativement plus importante que les cellules contrôle (Ctrl) ($p=0,0001$) et qu'au contraire la surexpression de la forme tronquée (dETV1) diminue significativement la capacité invasive de ces cellules en comparaison aux cellules contrôle (Ctrl) ($p=0,02$) (**Figure 36**).

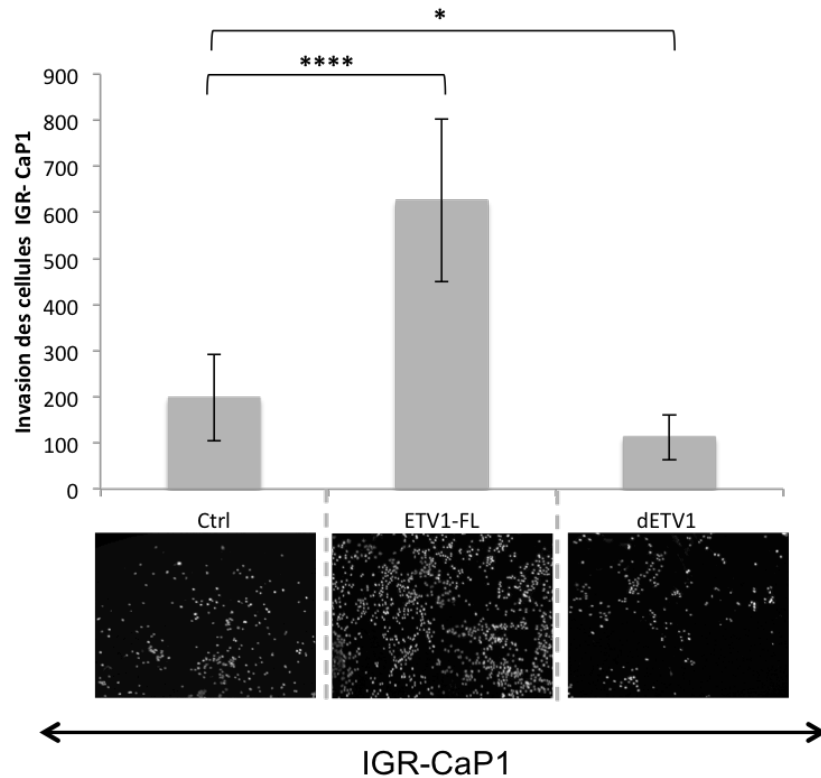


Figure 36: Analyse de l'invasion cellulaire des lignées IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.

Panel du haut : mesure de l'invasion des cellules IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur (ETV1-FL) ou tronquée (dETV1) en comparaison aux IGR-CaP1 contrôles (Ctrl). Panel du bas : photographie d'un champ représentant les cellules ayant traversé la membrane en fonction pour chaque lignée.

➤ Analyse de la croissance sans ancrage des cellules

Le but de ce test est d'observer la capacité des cellules à proliférer et former des clones en absence d'ancrage. On observe ainsi une augmentation du nombre de clones dans les lignées surexprimant ETV1 pleine longueur, que ce soit dans les IGR-CaP1 ou PC-3M et ce de façon significative ($p = 2,09 \cdot 10^{-5}$) (**Figure 37 A et B**). Pour la forme tronquée, une légère diminution de la capacité de clonage est observée dans la lignée IGR-CaP1 par rapport aux cellules contrôle avec une significativité $p = 0,003$ (**Figure 37 A**) mais cet effet n'est pas retrouvé dans les cellules PC-3M (**Figure 37 B**).

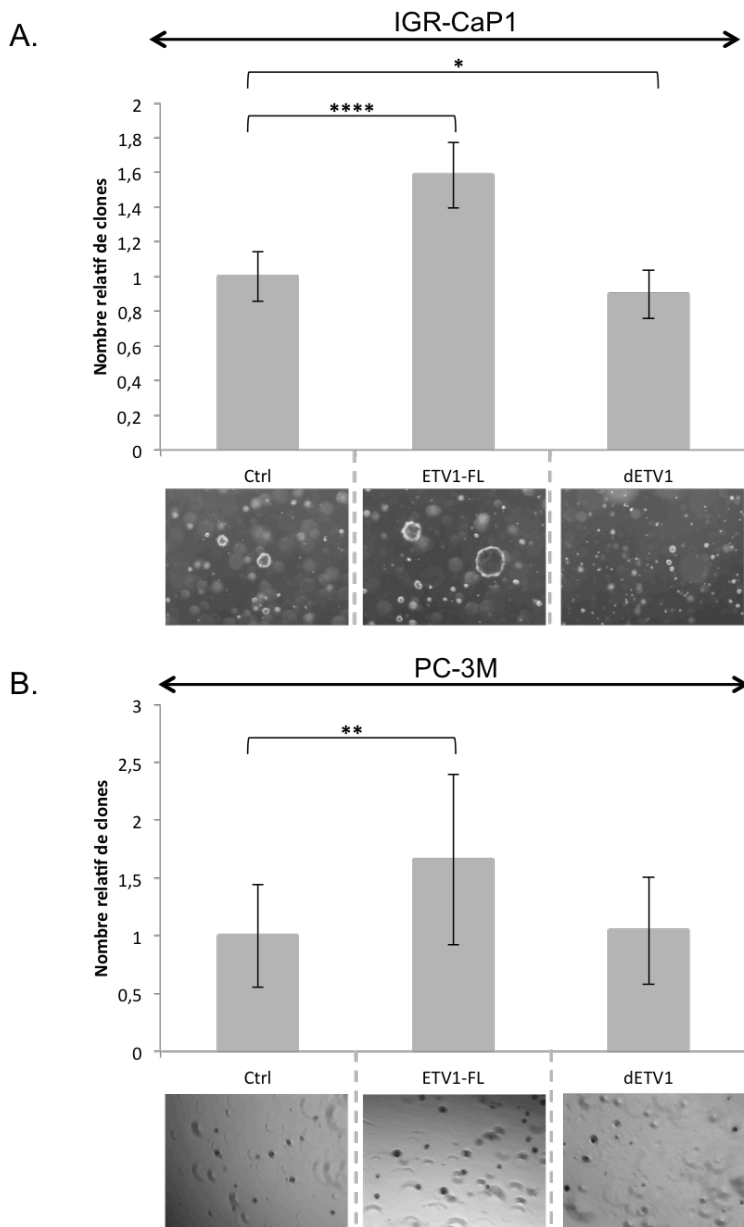


Figure 37: Analyse du clonage sans ancrage des lignées IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.

Représentation du nombre de clones formés dans les différentes lignées cellulaires surexprimant ETV1 sous sa forme pleine longueur ou tronquée. A. Pannel du haut: croissance sans ancrage des cellules IGR-CaP1. B. Pannel du haut: croissance sans ancrage des cellules PC-3M.

A. Pannel du bas: photographie d'un champs représentant les clones formés par les différentes lignées IGR-CaP1. B. Pannel du bas: photographie d'un champs représentant les clones formés par les différentes lignées PC-3M.

4. Exploration du rôle du facteur ETV1 dans la métastase prostatique

Après avoir mesuré l'influence du facteur ETV1 et de sa forme tronquée sur les propriétés cellulaires de prolifération, de migration, d'invasion et de clonage sans ancrage, nous avons entrepris d'explorer leur rôle dans la métastase prostatique. Pour cela, nous avons choisi de débiter les expériences *in vivo* d'injection intra-cardiaque à partir des cellules IGR-CaP1, surexprimant le facteur ETV1 ou sa forme tronquée, pour lesquelles les résultats des tests phénotypiques *in vitro* sont les plus aboutis.

Résultats Partie II

Afin d'obtenir des résultats statistiquement représentatifs, nous avons prévu d'injecter au final 10 souris pour chaque condition (Témoin/ Pleine longueur/ Tronquée). Malheureusement, lors des différentes expériences d'injection, la mortalité des souris s'est avérée importante malgré la bonne pratique et maîtrise de la technique d'injection intra-cardiaque. La mortalité des souris est apparue à différents moments de l'expérimentation: avant et pendant l'anesthésie, au moment de l'injection ou dans les minutes la suivant, mais aussi quelques jours après celle-ci. En effet, comme on peut le voir dans le **Tableau 9**, un total de 72 souris a été injecté et seules 19 ont survécu durant les 12 semaines, c'est à dire jusqu'au jour du sacrifice.

Un bilan détaillant le nombre de souris étant arrivées au terme de l'expérimentation ou mortes est détaillé ci-dessous et récapitulé dans le **Tableau 9**.

- Souris injectées avec la lignée IGR-CaP1 contrôle : 3 souris ont survécu jusqu'à la fin de l'expérimentation et ont pu être analysées. 21 sont mortes avant la fin de l'expérimentation.
- Souris injectées avec la lignée IGR-CaP1 ETV1-FL : 8 souris ont survécu jusqu'à la fin de l'expérimentation et ont pu être analysées. 22 sont mortes avant la fin de l'expérimentation.
- Souris injectées avec la lignée IGR-CaP1 dETV1: 8 souris ont survécu jusqu'à la fin de l'expérimentation et ont pu être analysées. 10 sont mortes avant la fin de l'expérimentation.

Tableau 9: Bilan des injections intra-cardiaque des cellules IGR-CaP1 Ctrl, pleine longueur et tronquée en termes de viabilité des souris.

	Ctrl		ETV1-FL		dETV1	
	Vivante	Morte	Vivante	Morte	Vivante	Morte
Total	3	21	8	22	8	10

Résultats Partie II

Suite aux 12 semaines les souris ont été sacrifiées, puis disséquées afin de récupérer l'ensemble des os constituant la souris (pattes avant, pattes arrière, queue, tête, colonne vertébrale, cages thoraciques). L'ensemble des ossements a été placé dans le Lumina afin d'observer la présence ou non de « spots » bioluminescents correspondant à la formation des métastases.

Lors de la dissection des souris chaque organe a été observé macroscopiquement afin de déceler la présence potentielle d'autres métastases.

➤ Bilan de l'injection des cellules contrôles IGR-CaP1 Ctrl

Sur les 21 souris injectées avec la lignée IGR-CaP1 contrôles (Ctrl), seulement trois ont survécu jusqu'au sacrifice en semaine 12. Après dissection et visualisation de l'ensemble des os des souris IGR-CaP1 contrôle (Ctrl), des spots bioluminescents sont présents dans une souris sur les trois (**Figure 38**). Ces spots sont localisés au niveau des pattes avant, arrière et de la queue (**Figure 38 souris 1**). Ainsi, on observe la présence au total de deux pattes avant présentant des métastases osseuses sur un total de six, de deux pattes arrière présentant des métastases osseuses sur un total de six, aucune tête ne présente des métastases osseuses sur les trois et une queue présente des métastases osseuses sur un total de trois.

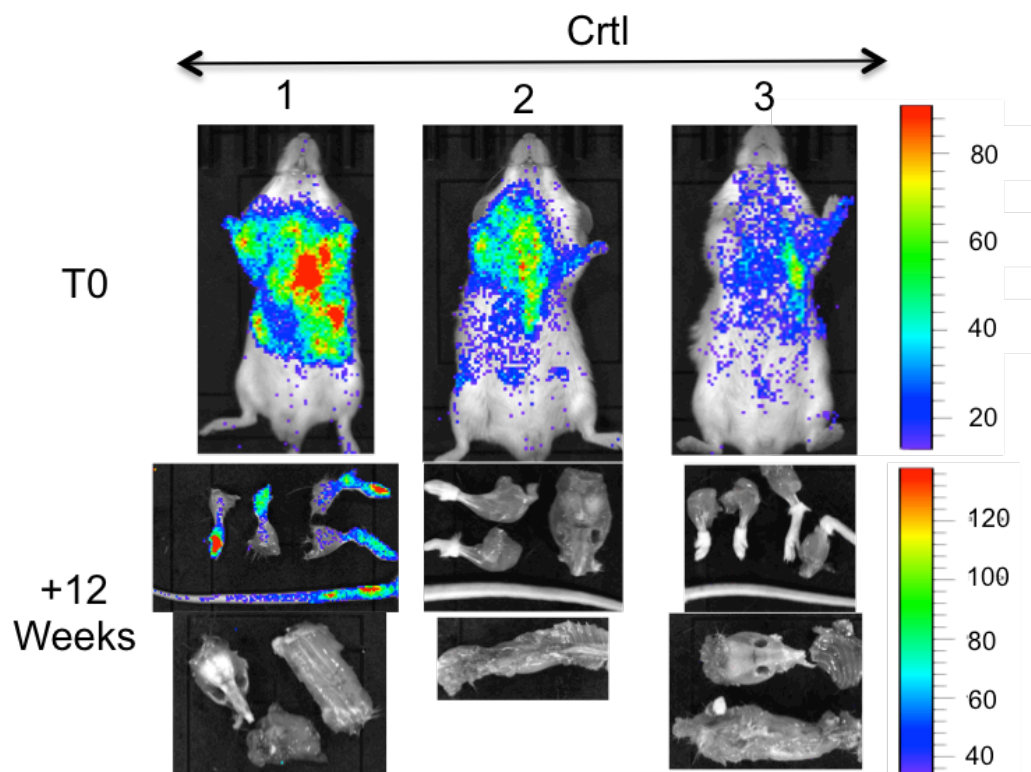


Figure 38: Observation en bioluminescence des souris injectées en intra-cardiaque avec les cellules IGR-CaP1 contrôle.

Présentation des trois souris à T0, 30 min après l'injection pour la validation de l'injection. Puis après 12 semaines au moment du sacrifice des souris avec l'observation des différents os au Lumina afin d'observer la formation des métastases osseuses.

➤ Bilan de l'injection des cellules contrôle IGR-CaP1 ETV1-FL

Après dissection et visualisation de l'ensemble des os des souris, on observe la présence de « spots » de bioluminescence dans cinq souris (1, 2, 3, 5 et 6) sur les six. Ces spots sont localisés au niveau des pattes avant, arrière, de la tête et de la queue (**Figure 39**). Ainsi, on observe la présence au total de quatre pattes avant présentant des métastases osseuses sur un total de douze, de sept pattes arrière présentant des métastases osseuses sur un total de douze, de trois têtes présentant des métastases osseuses sur un total de six et de deux queues présentant des métastases osseuses sur un total de quatre.

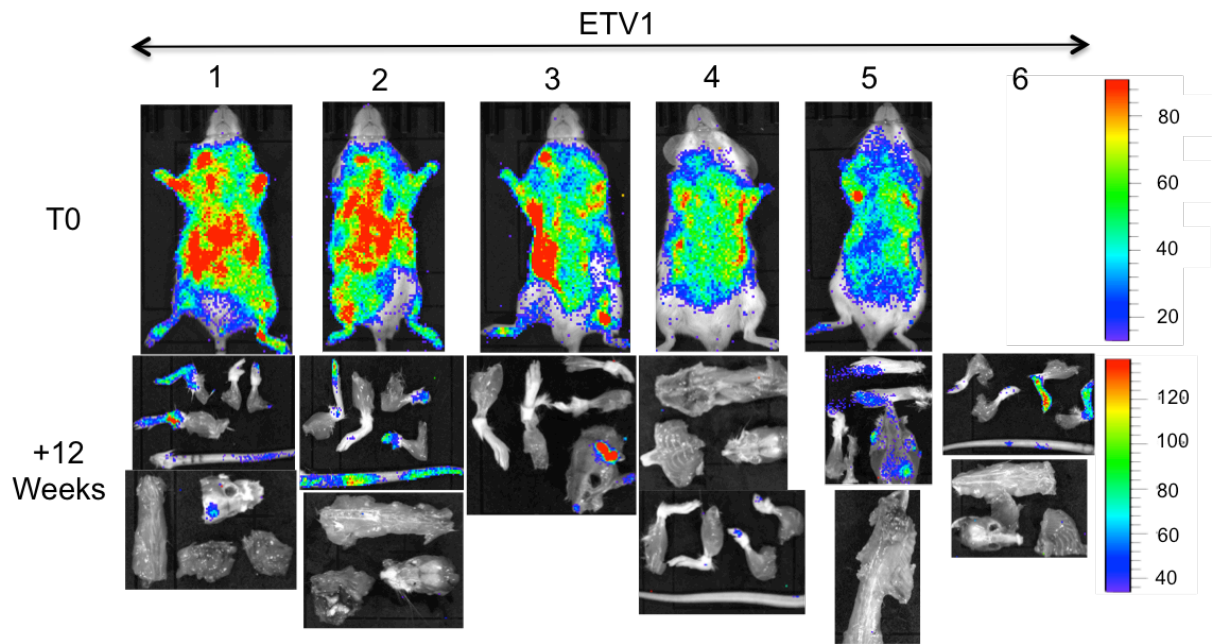


Figure 39 : Observation en bioluminescence des souris injectées en intra-cardiaque avec les cellules IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1.

Présentation des trois souris à T0, 30 min après l'injection pour la validation de l'injection. Puis après 12 semaines au moment du sacrifice des souris avec l'observation des différents os au Lumina afin d'observer la formation des métastases osseuses.

➤ Bilan de l'injection des cellules contrôle IGR-CaP1 d'ETV1

Après dissection et visualisation de l'ensemble des ossements des souris, aucun « spots » de bioluminescence (**Figure 40**) n'est observable dans aucune des huit souris, on peut néanmoins observer la présence de petits signaux beaucoup moins bioluminescents et plus petits que ceux présents chez les souris injectées avec les lignées IGR-CaP1 contrôle ou surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1.

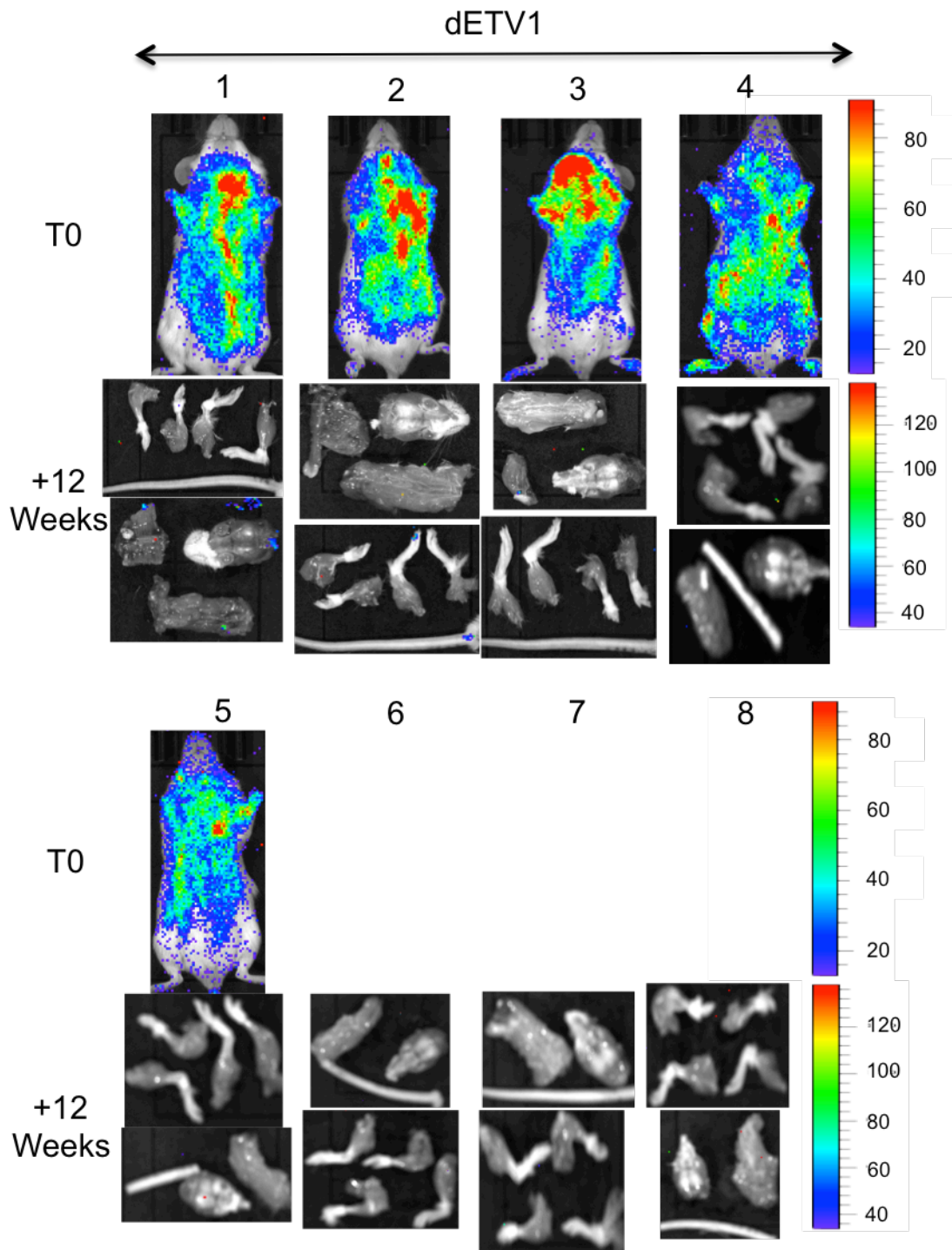


Figure 40: Observation en bioluminescence des souris injectées en intra-cardiaque avec les cellules IGR-CaP1 surexprimant la forme tronquée d'ETV1.

Présentation des trois souris à T0, 30 min après l'injection pour la validation de l'injection. Puis après 12 semaines au moment du sacrifice des souris avec l'observation des différents os au Lumina afin d'observer la formation des métastases osseuses.

Résultats Partie II

➤ Bilan global de l'injection intra-cardiaque des cellules IGR-CaP1

Le bilan est établi à partir du pourcentage de souris par condition (Ctrl, pleine longueur, tronquée) présentant des métastases, mais également en fonction du pourcentage de métastases présentes dans les différents membres analysés : pattes avant, pattes arrière, têtes, queues, cages thoraciques et colonnes vertébrales. Ainsi on observe que les souris injectées avec la lignée cellulaire IGR-CaP1 ETV1 forment le plus de métastases : 83%, contre 33% pour les souris injectées avec la lignée cellulaire IGR-CaP1 Ctrl et 0% pour les souris injectées avec la lignée cellulaire IGR-CaP1 dETV1 (**Tableau 10**). Globalement, une formation de métastases osseuses est majoritaire au niveau des pattes avant, des pattes arrière, de la tête et de la queue et aucune au niveau de la cage thoracique et de la colonne vertébrale (**Tableau 10**). On observe également des disparités en fonction de la lignée cellulaire injectée. Aucune métastase dans les souris injectées avec la lignée IGR-CaP1 surexprimant la forme tronquée d'ETV1. Cependant on observe la même fréquence d'apparition de métastases osseuses au niveau des pattes avant entre les IGR-CaP1 Ctrl et surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1, avec une fréquence de 33% (**Tableau 10**). En revanche, une majorité de métastases osseuses sont formées dans les souris injectées avec la lignée IGR-CaP1 ETV1 en comparaison aux cellules Ctrl, avec 58% de métastases dans les pattes avant, 50% dans la tête et 50% dans la queue pour la lignée IGR-CaP1 ETV1 contre 33%, 0% et 33% respectivement pour la lignée IGR-CaP1 Ctrl (**Tableau 10**).

Tableau 10: Bilan du pourcentage de métastases en fonction des souris et des différents membres (pattes arrière, pattes avant, tête, queue) dans chaque groupe de souris injectées avec différentes lignées IGR-CaP1 (Ctrl, pleine longueur, tronquée)

	Ctrl	ETV1-FL	dETV1
Pourcentage de souris présentant des métastases	33% (1/3)	83% (5/6)	0% (0/8)
Pourcentage des pattes avant présentant des métastases	33% (2/6)	33% (4/12)	0% (0/16)

Pourcentage de pattes arrière présentant des métastases	33% (2/6)	58% (7/12)	0% (0/16)
Pourcentage de têtes présentant des métastases	0% (0/3)	50% (3/6)	0% (0/8)
Pourcentage de queues présentant des métastases	33% (1/3)	50% (2/4)	0% (0/8)
Pourcentage de cages thoraciques présentant des métastases	0% (0/3)	0% (0/6)	0% (0/8)
Pourcentage de colonnes vertébrales présentant des métastases	0% (0/3)	0% (0/6)	0% (0/8)

5. Données préliminaires sur SPARC, un gène cible et potentiel relais des effets d'ETV1 dans la tumorigenèse prostatique

Dans l'attente de la réalisation d'une analyse transcriptomique complète, nous avons entrepris une recherche de gène cible dans la littérature. Suite à celle-ci nous avons identifié un premier gène cible potentiellement : SPARC. L'ostéonectine ou SPARC est une glycoprotéine non collagèneuse associée à la minéralisation des os et qui est surexprimée dans les métastases issues de tumeurs prostatiques. De plus un lien de régulation entre SPARC et ETV1 a été mis en évidence dans le carcinome pancréatique (Cf Discussion).

Afin d'observer si l'expression de SPARC (ostéonectine) pourrait être régulée par ETV1 dans la tumorigenèse prostatique et la formation de métastases osseuses nous avons analysé l'expression relative en ARNm de *SPARC* dans les lignées cellulaires prostatiques MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M que nous avons mises en place (Figure 41).

Résultats Partie II

On observe ainsi dans nos modèles cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant ETV1 pleine longueur ou tronquée une augmentation de l'expression relative en ARNm de *SPARC* en comparaison aux cellules contrôle (**Figure 41 A et B**). À l'inverse, la répression de l'expression du facteur ETV1 par ARN interférence (siETV1-1) dans la lignée MDA-PCa-2b induit bien une diminution de l'expression d'ETV1 (**Figure 41 C**), celle-ci est associée à une diminution de l'expression transcriptionnelle de *SPARC* (**Figure 41 D**).

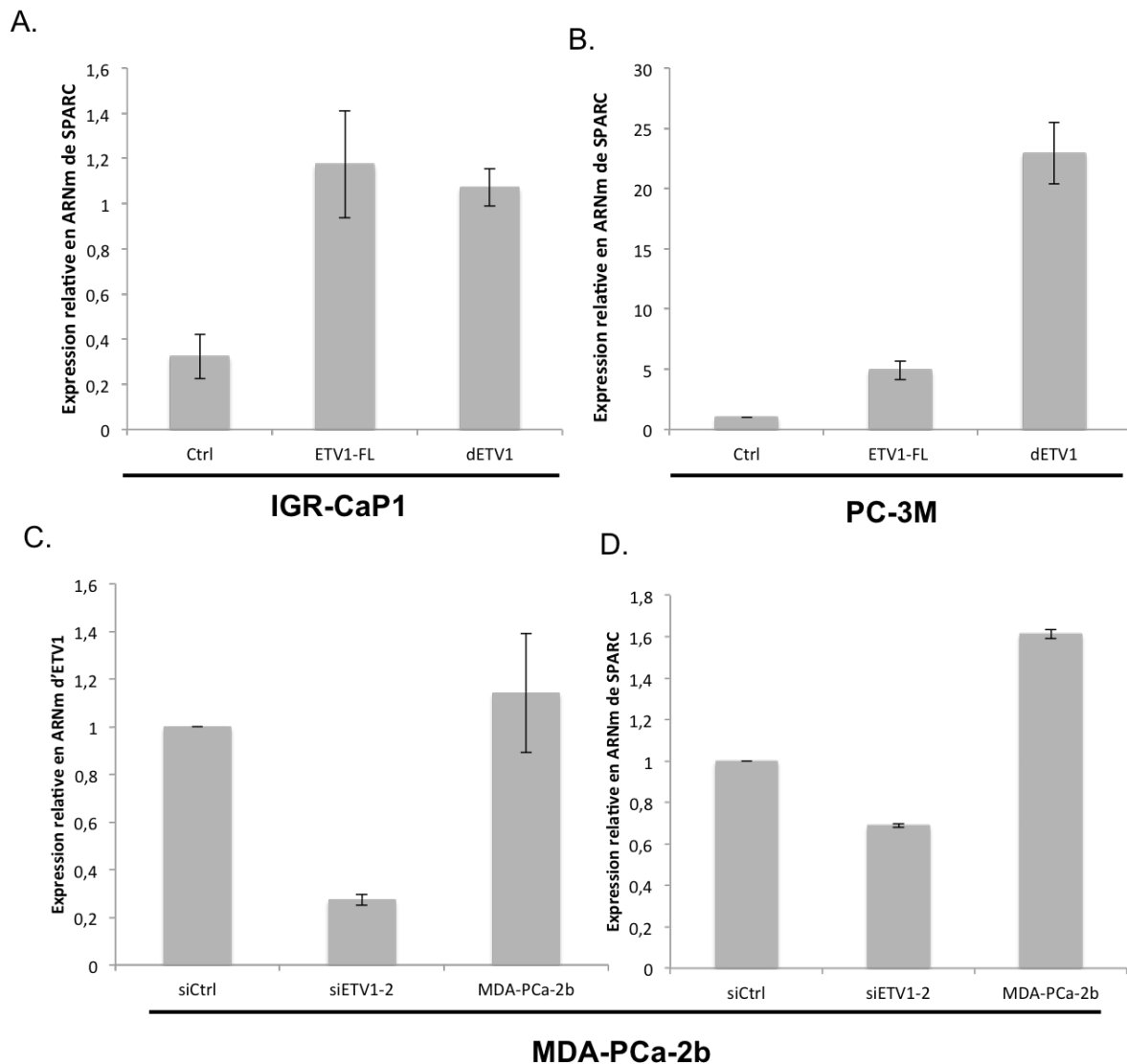


Figure 41: Analyse de l'expression relative en ARNm de SPARC dans nos modèles cellulaires MDA-PCa-2b, IGR-CaP1 et PC-3M.

L'expression de l'ARN messager de SPARC (A,B et D) est analysée par Q-RT-PCR dans nos modèles cellulaires MDA-PCa-2b (D) réprimant ETV1 et IGR-CaP1 (A) et PC-3M (B) surexprimant ETV1-FL et dETV1. L'inhibition par siRNA d'ETV1 est contrôlée par la mesure de l'expression relative de l'ARN messager d'ETV1 dans les lignées MDA-PCa-2b réprimant ou L'expression d'ETV1 et de SPARC est normalisée par l'expression du gène référent *GAPDH*.

6. Etude de la corrélation d'expression du facteur ETV1 dans une cohorte de tumeurs prostatiques

Suite aux différents résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* l'étude s'est poursuivie par la mesure de l'expression de ces différentes fusions chez l'homme, dans une cohorte de patients atteints de CaP.

6.1 Analyse de la représentativité du facteur ETV1 dans une cohorte de tumeurs prostatiques

Grâce à la collaboration avec le Dr Xavier Leroy du CHR de Lille, l'équipe dispose d'une cohorte de 85 échantillons de patients atteints d'un CaP, ainsi que 10 échantillons dit « sains » prélevés au large de la tumeur.

A partir de cette cohorte nous avons dans un premier temps évalué le nombre de patient présentant une surexpression du facteur ETV1 grâce à la technique de Q-RT-PCR. Cette analyse ayant déjà été effectuée en amont avec l'étude de l'expression de ERG nous nous sommes concentrés majoritairement sur les échantillons ne présentant pas la surexpression d'ERG.

L'étude de l'expression d'ETV1 a donc été effectuée sur 72 échantillons tumoraux prostatiques sont référencés pour les 55 premiers échantillons, l'âge, la classification TNM, le score de Gleason ainsi que le taux de PSA sont présentés en **Annexe 2**, nous sommes en attente du référencement des 30 échantillons restants. De plus sur ces 85 échantillons tumoraux, 13 sont positifs pour ERG (**Annexe 2**).

Nous avons analysé l'expression transcriptionnel d'ETV1 en ARNm par Q-RT-PCR avec le couple d'oligonucléotides (OL1) permettant la détection de la forme pleine longueur d'ETV1 dans un premier temps. Les résultats des Q-RT-PCR sont présentés en **Annexe 3**. Cette étude a permis de mettre en évidence 9 patients surexprimant le facteur de transcription ETV1 : les patients P7, P21, P26, P35, P36, P56, P75, P80 et P83 (**Tableau 11**). Sur ces 8 patients 4 présentent une surexpression d'ERG (P26, P36, P56

Résultats Partie II

et P80), et aucune surexpression d'ETV1 n'est retrouvée dans les échantillons « sains » (N1 à N10) (**Annexe 2**), les résultats des Q-RT-PCR sont présentés en **Annexe 3**.

La surexpression du facteur ETV1 est présente dans 10,5% des échantillons de CaP de notre cohorte (**Tableau 11**).

Tableau 11: Tableau regroupant les différents échantillons de CaP surexprimant ETV1.:

Ce tableau répertorie les échantillons de tumeurs prostatiques surexprimant ETV1 et dont le statut de ERG a été analysé, l'âge des patients, si c'est un premier cancer ou s'il est récurrent, la classification TNM, le score de Gleason, le taux de PSA en ($\mu\text{g/L}$) dosé au moment du diagnostic.

Cohorte	Age	Premier diagnostic (P) ou recurrence R	TNM classification			Le score de Gleason	PSA ($\mu\text{g/L}$)	ERG	ETV1
			T	N	M (site)				
P7	78	p	T4	N0	M0	4+5	429	-	+
P21	70	p	T3	N0	M0	3+4	27	-	+
P26	64	p	T2	N0	M0	3+3	7,35	+	+
P35	58	r	T4	N1	M1	4+5	50	-	+
P36			T3a	N0	M0	3+3	4,72	+	+
P56								+	+
P75								-	+
P80								+	+
P83								-	+

6.2 Analyse de la représentativité de la forme tronquée d'ETV1 dans une cohorte de tumeurs prostatiques

Suite à l'identification des différents échantillons de patients surexprimant ETV1, nous avons recherché la présence de la forme pleine longueur ou tronquée du facteur ETV1. Pour cela, une analyse de Q-RT-PCR a été effectuée avec le deuxième couple d'oligonucléotides (OL2) permettant la détection de la forme pleine longueur d'ETV1 et pas les formes tronquées de la partie 5'.

Sur les 9 échantillons ETV1 positifs, 3 échantillons présentent la forme tronquée d'ETV1 (dETV1). Ces échantillons sont les p56, p80 et p83 (**Tableau 12**). La surexpression du facteur ETV1 sous sa forme tronquée est ainsi présente dans 33,3%

des échantillons de CaP de la cohorte surexprimant ETV1. Les résultats des Q-RT-PCR sont présentés en **Annexe 4**.

6.3 Variation de l'expression de SPARC dans les échantillons de tumeurs prostatiques surexprimant ETV1

Un lien de régulation potentiel entre le facteur de transcription ETV1 et SPARC ayant été observé dans nos différents modèles cellulaires de répression (MDA-PCa-2b) ou de surexpression (IGR-CaP1 et PC-3M) d'ETV1. Nous avons, suite à cela, recherché si ce lien pouvait être retrouvé dans les échantillons tumoraux. Nous avons donc analysé l'expression transcriptionnelle de SPARC dans les échantillons de tumeurs prostatiques surexprimant la forme pleine longueur ou la forme tronquée d'ETV1. Comme le montre le **tableau 12**, cinq échantillons présentent une surexpression de SPARC: P21, P26, P35, P36 et P56. Cette surexpression est donc présente dans 55,5% des échantillons surexprimant ETV1. Les résultats des Q-RT-PCR sont présentés en **Annexe 4**.

Tableau 12: Etude de l'expression d'ETV1 pleine longueur ou tronquée ainsi que SPARC dans les échantillons ETV1 positifs.

Ce tableau répertorie les échantillons de tumeurs prostatiques surexprimant le facteur ETV1, l'âge des patients, la classification TNM, le score de Gleason, le taux de PSA en (µg/L) dosé au moment du diagnostic. Les statuts d'expression positif (+) ou négatif (-) de la surexpression du facteur ETV1 pleine longueur (FL), tronqué (dETV1) et de SPARC sont aussi référencés.

Cohorte	Age	TNM classification			Le score de Gleason	PSA (ug/L) Diagnostic	ETV1-FL	dETV1	SPARC
		T	N	M (site)					
P7	78	T4	N0	M0	4+5	429	+	-	-
P21	70	T3	N0	M0	3+4	27	+	-	+
P26	64	T2	N0	M0	3+3	7,35	+	-	+
P35	58	T4	N1	M1	4+5	50	+	-	+
P36		T3a	N0	M0	3+3	4,72	+	-	+
P56							-	+	+
P75							+	-	-
P80							-	+	-
P83							-	+	-

7. Conclusion

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie II apporte donc un début de réponse aux questions posées initialement mais ces résultats restent préliminaires et doivent donc être confortés et complétés.

Ils ouvrent néanmoins la voie à une meilleure compréhension du rôle du facteur ETV1 dans le CaP et des cibles moléculaires pouvant être impliquées.

Discussion et Conclusion Partie II

**Étude de l'implication du facteur de transcription ETV1 sous sa forme
pleine longueur ou tronquée dans la formation des métastases du
cancer de la prostate**

Discussion Partie II

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme et la deuxième cause de décès par cancer dans les pays les plus développés (Siegel, Naishadham, and Jemal 2013). Le CaP a un développement lent dont la mortalité est induite par la formation de métastases qui sont dans la majorité des cas, des métastases osseuses (Coleman 2006). En 2005, la découverte des réarrangements génomiques impliquant les facteurs de transcription Ets dans le CaP (S. A. Tomlins *et al.* 2005), soulève le questionnement quant à leur rôle dans le développement et la mise en place de ce cancer. Ces fusions impliquent dans la majorité des cas un promoteur androgéno-dépendant couplé à un facteur ETS sous sa forme pleine longueur ou tronquée. Environ 80% des CaP présentent cette fusion qui implique dans 50% des cas le facteur ERG et dans 10% des cas le facteur ETV1, qui est présent dans la moitié des cas sous sa forme pleine longueur et dans l'autre moitié sous une forme délétée des 131 premiers acides aminés en N-terminal, qu'on appelle dETV1 (Gasi *et al.* 2011; Hermans, Van Der Korput, *et al.* 2008). Actuellement peu de données font état de différence en terme d'agressivité entre les tumeurs prostatiques présentant une fusion impliquant le facteur ERG ou le facteur ETV1. De même pour les différences entre le facteur ETV1 sous sa forme pleine longueur ou tronquée.

La deuxième partie des mes travaux de thèse a donc consisté à améliorer la compréhension de l'implication du facteur de transcription ETV1 sous sa forme pleine longueur ou tronquée dans la tumorigénèse prostatique et de définir les modalités de leur participation lors de la formation des métastases osseuses. Le but à terme de cette étude sera de rechercher les spécificités d'action entre les facteurs ERG et ETV1 sous sa forme pleine longueur et tronquée.

Afin de mener à bien ce projet nous avons entrepris de développer les approches suivantes :

- Mettre en place des modèles cellulaires d'étude des propriétés tumorigéniques du facteur ETV1 par répression ou surexpression de ce facteur dans des lignées de cellules prostatiques cancéreuses sélectionnées,

Discussion Partie II

- Etudier les propriétés cellulaires de ces cellules modifiées pour l'expression du facteur ETV1 par différents tests phénotypiques *in vitro* (migration, invasion, prolifération, croissance sans ancrage, invasion),
- Etudier l'implication du facteur ETV1 dans la survenue des métastases en utilisant un modèle d'étude *in vivo*: l'injection intracardiaque dans des souris immunodéficientes,
- Rechercher les cibles moléculaires impliquées dans ces propriétés tumorales. Initialement nous avons envisagé de réaliser une étude transcriptomique comparative mais les résultats n'étant pas suffisamment avancés, nous avons focalisé, grâce à une étude bibliographique, sur le gène SPARC et débuté l'étude de sa régulation,
- Rechercher la corrélation d'expression du facteur ETV1 sous sa forme pleine longueur ou tronquée et de SPARC dans une cohorte de 85 tumeurs prostatiques primaires.

Le tout dans le but de pouvoir comparer ces résultats avec ceux déjà disponibles pour le facteur ERG.

1. Stratégies d'étude de l'implication du facteur ETV1 dans le CaP

Afin d'étudier le rôle du facteur ETV1 dans la tumorigenèse prostatique deux stratégies ont été mises en place : la répression de l'expression d'ETV1 dans la lignée MDA-PCa-2b et la surexpression du facteur ETV1 sous sa forme pleine longueur et tronquée dans les lignées IGR-CaP1 et PC-3M.

- Modèles cellulaires de répression de l'expression du facteur ETV1

Afin d'étudier la répression de l'expression du facteur ETV1, nous avons utilisé la lignée cellulaire MDA-PCa2b dans laquelle nous avons étudié le profil d'expression par Q-RT-PCR de différents facteurs ETS : ETV1, ERG, ETV4 et ETV5. Nous avons ainsi confirmé la surexpression du facteur de transcription ETV1 dans cette lignée cellulaire, les autres facteurs ERG, ETV4 et ETV5 sont quant à eux faiblement exprimés. Cependant,

Discussion Partie II

une étude de Mesquita montre que le facteur ETV4 est surexprimé dans la lignée MDA-PCa-2b grâce à la technique TLDA (TaqMan Low Density Array), en revanche il ne retrouve pas de translocation impliquant le facteur ETV4 dans cette lignée et l'utilise donc afin d'étudier l'implication du facteur ETV1 (Mesquita *et al.* 2015). Dans la lignée cellulaire MDA-PCa2b, la présence d'une fusion de gènes impliquant le facteur ETV1 a été mise en évidence en 2007 par Tomlins, qui décrit la translocation de la forme pleine longueur du facteur ETV1 présent à l'origine en position 7p21 au niveau du promoteur androgéno dépendant MIPOL1 en position 14q13 (Scott A. Tomlins *et al.* 2007). Cette surexpression est retrouvée et confirmée dans d'autres études au niveau transcriptionnel (Shiina *et al.* 2017; Mesquita *et al.* 2015) et au niveau protéique (Shiina *et al.* 2017; Selvaraj *et al.* 2014).

Les MDA-PCa2b sont isolées d'une métastase osseuse issue d'un patient atteint d'un cancer de la prostate résistant à la castration, elles sont androgéno-indépendantes et expriment un récepteur aux androgènes doublement muté (en T877A et L701H) (Navone *et al.* 1997). Nous avons donc fait le choix d'utiliser la lignée MDA-PCa-2b qui est une des rares lignées prostatiques cancéreuses avec les LNCaP à posséder une translocation ETV1. De plus, les MDA-PCa-2b sont capables de former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées en sous cutané, ainsi que des métastases de type ostéoblastique lorsqu'elles sont injectées dans l'os (J Yang *et al.* 2001; Fizazi *et al.* 2003).

Afin d'étudier l'implication du facteur de transcription ETV1 dans le CaP *via* différents tests phénotypiques *in vitro* et *in vivo*, nous avons envisager d'inhiber l'expression d'ETV1 dans la lignée MDA-PCa-2b. L'utilisation de deux siRNA ETV1, siETV1-1 et siETV1-2 montre une inhibition de plus de 80% de son expression en comparaison au siCtrl. L'utilisation d'ARN interférents en transfection transitoire, même s'ils sont très efficaces, ne nous permet pas de mener à bien notre projet. En effet, l'inhibition d'ETV1 par ARN interférents nous aurait permis d'effectuer les tests phénotypiques de courte durée (migration, invasion), cependant la lignée cellulaire MDA-PCa-2b poussant sur un support recouvert de collagène afin de limiter la formation d'amas, ce détail technique est jusqu'à présent problématique quant à l'adhésion des cellules dans les différents inserts utilisés lors de l'études de ces phénotypes. Très peu de publication montre l'utilisation de cette lignée cellulaire au niveau phénotypique *in vitro*, une publication montre cependant l'utilisation de cette lignée pour des tests de

Discussion Partie II

croissance sans ancrage, de prolifération par test MTT et d'invasion (Mesquita *et al.* 2015). Tous ces tests ne nécessitent cependant ni l'obtention d'un tapis cellulaire net comme c'est le cas dans notre étude pour le test de migration par blessure, ni dans le cas de la croissance sans ancrage et de l'invasion d'un support recouvert de collagène. Néanmoins, dans le cadre de notre étude, les autres tests envisagés (prolifération et croissance sans ancrage) étant d'une durée plus importante, ils ne peuvent être effectués avec une inhibition transitoire du facteur ETV1. Nous avons ainsi envisagé une répression stable par infection lentivirale par shRNA. Nous avons ainsi mis en place différentes constructions avec un shRNA contrôle et trois shRNA dirigés contre ETV1. Sur les trois constructions permettant l'inhibition d'ETV1, deux contiennent des séquences shETV1 publiées (Ran *et al.* 2015; Pop *et al.* 2014; Oh *et al.* 2013) et la troisième a été créée *via* le site « RNAi Consortium portal » (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/>). Les différentes constructions ont été validées par séquençage, cependant les lignées établies à l'aide de ces vecteurs rétroviraux présentaient une inhibition trop faible et très variable d'ETV1 ce qui est étonnant au vu des résultats publiés, utilisant les séquences que nous avons utilisées. À la vue de nos résultats et de la faible inhibition du facteur ETV1, les infections ont été recommencées plusieurs fois, une seconde infection des cellules déjà infectées a aussi été effectuée sans succès. On pourrait alors envisager de mettre au point des conditions plus optimales de transfectabilité des cellules productrices des lentivirus, afin d'augmenter la production de lentivirus permettant d'obtenir un taux d'infection des MDA-PCa-2b plus important. Une autre perspective envisageable serait de tester de nouvelles constructions permettant l'inhibition du facteur ETV1. En effet, l'étude de Mesquita montre une inhibition d'ETV1 d'environ 50% grâce à deux shRNA insérés dans un autre vecteur pSIREN-Retro-Q qui est différent de celui que nous avons utilisé (Mesquita *et al.* 2015). Une autre solution serait de reprendre les conditions et les séquences utilisées dans d'autres publications comme celle de P. Paulo qui montre la répression du facteur ETV1 dans la lignée cancéreuse prostatique LNCaP, lignée surexprimant elle aussi ETV1 (Paulo, Ribeiro, et al. 2012). L'utilisation de cette lignée pourrait ainsi aussi être envisagée pour mener à bien les analyses phénotypiques.

Enfin, une troisième solution d'inhibition est aussi envisageable, en parcourant la littérature, nous avons identifié une molécule permettant d'inhiber ETV1. Cette molécule s'appelle YK-4-274. Elle a été identifiée comme étant capable d'inhiber l'activité de

l'oncoprotéine EWS-FLI1 dans le Sarcome d'Ewing (Erkizan *et al.* 2009). Des études menées sur des cellules cancéreuses prostatiques surexprimant les facteurs ETV1 et ERG (LNCaP, VCaP), mettent en évidence que la petite molécule YK-4-274 est capable d'induire une inhibition de l'activité biologique de ces deux facteurs (Rahim *et al.* 2011, 2014).

- Modèles cellulaires de surexpression du facteur ETV1

Afin d'étudier les effets phénotypiques *in vitro* et *in vivo* de la surexpression du facteur ETV1 sous sa forme pleine longueur et tronquée, nous avons utilisé les lignées cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M dans lesquelles nous avons étudié dans un premier temps le profil d'expression par Q-RT-PCR de différents facteurs ETS : ETV1, ERG, ETV4 et ETV5. Nous avons ainsi confirmé les données déjà publiées montrant que le facteur ETV1 est très faiblement exprimé dans la lignée cellulaire PC-3M (Rahim *et al.* 2014) et que les autres facteurs ERG, ETV4 et ETV5 sont également faiblement exprimés dans cette lignée. Les PC-3M ont été établies à partir de la lignée PC-3. Les cellules PC-3M présentent une capacité accrue à la formation de métastases au niveau des poumons et à l'os lors d'injections intravasculaires et intracardiaques respectivement (Pettaway *et al.* 1996; Deplus *et al.* 2017). Cette lignée est hormono-indépendante, AR et PSA négative et aucune fusion ETS n'est documentée dans cette lignée. Les cellules PC-3M sont capables de former des métastases lorsqu'elles sont injectées chez la souris en injection orthotopique et intracardiaque (Jenkins *et al.* 2003). Ainsi nous avons donc fait le choix de la lignée PC3-M car elle est dotée d'un fort pouvoir métastatique.

Nous avons également montré que ces facteurs ETS, ETV1, ERG, ETV4 et ETV5 ne sont pas ou très faiblement exprimés dans la lignée cellulaire IGR-CaP1 ce qui n'avait jusqu'alors pas encore été étudié. En effet, cette lignée cellulaire a été établie en 2011 par le docteur A. Chauchereau (Chauchereau *et al.* 2011) dans le but de pallier au manque de lignée cellulaire ayant pour origine la tumeur primaire. Les IGR-CaP1 ont ainsi été établies grâce à la culture de cellules tumorales primaires de prostate humaine, elles sont AR et PSA négative (Chauchereau *et al.* 2011), et ont la capacité de former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées en sous-cutané ou en injection orthotopique et de

Discussion Partie II

former des métastases osseuses de type osteoblastique lorsqu'elles sont injectées en intratiabiale ou en intracardiaque (Al Nakouzi et al. 2012; Z. H. Lu et al. 2017).

Ainsi nous avons donc fait le choix de la lignée IGR-CaP1 qui est une des rares lignées prostatiques cancéreuses provenant d'une tumeur primaire et dotée de pouvoir métastatique lorsqu'elles sont injectées en intra-cardiaque.

À partir de ces deux lignées cellulaires n'exprimant pas le facteur ETV1, nous avons établis différentes lignées, les lignées IGR-CaP1 et PC-3M contrôle (Ctrl), les lignées IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1 (ETV1) et les lignées IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant la forme tronquée d'ETV1. Ces lignées ont été établies par infection rétrovirale après validation des différentes plasmides par séquençage. La surexpression des différentes formes du facteur ETV1 a été validée au niveau transcriptionnel par deux couples d'oligonucléotides, l'un (OL1) permettant l'amplification à la fois de la forme pleine longueur et tronquée et le second (OL2) permettant l'amplification de la forme pleine longueur uniquement. Les lignées cellulaires établies surexpriment bien au niveau transcriptionnel la forme pleine longueur et tronquée d'ETV1.

Au niveau protéique nous avons validé la surexpression du facteur ETV1 dans la lignée MDA-PCa2b ainsi que l'absence d'expression de ce facteur dans les lignées IGR-CaP1 et PC-3M. Cependant, dans la suite du projet que ce soit dans le cadre de la surexpression ou de la répression du facteur ETV1, nous ne sommes pas parvenus à détecter la protéine par Western Blot afin de valider les différents modèles cellulaires mis en place. Comme le montre le tableau de l'Annexe n°1, nous avons utilisé différentes stratégies et modifié de nombreux paramètres dans la technique de Western Blot afin de visualiser l'expression d'ETV1. Néanmoins, malgré l'utilisation de 4 anticorps différents dirigés contre ETV1, différents inhibiteurs du protéasomes, différents tampon de lyse et de blocage, différents gels, membranes de transfert, appareil de révélation et révélateur ainsi que différents tests de détection par IP (immunoprécipitation), nous ne sommes pas parvenus à détecter notre protéine d'intérêt. D'autres études publiées montrent également une difficulté dans la détection de cette protéine, c'est le cas de l'étude publié par Baena en 2013, dans laquelle ils n'ont pu détecter la protéine, ni dans par méthode d'immunohistochimie (IHC), ni par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Baena *et al.* 2013). Néanmoins d'autres études sont parvenues à observer la

protéine ETV1 sous sa forme pleine longueur (Shiina et al. 2017; T.-D. Kim et al. 2016; Mesquita et al. 2015) mais également sous sa forme tronquée dETV1 (Morsalin et al. 2015). Néanmoins, il persiste une certaine incohérence concernant la détection de cette protéine. En effet, d'autres études de la littérature présentent une expression de la protéine ETV1 dans la lignée cellulaire LNCaP (Rahim et al. 2011) alors que d'autres comme nous l'avons vu n'en sont pas capables (Baena et al. 2013 ; Vitari et al. 2011). Cela pourrait aussi expliquer nos difficultés lors de la détection du facteur ETV1 par Western Blot.

Cette incapacité d'observer la protéine ETV1 pourrait s'expliquer par la présence potentielle de la protéine COP1 qui est une ubiquitine ligase se fixant à différents facteurs de transcription comme ETV1, ETV4 et ETV5 et permettant leur dégradation (Vitari et al. 2011). Une étude menée sur la dégradation des facteurs ETS par COP1 dans le cancer de la prostate montre une incapacité de détecter la protéine ETV1 dans la lignée LNCaP dont la surexpression est validée au niveau transcriptionnel et met en évidence la dégradation du facteur ETV1 dans cette lignée (Vitari et al. 2011), ce qui pourrait expliquer notre problème de détection de la protéine ETV1. Cependant, il a été montré que lorsque la protéine ETV1 est sous sa forme tronquée de 131 acides aminés en N-terminal, celle-ci est détectée au niveau protéique par Western Blot (Vitari et al. 2011). Malheureusement que ce soit la forme pleine longueur ou tronquée nous ne sommes pas parvenus à détecter la présence du facteur ETV1 au niveau protéique dans nos différents modèles.

2. ETV1 pleine longueur et agressivité tumorale

Afin d'étudier l'implication du facteur ETV1 sous sa forme pleine longueur et tronquée dans le cancer de la prostate nous avons effectué dans un premier temps des tests phénotypiques *in vitro* de prolifération, migration, invasion et potentiel clonogénique. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation des effets pro-tumorigènes lors de la surexpression du facteur ETV1 en comparaison aux cellules contrôles. Cette augmentation est observée pour les deux lignées cellulaires IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant la forme pleine longueur du facteur ETV1 en comparaison aux cellules contrôles, au niveau de la migration et du clonage sans ancrage avec une

augmentation significative dans ces deux tests. Cet avantage est également retrouvé au niveau de l'invasion de façon significative, uniquement dans la lignée IGR-CaP1 pour le moment. Ces tests doivent encore être effectués dans les différents modèles de PC-3M surexprimant ETV1 sous sa forme pleine longueur ou tronquée. Ces résultats vont dans le sens des résultats déjà publiés dans la littérature, mettant en évidence une implication du facteur ETV1 dans la migration et l'invasion. Ces études sont effectuées dans différentes lignées cellulaires dont les LNCaP, dans lesquelles l'inhibition d'ETV1 par shRNA ou par une molécule appelée YK-4-279 permet de mettre en évidence une diminution de l'invasion des cellules (C. Cai et al. 2007b; Rahim et al. 2011, 2014; Mesquita et al. 2015). Les premiers résultats de notre étude vont donc bien dans le sens d'une implication du facteur ETV1 dans le CaP, ce qui est en corrélation avec les données de la littérature, mettant en évidence un rôle pro-tumorigène du facteur ETV1 ; non seulement dans le cancer de la prostate, où il a été montré que la surexpression d'ETV1 induit une augmentation de la migration et de l'invasion (Scott A. Tomlins et al. 2007; Mesquita et al. 2015; C. Cai et al. 2007a) et que sa surexpression est associée à un score de Gleason élevé (Attard *et al.* 2008; Shin *et al.* 2009) mais aussi dans d'autres cancers où le facteur ETV1 est aussi surexprimé comme dans le cas du carcinome rénal (Ta *et al.* 2016), dans des tumeurs gastro-intestinales (Chi *et al.* 2010) et dans le mélanome (Mehra *et al.* 2013). Cependant, lors de notre étude, nous n'avons pas observé de différences de prolifération entre la lignée IGR-CaP1 surexprimant ETV1 pleine longueur et la lignée IGR-CaP1 contrôle. Ces résultats sont également retrouvés dans une publication de D. Mesquita à partir de lignée MDA-PCa-2b, PC3 et LNCaP dans lesquelles l'expression du facteur ETV1 est inhibée (Mesquita *et al.* 2015). Les résultats phénotypiques *in vitro* dans la lignée IGR-CaP1 étant les plus aboutis nous avons étudié leur capacité à former des métastases en les injectant en intra-cardiaque dans des souris immunodéficientes. Les résultats préliminaires confirment une augmentation des effets pro-tumorigènes des lignées surexprimant le facteur ETV1 en comparaison aux lignées contrôles. En effet, les souris injectées avec les IGR-CaP1 ETV1 forment plus de métastases que les souris injectées avec la lignée contrôle. Cependant, aucune spécificité au niveau des sites de formation des métastases n'a été observée, les métastases se forment dans les deux cas au niveau des membres avant, des membres arrière, de la queue et de la tête. Ainsi, même si aucun lien n'est pour le moment clairement établi entre la formation de métastases osseuses et la surexpression du facteur ETV1, nos

Discussion Partie II

premiers résultats *in vivo* semblent indiquer une augmentation du potentiel prométastatique des cellules le surexprimant, ce qui corrobore avec les études mettant en relation les fusions ETV1 et un CaP plus agressif (Lázaro-Ibáñez *et al.* 2017; Baena *et al.* 2013; Shin *et al.* 2009).

Lors de notre étude nous nous sommes intéressés aux différences qui pouvaient potentiellement exister entre la surexpression de la forme pleine longueur (ETV1) et tronquée (dETV1) du facteur ETV1. De la même façon que pour l'étude de la forme pleine longueur, des tests phénotypiques *in vitro* de prolifération, migration, invasion et potentiel clonogénique ont été effectués. Nous avons ainsi mis en évidence une diminution significative de la migration des lignées IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant la forme tronquée d'ETV1 en comparaison des lignées surexprimant la forme pleine longueur et aux cellules contrôle. En ce qui concerne le clonage sans ancrage, l'invasion et la prolifération, on retrouve la aussi une diminution de ces effets phénotypiques des cellules surexprimant la forme tronquée d'ETV1 mais cette fois en comparaison aux lignées surexprimant la forme pleine longueur uniquement. Comme pour les IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1, la lignée IGR-CaP1 surexprimant la forme tronquée d'ETV1 a été injectée en intra-cardiaque, ces résultats préliminaires montrent une formation de métastases très faible voir nulle, ce qui confirme les résultats obtenus *in vitro* qui mettent en évidence une augmentation de l'agressivité des cellules surexprimant la forme pleine longueur et une diminution pour les cellules surexprimant la forme tronquée en comparaison aux cellules contrôle.

Peu d'études dans la littérature se sont intéressées aux différences potentielles pouvant être induites par la surexpression de la forme pleine longueur ou de la forme tronquée d'ETV1, celles-ci étant pourtant représentées chacune à la même fréquence dans le cancer de la prostate. Cependant, une étude présente certaines différences entre ces deux formes lorsqu'elles sont surexprimées dans une lignée cellulaire prostatique « normale » PNT2C2. On observe ainsi que la forme pleine longueur semble avoir une action transactivatrice plus importante que la forme tronquée, les deux variants sont capables d'induire la migration et l'invasion mais seule la forme pleine longueur est capable d'induire la croissance sans ancrage *in vitro* (Hermans, Van Der Korput, et al. 2008).

Discussion Partie II

Ces données préliminaires semblent aller dans le sens d'une différence entre la surexpression de la forme pleine longueur d'ETV1 en comparaison à la forme tronquée d'ETV1 dans le CaP, et notamment une agressivité plus importante dans le cas de la forme pleine longueur d'ETV1. Cependant, les résultats que nous avons obtenus et notamment les résultats *in vivo* sont encore à conforter. En effet, l'expérimentation animale n'a été pour le moment effectuée qu'à partir des lignées IGR-CaP1 (IGR-CaP1 Ctrl, IGR-CaP1 ETV1-FL et IGR-CaP1 dETV1) et lors de cette expérimentation un nombre de souris suffisamment significatif par condition n'a pu être obtenu. En effet, malgré la bonne pratique de la gestuelle de l'injection intra-cardiaque, nous nous sommes heurtés à une forte mortalité des souris pouvant intervenir à différentes étapes de l'expérimentation : lors de l'injection intra-cardiaque, dans l'heure suivant l'injection (avant/ pendant ou après la validation de l'injection) ou plusieurs jours/semaines après l'injection. Cette mortalité étant difficile à anticiper nous n'avons pour le moment pas réussi à obtenir les 10 souris par condition malgré nos nombreuses tentatives.

Nous avons aussi rencontré d'autres problèmes lors des suivis hebdomadaires de la bioluminescence permettant de suivre la formation, l'évolution et le tropisme des métastases. Lors de ces suivis, nous avons constaté des spots de bioluminescence au niveau du museau, des pattes avant et arrière et ce quelle que soit la lignée injectée. Ces spots étaient variablement présents ou absents d'un suivi à l'autre pour une même souris et l'apparition beaucoup plus longue qu'attendu. En effet, l'injection des cellules IGR-CaP1 dans d'autres études montre une apparition des métastases osseuses suite à une injection intra-cardiaque 5 semaines après injection (Al Nakouzi et al. 2012; Z. H. Lu et al. 2017).

3. Gène cibles d'ETV1 dans le CaP

Afin de rechercher la corrélation d'expression du facteur ETV1 sous sa forme pleine longueur ou tronquée avec de potentiels gènes cibles comme SPARC, nous avons tout d'abord recherché dans une cohorte d'échantillon de cancer de la prostate ceux surexprimant l'une ou l'autre de ces formes. Grâce à une collaboration avec le Dr Xavier

Discussion Partie II

Leroy, nous avons pu entreprendre l'analyse du statut d'expression du facteur ETV1 dans cette cohorte de 85 échantillons dont 55 sont caractérisés au niveau de l'âge du patient, du taux de PSA, du score de Gleason et de la classification TNM. Nous disposons également de 10 échantillons de tissus « normaux » prélevés au large de la tumeur. Grâce à la technique de Q-RT-PCR nous avons mis en évidence une surexpression du facteur ETV1 dans 9 échantillons. ETV1 est donc retrouvé surexprimé dans 10,5% des cas de CaP dans notre cohorte, et aucune expression notable n'est observée dans les échantillons sains. Nous avons ainsi cherché à distinguer les échantillons surexprimant la forme pleine longueur de ceux surexprimant la forme tronquée d'ETV1 à partir des échantillons de notre cohorte d'échantillons ETV1 positifs. Afin de les distinguer, nous avons utilisés deux couples d'oligonucléotides, l'un reconnaissant les deux formes pleine longueur et tronquée d'ETV1 (OL1) et le second reconnaissant uniquement la forme pleine longueur (OL2). Ainsi au sein de cette cohorte nous avons observé 66% d'échantillons surexprimant la forme pleine longueur d'ETV1 et 33% des échantillons surexprimant une forme tronquée du facteur ETV1. Cette cohorte est donc dans la norme des pourcentages de fusions retrouvés dans les pays d'Europe (Mehra *et al.* 2008; Torres *et al.* 2017). En effet, même si la majorité des études font état d'un pourcentage de fusion de 50% pour ERG et 10% pour ETV1 ces chiffres sont très variables d'une étude à l'autre, et de nombreuses publications font état d'un taux de fusions ETV1 très faible voire inexistant. Un des critères pouvant expliquer ces différences concerne les variations de l'origine ethnique des échantillons de CaP analysés. En effet de nombreuses études ont montré un taux de fusion impliquant le facteur ETV1 aux alentours de 10% (Mehra *et al.* 2008; Torres *et al.* 2017). Ce taux est retrouvé principalement dans les cohortes de patients provenant d'Amérique du nord et d'Europe. En revanche, des taux moins importants sont rapportés d'études effectuées sur des cohortes d'échantillons de CaP de patient provenant de Chine, d'Inde et du Japon ou les taux retrouvés sont proches de 1% (Ateeq *et al.* 2015; Dong *et al.* 2014; J.-J. Wang *et al.* 2012; Miyagi *et al.* 2010). Une autre critère pouvant expliquer la fréquente disparité dans le pourcentage d'échantillon ETV1 positif est que dans de nombreuses publications, les auteurs mettent en évidence uniquement les fusions impliquant ETV1 et le promoteur hormono-dépendant TMPRSS2 or, les translocations avec ce promoteur ne sont pas les plus courantes. En effet, le facteur ETV1 peut être fusionné avec des

Discussion Partie II

nombreux autres promoteurs (SLC45A3, HERV-K, C15orf21, HNRPA2B1, FLJ35294, ACSL3, EST14, HERVK17) (Rubin, Maher, and Chinnaiyan 2011; Attard *et al.* 2008).

L'étude de notre cohorte a aussi mis en évidence que sur les 9 échantillons surexprimant ETV1, 4 surexpriment également le facteur ERG. Cela, n'est pas si surprenant que ça, en effet, le cancer de la prostate est connu pour être très hétérogène et de nombreuses études font état de la présence de différents foyers au sein d'une même tumeur (Paulo, Barros-Silva, *et al.* 2012; Svensson *et al.* 2011; Attard *et al.* 2008). Cette hétérogénéité est également retrouvée au niveau des métastases où différents foyers métastatiques peuvent présenter différents réarrangements génétiques (Mehra *et al.* 2008).

L'analyse de la cohorte étant effectuée et les premiers résultats phénotypiques obtenus, nous nous sommes ensuite intéressés au gène *SPARC* comme cible potentielle du facteur ETV1. En effet, dans l'attente d'une analyse transcriptomique, une recherche au travers de la bibliographie de gène cible pouvant être potentiellement ciblés par ETV1 et pouvant participer au CaP voire à la formation de métastases nous a permis de mettre en évidence le gène *SPARC* comme pouvant être relevant dans notre étude.

Afin d'étudier ce potentiel lien de régulation nous avons analysé l'expression transcriptionnelle en ARNm de *SPARC* dans les différentes lignées cancéreuses prostatiques IGR-CaP1 et PC-3M surexprimant ETV1 pleine longueur ou tronqué et dans la lignée MDA-PCa-2b dans laquelle l'expression d'ETV1 est inhibée par transfection transitoire de siARN, ces résultats mettent en évidence une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *SPARC* dans les lignées surexprimant l'une ou l'autre forme d'ETV1 que ce soit dans les lignées IGR-CaP1 ou PC-3M. À l'inverse une diminution de l'expression en ARNm de *SPARC* est retrouvée lors de l'inhibition d'ETV1 par siRNA dans les MDA-PCa2b. Ces premiers résultats laissent suggérer une régulation de l'expression de *SPARC* par le facteur de transcription ETV1 dans les cellules prostatiques cancéreuses. En revanche, l'étude de l'expression transcriptionnelle de *SPARC* dans les échantillons de CaP positifs pour ETV1, montre que sur les 9 échantillons surexprimant ETV1, seuls 3 surexpriment également l'ostéonectine. Cependant, le faible nombre d'échantillons positifs pour ETV1 ne nous permet pas pour le moment de conclure sur le lien de régulation possible entre ETV1 et *SPARC* au sein de cette cohorte. Ces premiers résultats ne permettent pas encore d'affirmer que *SPARC* est un gène cible d'ETV1 dans

Discussion Partie II

le CaP cependant, une étude récente montre un lien entre l'expression d'ETV1 et SPARC dans le carcinome pancréatique où il est montré que la formation de métastases chez la souris est associée avec une surexpression d'ETV1 et que l'inhibition d'ETV1 induit une baisse de l'expression de SPARC (Heeg *et al.* 2016). De plus, de nombreuses publications montrent l'implication de SPARC dans le cancer de la prostate où une forte expression en ARN messagers et en protéines est retrouvée dans les cancers prostatiques métastatiques, mais aussi dans les lignées cellulaires prostatiques (Thomas *et al.* 2000). L'étude de SPARC est d'autant plus intéressante dans le cas de la prostate et du ciblage vers l'os des métastases car la sécrétion de SPARC par l'os entraînerait une augmentation de l'invasion cellulaire (N. Chen *et al.* 2007).

Afin de compléter cette étude, une étude du promoteur de SPARC et la recherche de site EBS sont envisagés ainsi qu'une étude transactivatrice du promoteur de SPARC dans le cas de la présence de ces séquences, dans le but d'étudier SPARC comme cible et relais potentiel du facteur ETV1 dans le développement du CaP.

4 Conclusions et perspectives

Les travaux effectués lors de cette deuxième partie de thèse montrent dans un premier temps des différences phénotypiques *in vitro* et *in vivo* entre la forme pleine longueur et la forme tronquée d'ETV1. En effet, on observe une augmentation des effets pro-tumorigènes du facteur ETV1 sous sa forme pleine longueur et à l'inverse une diminution de ces effets lors de la surexpression de la forme tronquée de ce facteur. De plus, aucune différence en terme de tropisme n'a pour le moment été observée entre les différentes formes d'ETV1.

Ces résultats doivent cependant être complétés. Tout d'abord *in vitro* avec les différents modèles de PC-3M pour lesquels il nous manque encore quelques résultats phénotypiques. Puis, *in vivo* avec les cellules cancéreuses prostatiques IGR-CaP1 afin de compléter les résultats déjà obtenus. Nous envisagerons ensuite l'utilisation des modèles PC-3M *in vivo* dans le but de comparer les résultats avec ceux obtenus pour la lignée IGR-CaP1 mais également afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus par l'équipe lors de l'étude de la formation des métastases osseuses induites par ERG avec la lignée PC-3M. L'ensemble de ces travaux entrant dans le cadre de définir s'il existe des

Discussion Partie II

différences potentielles en terme de ciblage métastatique et/ou d'agressivité entre la surexpression du facteur ERG ou ETV1 et ses différentes formes dans le CaP.

Dans un second temps, l'étude de l'expression d'ETV1 sous sa forme pleine longueur ou tronquée a aussi été effectuée dans des échantillons de cancer de la prostate. Celle-ci nous a permis d'identifier les échantillons surexprimant ETV1, cependant le manque de données cliniques (score de Gleason, TNM) sur certains échantillons ne nous permet pas pour le moment d'établir un lien entre l'expression des différentes formes d'ETV1 et l'agressivité des tumeurs prostatiques. Cependant, ces résultats confirment la présence de la surexpression d'ETV1 dans environ 10% des cas de cancer de la prostate. Il faudra donc envisager d'autres collaborations dans le but d'étendre la cohorte, nous permettant ainsi de travailler sur un nombre d'échantillons ETV1 positifs plus important et ainsi parvenir à des conclusions plus significatives statistiquement.

Enfin, dans un troisième temps, la partie du projet portant sur l'étude des différences potentielles en terme de régulation de gènes cibles lors de la formation de métastases induites par la surexpression du facteur ERG et/ou ETV1, une étude transcriptomique va être effectuée très prochainement à partir des lignées cellulaires IGR-CaP1 surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1, pour lesquelles nous avons obtenu pour le moment le plus de résultats *in vitro* et *in vivo*. Cette analyse transcriptomique permettra aussi de comparer les différences potentielles de gènes cibles entre les cellules surexprimant la forme pleine longueur ou tronquée d'ETV1.

En attendant cette étude transcriptomique, une recherche de gènes pouvant être régulés par ETV1 et impliqués dans la formation des métastases nous a permis de mettre en évidence le gène *SPARC* comme candidat potentiel. L'étude de l'expression en ARNm de *SPARC* met en évidence un potentiel lien de régulation de *SPARC* par le facteur ETV1. En effet, l'expression de *SPARC* varie dans le même sens que celle d'ETV1 dans nos différents modèles cellulaires surexprimant ou réprimant ce facteur de transcription. Cette corrélation n'est cependant pas retrouvée dans les échantillons de cancer de la prostate, mais le nombre d'échantillons relevant n'est pas significatif.

Cette partie du projet nécessite une analyse plus approfondie du promoteur du gène *SPARC* afin de définir les modalités de régulation par le facteur ETV1 et d'entreprendre

Discussion Partie II

l'étude du gène *SPARC* en tant que relais du facteur ETV1 dans la formation des métastases osseuses du cancer de la prostate.

Ce début de projet est encourageant et soulève de nombreuses questions qui restent encore à étudier. La poursuite des tests *in vivo* ainsi que l'étude transcriptomique permettront d'éclaircir les différences potentielles en terme de gènes cibles entre le facteur ERG et le facteur ETV1 et l'identification de gènes pouvant servir à améliorer la compréhension des mécanismes mis en place et susceptibles d'être utilisés comme outils de diagnostic ou cibles thérapeutiques potentielles lors de la détection de CaP ETV1 ou ERG positif. Le tout dans l'objectif d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients présentant un CaP surexprimant les facteurs de transcription ETS ERG ou ETV1.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La famille de facteurs de transcription PEA3 appartenant à la grande famille des facteurs de transcription Ets est composée de trois membres ETV1, ETV4 et ETV5. Ces facteurs participent à de nombreux processus physiologiques comme la formation osseuse, la fertilité, la placentation, le développement du système nerveux et l'organogenèse. Cette implication dans ces processus physiologiques passe par l'expression de ces facteurs PEA3 à différents stades du développement embryonnaire mais également chez l'adulte. Ainsi, les facteurs ETV1, ETV4 et ETV5 avec la coopération d'autres coactivateurs ou corepresseurs, influencent le transcriptome et modulent très précisément la transcription des gènes de différentes manières. Cependant la surexpression d'un de ces facteurs induit une altération de l'expression de nombreux gènes pouvant conduire au développement de cancer, comme c'est le cas dans les cancers colorectaux, gastriques, ovariens, pulmonaires, de la peau et le cancer du sein entre autres. De plus cette surexpression peut être induite par la translocation de ces facteurs PEA3 comme c'est le cas dans le Sarcom d'Ewing et le cancer de la prostate.

La connaissance des mécanismes d'action de ces facteurs PEA3 est donc un élément important à considérer pour la compréhension des mécanismes impliqués lors de la mise en place et du développement du cancer. Ainsi nous nous sommes intéressés à l'implication de deux de ces facteurs PEA3, ETV4 et ETV1 dans le contexte de deux cancers différents, le cancer du sein et le cancer de la prostate respectivement. Ces deux cancers ont la particularité d'être des cancers hormono dépendants et sont les cancers ayant l'incidence la plus élevée chez la femme pour le cancer du sein et chez l'homme pour le cancer de la prostate.

Dans le cadre de notre première étude, nous avons étudié le rôle de la métalloprotéase MMP13 en tant que gène cible et relais potentiel du facteur ETV4 dans la tumorigenèse mammaire. Cette étude a permis de mettre en évidence la régulation de l'expression de MMP13 par ETV4 grâce à l'étude de son promoteur, ainsi qu'au niveau transcriptionnel et protéique. Nous avons ensuite montré par différents tests phénotypiques *in vitro* de mesure de la migration, de la prolifération, de l'invasion cellulaires et de clonage sans ancrage, que le facteur ETV4 participe à la tumorigenèse mammaire et que la métalloprotéase MMP13 agit en tant que relais de celui-ci. En effet, lors de la surexpression de MMP13 ou de sa répression dans un contexte de surexpression d'ETV4, nous avons mis en évidence sa contribution aux effets pro-

tumorigènes *in vitro*. Cette approche a été complétée *in vivo* via l'injection en sous cutanée des cellules dans des souris immunodéficientes, ce qui a permis de mettre en évidence de la même façon que lors des tests *in vitro*, que MMP13 est un médiateur de l'activité pro-tumorigène du facteur ETV4. L'analyse de l'expression de *MMP13* et *ETV4* dans une cohorte de 456 échantillons de cancer du sein a permis de montrer que la surexpression concomitante du facteur ETV4 et de la métalloprotéase MMP13 est associée à un cancer du sein de mauvais pronostic en termes de survie.

Ainsi ce premier projet a permis de définir que MMP13 agit en tant que relais du facteur ETV4 dans la tumorigenèse mammaire.

Dans le cadre de notre seconde étude, l'approche que nous avons développée porte sur le rôle du facteur ETV1, dans la progression du cancer de la prostate dans le but de rechercher les gènes cibles impliqués. La présence de fusions de gènes impliquant les facteurs ERG et ETV1 de la famille des ETS est très fréquente dans les cancers de la prostate et représente environ 50% et 10% des cas respectivement. Afin d'améliorer la compréhension de l'implication de la fusion ETV1 et les différences potentielles avec le facteur ERG, différents modèles de cellules de CaP surexprimant/réprimant ETV1 ont été mis en place. Leur phénotype a été étudié *in vitro* grâce à différents tests *in vitro* mais aussi *in vivo* via l'injection des cellules en intra-cardiaque. Nous avons ainsi montré que le facteur ETV1 augmente les capacités tumorigènes de cellules cancéreuses prostatiques et qu'une forme tronquée (retrouvée de façon récurrente dans les fusions associées au CaP) a des effets opposés ; et qu'*in vivo* le facteur ETV1 induit une capacité de formation de métastases osseuses plus importante que la forme tronquée. Nous avons complété cette étude par la définition de *SPARC* (codant l'Ostéonectine, une glycoprotéine matricielle) comme gène cible potentiel du facteur ETV1 et étudié le statut d'expression d'ETV1, de sa forme tronquée et de *SPARC* dans une cohorte de 88 échantillons de cancers de la prostate et 10 échantillons de prostate « saine ».

Ainsi les résultats obtenus ont permis de confirmer le statut pro-tumorigène du facteur ETV1 dans le CaP, de définir une différence entre la forme pleine longueur et la version tronquée et de préciser l'implication d'ETV1 dans la formation des métastases osseuses du CaP.

Conclusion générale

Ces résultats préliminaires ouvrent la voie vers la recherche plus approfondie de la mécanistique liée à ces propriétés métastatiques et aux différences potentielles d'action par rapport aux fusions ERG.

En conclusion, l'altération de l'expression des facteurs PEA3 est un mécanisme important pour la recherche des mécanismes moléculaires impliqués lors du développement de nombreux cancers, pour le développement de nouveaux outils de diagnostic et la mise en place de nouvelles thérapies.

ANNEXES

Annexes 1: Différentes stratégies mises en place pour la détection de la protéine ETV1

Changement	Détails
Anti-corps	<ul style="list-style-type: none"> - Santa Cruz (C-20) sc1953 - Santa Cruz (H-70) sc28681 - Santa Cruz 1C8B6 - Abcam 81086
Tampon blocage	<ul style="list-style-type: none"> - Lait - BSA
Gel de migration	<ul style="list-style-type: none"> - Gel 10% fait maison - Gel 10% pré coulé Bio Rad
Membrane de transfert	<ul style="list-style-type: none"> - Nitrocellulose - PVDF
Inhibition du protéasome	<ul style="list-style-type: none"> - ALLN - MG132
Tampon de lyse	<ul style="list-style-type: none"> - RIPA - IPH - Extraction nucléaire
Méthode alternative	<ul style="list-style-type: none"> - Immunoprécipitation

Annexes 2: Tableau regroupant les différents échantillons de CaP et normaux.

Ce tableau répertorie les échantillons de tumeurs prostatiques allant de P1 à P85 ainsi que les échantillons sains allant de N1 à N10, l'âge des patients, si c'est un premier cancer ou s'il est récurrent, la classification TNM, le score de Gleason, le taux de PSA en ($\mu\text{g/L}$) dosé au moment du diagnostic. Le statut d'expression positif (+) ou négatif (-) est aussi référencé.

Cohorte	Age	Premier diagnostic (P) ou recurrence R	TNM classification			Le score de Gleason	PSA ($\mu\text{g/L}$) Diagnostic	ERG	ETV1
			T	N	M (site)				
P1	67	p	T3	N0	M0	4+3	6,54	+	-
P2	71	p	T3	N0	M0	4+3	5,5	+	-
P3	63	p	T2	N0	M0	4+3	7,7	-	-
P4	60	p	T2	N0	M0	3+3	4,51	+	-
P5	61	p	T2	N0	M0	3+3	2,7	+	-
P6	72	p	T2	N0	M0	3+4	4,4	+	-
P7	78	p	T4	N0	M0	4+5	429	-	+
P8	67	p	T2	N0	M0	3+4	7,5	+	-
P9	62	p	T2	N0	M0	3+4	7,21	+	-
P10	64	p	T3	N0	M0	4+5	13,1	+	-
P11	56	p	T2	N0	M0	4+3	6,54	+	-
P12	67	p	T3	N0	M0	5+3	5,9	+	-
P13	75	p	T3	N0	M0	3+4	7,94	+	/
P14	71	p	T2	N0	M0	4+3	0,13	+	/
P15	49	p	T3	N0	M0	3+4	224	-	-
P16	61	p	T2	N0	M0	3+4	9,5	+	-
P17	63	p	T3	N0	M0	3+4	10	+	-
P18	54	p	T2	N0	M0	3+4	5,4	+	-
P19	58	p	T3	N0	M0	4+3	6,9	+	-
P20	70	p	T3	N0	M0	4+3	5	-	-
P21	70	p	T3	N0	M0	3+4	27	-	+
P22	67	p	T2	N0	M0	3+3	5,38	+	-
P23	51	p	T3	N0	M0	4+3	7,86	+	-
P24	68	p	T2	N0	M0	3+4	9,65	-	-
P25	54	p	T2	N0	M0	3+4	7,48	+	-
P26	64	p	T2	N0	M0	3+3	7,35	+	+
P27	70	p	T3	N0	M0	3+4	5,9	+	-
P28	55	p	T3	N0	M0	3+4	7,5	-	-
P29	67	p	T3	N0	M0	3+4	5,4	+	-
P30	59	p	T3	N0	M0	3+4	4,8	+	-
P31	55	r	T3	N1	M1	4+5	120	-	-
P32	72	r	T3	N1	MX	5+4	125	+	-
P33	73	r	T3	N1	M1	5+5	563	-	-
P34	82	r	T3	N1	M1	4+4	432	+	-
P35	58	r	T4	N1	M1	4+5	50	-	+
P36			T3a	N0	M0	3+3	4,72	+	+

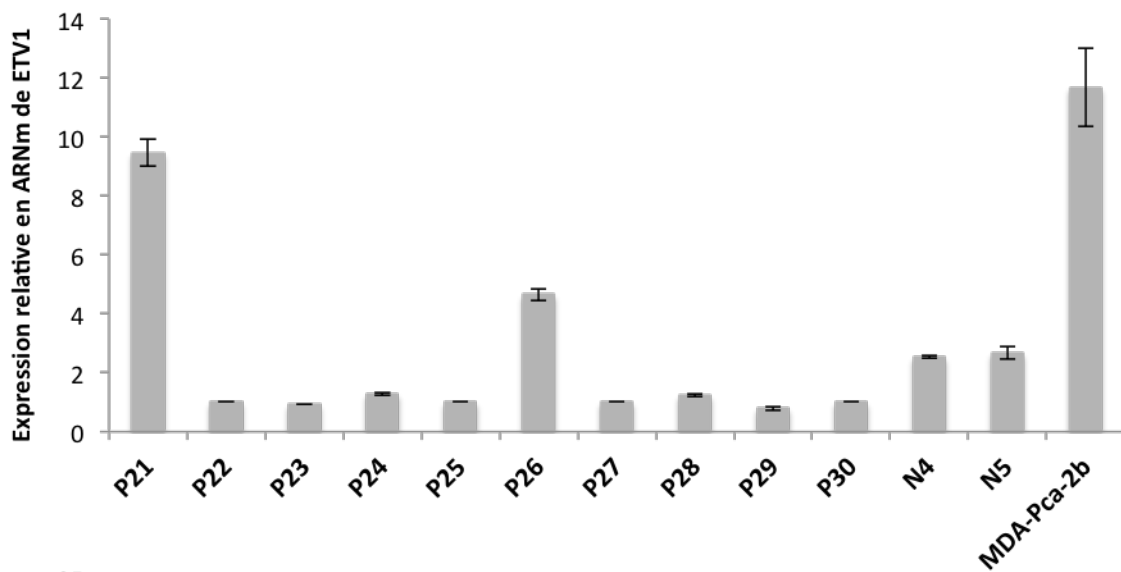
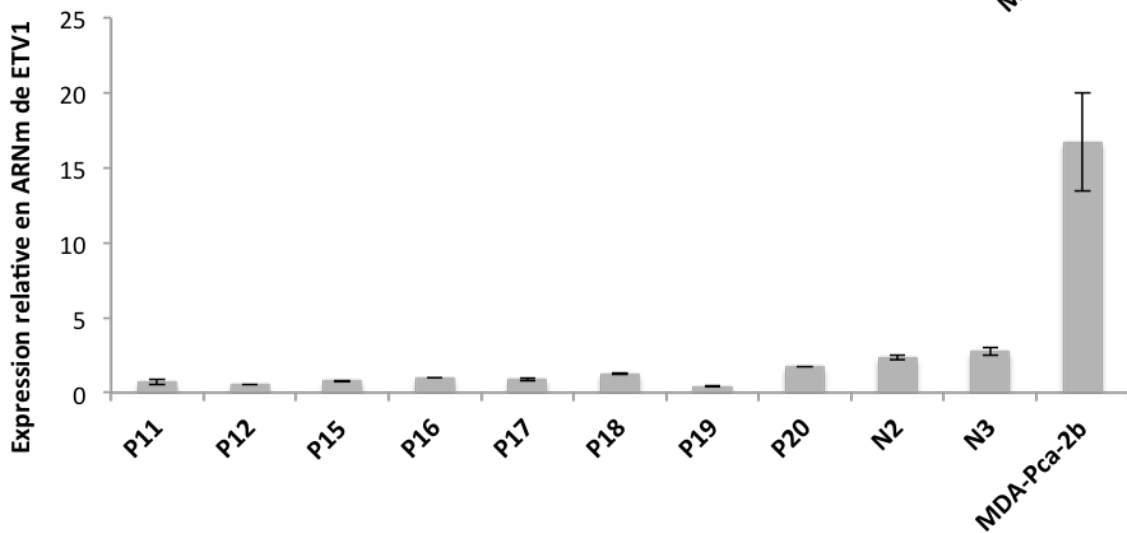
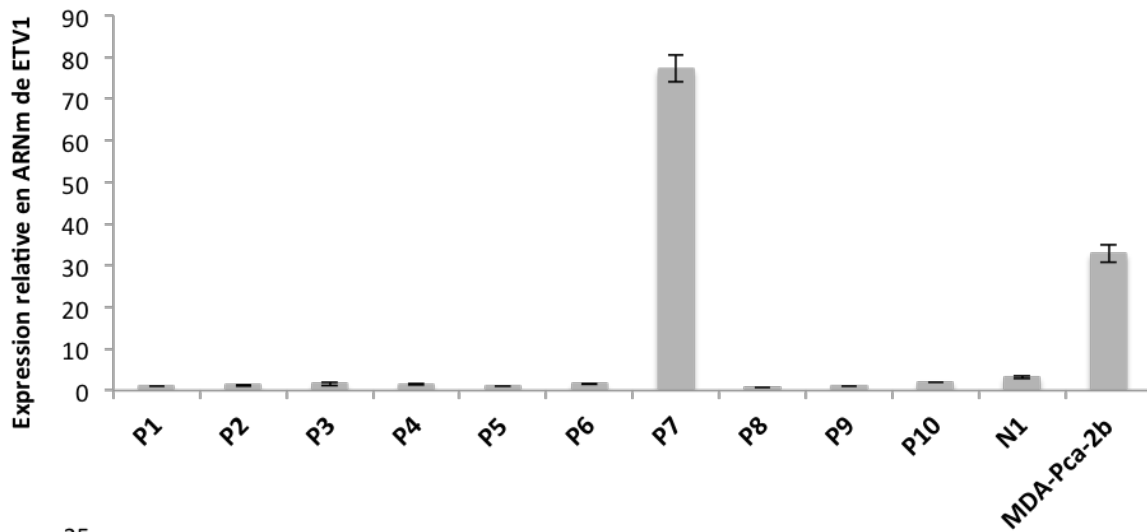
Annexes

P37			T3	N0	M0	4+4	8,2	+	/
P38			T3	N1	M0	4+5	169	+	/
P39			T2c	N0	M0	3+3	6,26	+	/
P40			T2c	N0	M0	3+3	2,13	+	/
P41			T3	N0	M0	4+4	8,8	+	/
P42			T2c	N0	M0	3+3	5,5	-	-
P43			T3	N0	M0	4+5	101	-	-
P44			T2	N0	M0	3+3	5,5	+	/
P45			T2	N0	M0	3+3	6	+	/
P46			T2	N0	M0	3+3	2,3	-	-
P47			T3a	N0	M0	4+5	60	-	-
P48			T2c	N1	M0	3+3	4,79	-	-
P49			T4	N0	M0	5+5	79,1	-	-
P50			T3b	N1	M0	4+5	80,1	-	-
P51			T3a	N0	M0	4+5	59,2	-	-
P52			T2c	N0	M0	4+5	45,1	+	/
P53			T3a	N0	M0	4+5	66,1	+	/
P54			T3	N0	M0	4+5	101	-	-
P55			T3	N0	M0	4+5	34	-	-
P56								+	+
P57								-	-
P58								-	-
P59								-	-
P60								-	-
P61								-	-
P62								-	-
P63								-	-
P64								+	-
P65								+	-
P66								+	-
P67								-	-
P68								-	-
P69								+	-
P70								-	-
P71								-	-
P72								+	-
P73								-	-
P74								-	-
P75								-	+
P76								-	-
P77								+	-
P78								-	-
P79								-	-
P80								+	+
P81								-	-
P82								-	-
P83								-	+
P84								-	-
P85								-	-

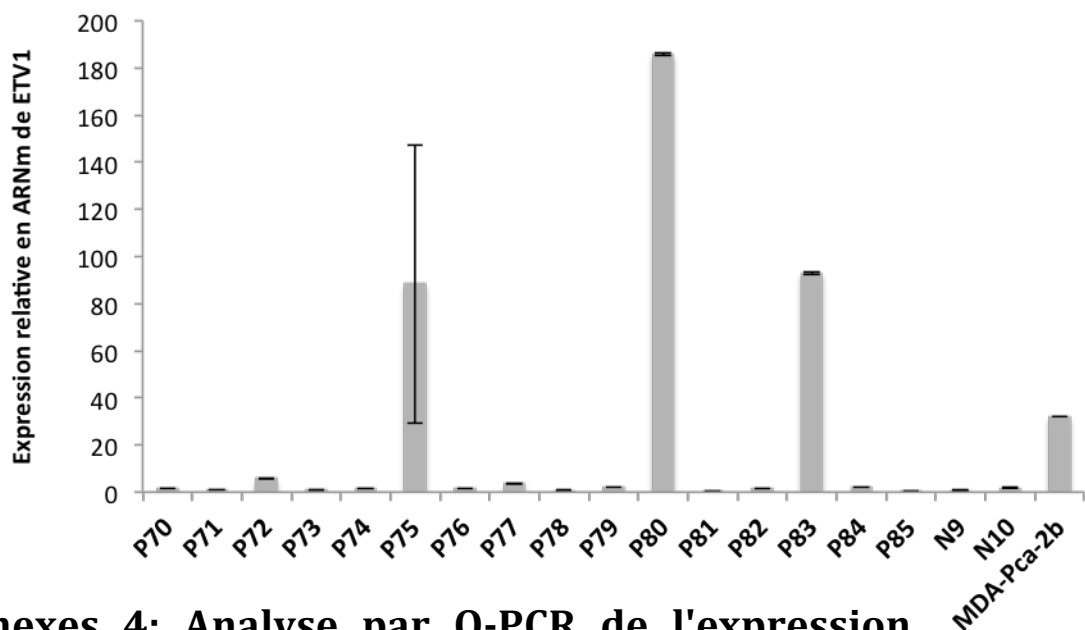
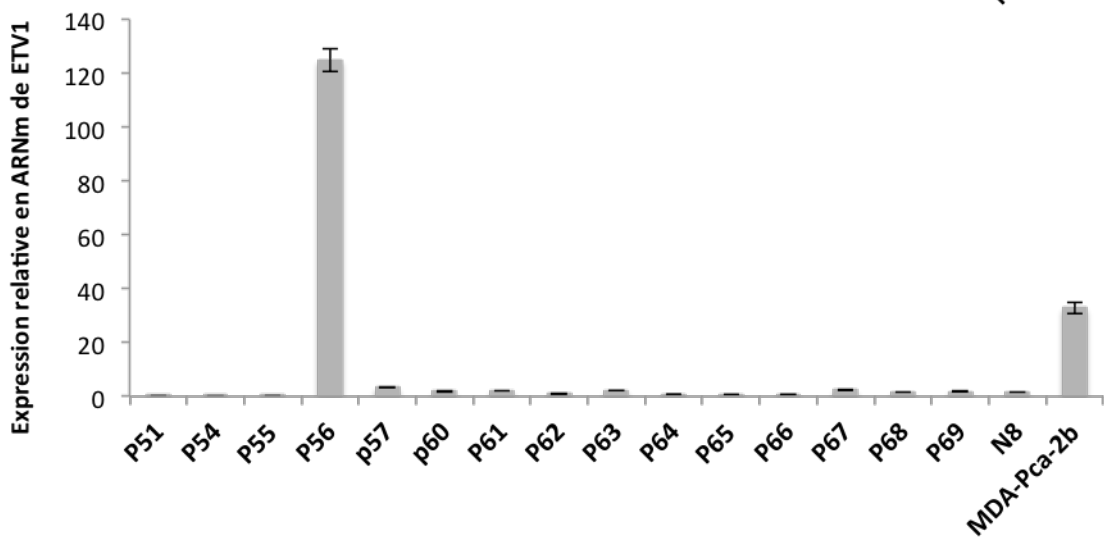
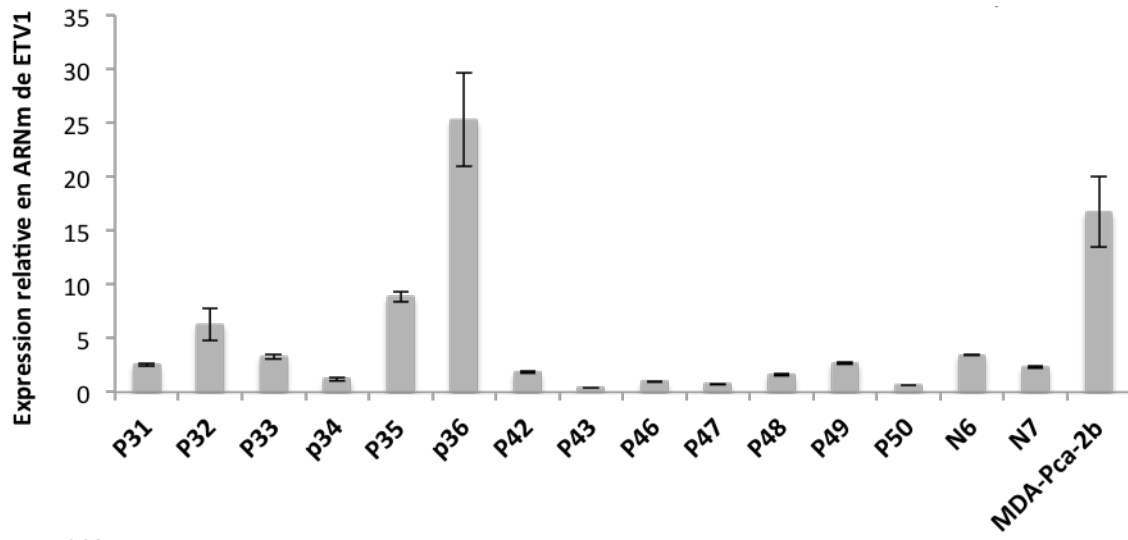
Annexes

N1	64	p	T2	N0	M0	3+3	7,67	-	-
N2	66	p	T2	N0	M0	3+4	15	-	-
N3	63	p	T3	N0	M0	3+3	2,7	-	-
N4	73	P	T2	N0	M0	3+4	8,8	-	-
N5	58	p	T1	N0	M0	2+3	6,9	-	-
N6	60	p	T2	N0	M0	3+3	4,79	-	-
N7	54	p	T2	N0	M0	3+3	7,9	-	-
N8	55	p	T2	N0	M0	3+4	12	-	-
N9	63	p	T2	N0	M0	3+3	5	-	-
N10	57	p	T2	N0	M0	3+3	6,5	-	-

Annexes 3: Analyse par Q-PCR de l'expression relative en ARNm d'ETV1 dans la cohorte de patients.

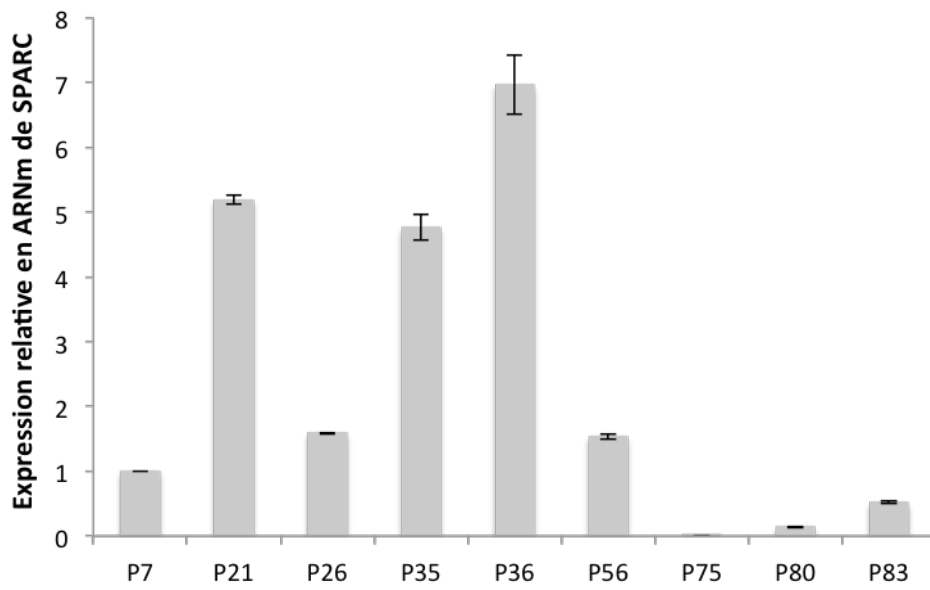
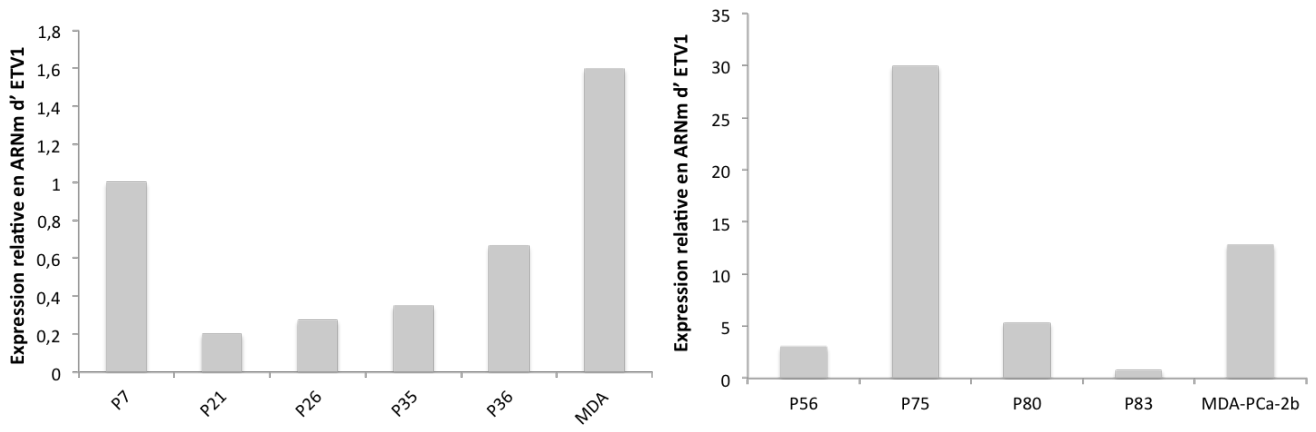


Annexes



Annexes 4: Analyse par Q-PCR de l'expression relative en ARNm d'ETV1 et de SPARC dans la cohorte de patients.

Annexes



BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Aaron, LaTayia, Omar E Franco, and Simon W Hayward. 2016. "Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia." *The Urologic Clinics of North America* 43 (3): 279–88.
- Abate-Shen, C, and M M Shen. 2000. "Molecular Genetics of Prostate Cancer." *Genes & Development* 14 (19): 2410–34.
- Abrahamsson, P A. 1999. "Neuroendocrine Cells in Tumour Growth of the Prostate." *Endocrine-Related Cancer* 6 (4): 503–19.
- Agoulnik, Irina U., and Nancy L. Weigel. 2008. "Androgen Receptor Coactivators and Prostate Cancer." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 617:245–55.
- Airola, K, N Johansson, A L Kariniemi, V M Kähäri, and U K Saarialho-Kere. 1997. "Human Collagenase-3 Is Expressed in Malignant Squamous Epithelium of the Skin." *The Journal of Investigative Dermatology* 109 (2): 225–31.
- Airola, K, T Karonen, M Vaalamo, K Lehti, J Lohi, A L Kariniemi, J Keski-Oja, and U K Saarialho-Kere. 1999. "Expression of Collagenases-1 and -3 and Their Inhibitors TIMP-1 and -3 Correlates with the Level of Invasion in Malignant Melanomas." *British Journal of Cancer* 80 (5–6): 733–43.
- "American Cancer Society; 2016." n.d. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2016/cancer-facts-and-figures-2016.pdf>.
- Amoutzias, Grigoris D, David L Robertson, Yves Van de Peer, and Stephen G Oliver. 2008. "Choose Your Partners: Dimerization in Eukaryotic Transcription Factors." *Trends in Biochemical Sciences* 33 (5): 220–29.
- Anne, Chotteau-Lelièvre, Xavier Desbiens, Pierre-Antoine Hélène Pelczar, Yvan Defossez, and De Launoit. 1997. "Differential Expression Patterns of the PEA3 Group

Bibliographie

- Transcription Factors through Murine Embryonic Development.” *Oncogene*.
- Aparicio, Ana, Robert B Den, and Karen E Knudsen. 2011. “Time to Stratify? The Retinoblastoma Protein in Castrate-Resistant Prostate Cancer.” *Nature Reviews. Urology* 8 (10): 562–68.
- Arase, Mayu, Yusuke Tamura, Natsumi Kawasaki, Kazunobu Isogaya, Ryo Nakaki, Anna Mizutani, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Kohei Miyazono, and Daizo Koinuma. 2017. “Dynamics of Chromatin Accessibility during TGF- β -Induced EMT of Ras-Transformed Mammary Gland Epithelial Cells.” *Scientific Reports* 7 (1): 1166.
- Arber, S, D R Ladle, J H Lin, E Frank, and T M Jessell. 2000. “ETS Gene Er81 Controls the Formation of Functional Connections between Group Ia Sensory Afferents and Motor Neurons.” *Cell* 101 (5): 485–98.
- Ateeq, Bushra, Lakshmi P Kunju, Shannon L Carskadon, Swaroop K Pandey, Geetika Singh, Immanuel Pradeep, Vini Tandon, et al. 2015. “Molecular Profiling of ETS and Non-ETS Aberrations in Prostate Cancer Patients From Northern India.”
- Attard, G, J Clark, L Ambrosine, I G Mills, G Fisher, P Flohr, a Reid, et al. 2008. “Heterogeneity and Clinical Significance of ETV1 Translocations in Human Prostate Cancer.” *British Journal of Cancer* 99 (2): 314–20.
- Aubin, J E. 1998. “Bone Stem Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement* 30–31: 73–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9893258>.
- Baena, Esther, Zhen Shao, Douglas E. Linn, Kimberly Glass, Melanie J. Hamblen, Yuko Fujiwara, Jonghwan Kim, et al. 2013. “ETV1 Directs Androgen Metabolism and Confers Aggressive Prostate Cancer in Targeted Mice and Patients.” *Genes and Development* 27 (6): 683–98.
- Baert, J L, D Monté, E A Musgrove, O Albagli, R L Sutherland, and Y de Launoit. 1997.

Bibliographie

- “Expression of the PEA3 Group of ETS-Related Transcription Factors in Human Breast-Cancer Cells.” *International Journal of Cancer* 70 (5): 590–97.
- Bai, Longchuan, and Shaomeng Wang. 2014. “Targeting Apoptosis Pathways for New Cancer Therapeutics.” *Annual Review of Medicine* 65 (1): 139–55.
- Baker, Andrew H, Dylan R Edwards, and Gillian Murphy. 2002. “Metalloproteinase Inhibitors: Biological Actions and Therapeutic Opportunities.” *Journal of Cell Science* 115 (Pt 19): 3719–27.
- Baker, Rebecca, Claire V Kent, Rachel A Silberman, John A Hassell, Lawrence J T Young, and Louise R Howe. 2010. “Pea3 Transcription Factors and wnt1-Induced Mouse Mammary Neoplasia.” Edited by Mikhail V. Blagosklonny. *PloS One* 5 (1): e8854.
- Balduyck, M, F Zerimech, V Gouyer, R Lemaire, B Hemon, G Grard, C Thiebaut, et al. 2000. “Specific Expression of Matrix Metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 Associated with Invasiveness of Breast Cancer Cells in Vitro.” *Clinical & Experimental Metastasis* 18 (2): 171–78.
- Barbieri, Christopher E, Sylvan C Baca, Michael S Lawrence, Francesca Demichelis, Mirjam Blattner, Jean-Philippe Theurillat, Thomas A White, et al. 2012. “Exome Sequencing Identifies Recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 Mutations in Prostate Cancer.” *Nature Genetics* 44 (6): 685–89.
- Barnett, Christine M, Michael C Heinrich, Jeong Lim, Dylan Nelson, Carol Beadling, Andrea Warrick, Tanaya Neff, et al. 2014. “Genetic Profiling to Determine Risk of Relapse-Free Survival in High-Risk Localized Prostate Cancer.” *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (5): 1306–12.
- Barrallo-Gimeno, Alejandro, and M Angela Nieto. 2005. “The Snail Genes as Inducers of Cell Movement and Survival: Implications in Development and Cancer.”

Bibliographie

Development (Cambridge, England) 132 (14): 3151–61.

Barry, Michael J., and Leigh H. Simmons. 2017. "Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality." *Medical Clinics of North America* 101 (4): 787–806.

Barski, Artem, and Keji Zhao. 2009. "Genomic Location Analysis by {ChIP}-{Seq}." *J. Cell. Biochem.* 107 (1): 11–18.

Barth, Peter J, Roland Moll, and Annette Ramaswamy. 2005. "Stromal Remodeling and SPARC (Secreted Protein Acid Rich in Cysteine) Expression in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast." *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 446 (5): 532–36.

Barthel, Steven R, Georg K Wiese, Jaehyung Cho, Matthew J Opperman, Danielle L Hays, Javed Siddiqui, Kenneth J Pienta, Bruce Furie, and Charles J Dimitroff. 2009. "Alpha 1,3 Fucosyltransferases Are Master Regulators of Prostate Cancer Cell Trafficking." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (46): 19491–96.

Bassuk, A G, R T Anandappa, and J M Leiden. 1997. "Physical Interactions between Ets and NF-kappaB/NFAT Proteins Play an Important Role in Their Cooperative Activation of the Human Immunodeficiency Virus Enhancer in T Cells." *Journal of Virology* 71 (5): 3563–73.

Behre, G, A J Whitmarsh, M P Coghlan, T Hoang, C L Carpenter, D E Zhang, R J Davis, and D G Tenen. 1999. "C-Jun Is a JNK-Independent Coactivator of the PU.1 Transcription Factor." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (8): 4939–46.

Bellahcène, A, and V Castronovo. 1995. "Increased Expression of Osteonectin and Osteopontin, Two Bone Matrix Proteins, in Human Breast Cancer." *The American Journal of Pathology* 146 (1): 95–100.

Bibliographie

- Beltran, Himisha, Roman Yelensky, Garrett M Frampton, Kyung Park, Sean R Downing, Theresa Y MacDonald, Mirna Jarosz, et al. 2013. "Targeted next-Generation Sequencing of Advanced Prostate Cancer Identifies Potential Therapeutic Targets and Disease Heterogeneity." *European Urology* 63 (5): 920–26.
- Benbow, U, J L Rutter, C H Lowrey, and C E Brinckerhoff. 1999. "Transcriptional Repression of the Human Collagenase-1 (MMP-1) Gene in MDA231 Breast Cancer Cells by All-Trans-Retinoic Acid Requires Distal Regions of the Promoter." *British Journal of Cancer* 79 (2): 221–28.
- Benjamin, Laura E., Dragan Golijanin, Ahuva Itin, Dov Pode, and Eli Keshet. 1999. "Selective Ablation of Immature Blood Vessels in Established Human Tumors Follows Vascular Endothelial Growth Factor Withdrawal." *Journal of Clinical Investigation* 103 (2): 159–65.
- Benz, C C, R C O'Hagan, B Richter, G K Scott, C H Chang, X Xiong, K Chew, et al. 1997. "HER2/Neu and the Ets Transcription Activator PEA3 Are Coordinately Upregulated in Human Breast Cancer." *Oncogene* 15 (13): 1513–25.
- Berger, Michael F, Michael S Lawrence, Francesca Demichelis, Yotam Drier, Kristian Cibulskis, Andrey Y Sivachenko, Andrea Sboner, et al. 2011. "The Genomic Complexity of Primary Human Prostate Cancer." *Nature* 470 (7333): 214–20.
- Besnard, Antoine, Nicolas Bouveyron, Vincent Kappes, Vincent Pascoli, Christiane Pagès, Nicolas Heck, Peter Vanhoutte, and Jocelyne Caboche. 2011. "Alterations of Molecular and Behavioral Responses to Cocaine by Selective Inhibition of Elk-1 Phosphorylation." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (40): 14296–307.
- Best, C. J.M., John W Gillespie, Yajun Yi, Gadiseti V R Chandramouli, Mark A Perlmutter, Yvonne Gathright, Heidi S Erickson, et al. 2005. "Molecular Alterations in Primary Prostate Cancer after Androgen Ablation Therapy." *Clinical Cancer Research* 11

Bibliographie

(19): 6823–34.

Bièche, Ivan, Sengül Tozlu, Igor Girault, Peter Onody, Keltouma Driouch, Michel Vidaud, and Rosette Lidereau. 2004. “Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-Related Transcription Factor, in Breast Tumors: Positive Links to MMP2, NRG1 and CGB Expression.” *Carcinogenesis* 25 (3): 405–11.

Billar, Julie A Y, Amylou C Dueck, Chee-Chee H Stucky, Richard J Gray, Nabil Wasif, Donald W Northfelt, Ann E McCullough, and Barbara A Pockaj. 2010. “Triple-Negative Breast Cancers: Unique Clinical Presentations and Outcomes.” *Annals of Surgical Oncology* 17 Suppl 3 (S3): 384–90.

Billingham, R C, L Dahlberg, M Ionescu, A Reiner, R Bourne, C Rorabeck, P Mitchell, et al. 1997. “Enhanced Cleavage of Type II Collagen by Collagenases in Osteoarthritic Articular Cartilage.” *The Journal of Clinical Investigation* 99 (7): 1534–45.

Billingham, R C, W Wu, M Ionescu, A Reiner, L Dahlberg, J Chen, H van Wart, and A R Poole. 2000. “Comparison of the Degradation of Type II Collagen and Proteoglycan in Nasal and Articular Cartilages Induced by Interleukin-1 and the Selective Inhibition of Type II Collagen Cleavage by Collagenase.” *Arthritis and Rheumatism* 43 (3): 664–72.

Bismar, Tarek A, Michael Dolph, Liang-Hong Teng, Shuhong Liu, and Bryan Donnelly. 2012. “ERG Protein Expression Reflects Hormonal Treatment Response and Is Associated with Gleason Score and Prostate Cancer Specific Mortality.” *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 48 (4): 538–46.

Björklund, Mikael, and Erkki Koivunen. 2005. “Gelatinase-Mediated Migration and Invasion of Cancer Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1755 (1): 37–69.

Black, Ben E., and Bryce M. Paschal. 2004. “Intranuclear Organization and Function of the Androgen Receptor.” *Trends in Endocrinology & Metabolism* 15 (9): 411–17.

Bibliographie

- Blanco, Maria J, Gema Moreno-Bueno, David Sarrío, Annamaria Locascio, Amparo Cano, José Palacios, and M Angela Nieto. 2002. "Correlation of Snail Expression with Histological Grade and Lymph Node Status in Breast Carcinomas." *Oncogene* 21 (20): 3241–46.
- Bock, Katrien De, Sandra Cauwenberghs, and Peter Carmeliet. 2011. "Vessel Abnormalization: Another Hallmark of cancer? Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications." *Current Opinion in Genetics & Development* 21 (1): 73–79.
- Boisserie-Lacroix, M., G. Hurtevent-Labrot, S. Ferron, N. Lippa, H. Bonnefoi, and G. Mac Grogan. 2013. "Correlation between Imaging and Molecular Classification of Breast Cancers." *Diagnostic and Interventional Imaging* 94 (11): 1069–80.
- Borden, P, D Solymar, A Sucharczuk, B Lindman, P Cannon, and R A Heller. 1996. "Cytokine Control of Interstitial Collagenase and Collagenase-3 Gene Expression in Human Chondrocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (38): 23577–81.
- Borràs, F E, J Lloberas, R A Maki, and A Celada. 1995. "Repression of I-A Beta Gene Expression by the Transcription Factor PU.1." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (41): 24385–91.
- Brekken, R A, and E H Sage. 2001. "SPARC, a Matricellular Protein: At the Crossroads of Cell-Matrix Communication." *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* 19 (8): 816–27.
- Britton, Edward, Connor Rogerson, Shaveta Mehta, Yaoyong Li, Xiaodun Li, the OCCAMS OCCAMS consortium, Rebecca C Fitzgerald, Yeng S Ang, and Andrew D Sharrocks. 2017. "Open Chromatin Profiling Identifies AP1 as a Transcriptional Regulator in Oesophageal Adenocarcinoma." *PLoS Genetics* 13 (8). Public Library of Science: e1006879.
- Cai, Changmeng, Chen-Lin Hsieh, Josephat Omwanicha, Zhe Zheng, Shao-Yong Chen, Jean-

Bibliographie

- Luc Baert, and Lirim Shemshedini. 2007a. "ETV1 Is a Novel Androgen Receptor-Regulated Gene That Mediates Prostate Cancer Cell Invasion." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (8): 1835–46.
- Cai, Houjian, Sanaz Memarzadeh, Tanya Stoyanova, Zanna Beharry, Andrew S Kraft, and Owen N Witte. 2012. "Collaboration of Kras and Androgen Receptor Signaling Stimulates EZH2 Expression and Tumor-Propagating Cells in Prostate Cancer." *Cancer Research* 72 (18): 4672–81.
- Callaway, Kari, William F. Waas, Mark A. Rainey, Pengyu Ren, and Kevin N. Dalby. 2010. "Phosphorylation of the Transcription Factor Ets-1 by ERK2: Rapid Dissociation of ADP and Phospho-Ets-1." *Biochemistry* 49 (17): 3619–30.
- Campo McKnight, Dianalee A, Donna M Sosnoski, Jennifer E Koblinski, and Carol V Gay. 2006. "Roles of Osteonectin in the Migration of Breast Cancer Cells into Bone." *Journal of Cellular Biochemistry* 97 (2): 288–302.
- Canalis, E, S Rydziel, A M Delany, S Varghese, and J J Jeffrey. 1995. "Insulin-like Growth Factors Inhibit Interstitial Collagenase Synthesis in Bone Cell Cultures." *Endocrinology* 136 (4): 1348–54.
- Cannata, Dara, Danielle Lann, Yingjie Wu, Sebastien Elis, Hui Sun, Shoshana Yakar, Deborah A Lazzarino, Teresa L Wood, and Derek Leroith. 2010. "Elevated Circulating IGF-I Promotes Mammary Gland Development and Proliferation." *Endocrinology* 151 (12): 5751–61.
- Carron, Emily C, Samuel Homra, Jillian Rosenberg, Seth B Coffelt, Frances Kittrell, Yiqun Zhang, Chad J Creighton, Suzanne A Fuqua, Daniel Medina, and Heather L Machado. 2017. "Macrophages Promote the Progression of Premalignant Mammary Lesions to Invasive Cancer." *Oncotarget* 8 (31). Impact Journals, LLC: 50731–46.
- Carver, Brett S, Jennifer Tran, Anuradha Gopalan, Zhenbang Chen, Safa Shaikh, Arkaitz

Bibliographie

- Carracedo, Andrea Alimonti, et al. 2009. "Aberrant ERG Expression Cooperates with Loss of PTEN to Promote Cancer Progression in the Prostate." *Nature Genetics* 41 (5): 619–24.
- Cazorla, M, L Hernández, A Nadal, M Balbín, J M López, F Vizoso, P L Fernández, et al. 1998. "Collagenase-3 Expression Is Associated with Advanced Local Invasion in Human Squamous Cell Carcinomas of the Larynx." *The Journal of Pathology* 186 (2): 144–50.
- Cha, Eugene K, and James A Eastham. 2015. "Chemotherapy and Novel Therapeutics before Radical Prostatectomy for High-Risk Clinically Localized Prostate Cancer." *Urologic Oncology* 33 (5): 217–25.
- Chang, Hui-Jen, Ming-Je Yang, Yu-Hsiang Yang, Ming-Feng Hou, Er-Jung Hsueh, and Shiu-Ru Lin. 2009. "MMP13 Is Potentially a New Tumor Marker for Breast Cancer Diagnosis." *Oncology Reports* 22 (5): 1119–27.
- Chang, Kai-Hsiung, Rui Li, Mahboubeh Papari-Zareei, Lori Watumull, Yan Daniel Zhao, Richard J Auchus, and Nima Sharifi. 2011. "Dihydrotestosterone Synthesis Bypasses Testosterone to Drive Castration-Resistant Prostate Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (33): 13728–33.
- Chantrain, Christophe F, Patrick Henriot, Sonata Jodele, Hervé Emonard, Olivier Feron, Pierre J Courtoy, Yves A DeClerck, and Etienne Marbaix. 2006. "Mechanisms of Pericyte Recruitment in Tumour Angiogenesis: A New Role for Metalloproteinases." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 42 (3): 310–18.
- Chantrain, Christophe F, Hiroyuki Shimada, Sonata Jodele, Susan Groshen, Wei Ye, David R Shalinsky, Zena Werb, Lisa M Coussens, and Yves A DeClerck. 2004. "Stromal Matrix Metalloproteinase-9 Regulates the Vascular Architecture in Neuroblastoma by Promoting Pericyte Recruitment." *Cancer Research* 64 (5): 1675–86.

Bibliographie

- Chauchereau, Anne, Nader Al Nakouzi, Catherine Gaudin, Sylvestre Le Moulec, Daniel Compagno, Nathalie Auger, Jean Bénard, et al. 2011. "Stemness Markers Characterize IGR-CaP1, a New Cell Line Derived from Primary Epithelial Prostate Cancer." *Experimental Cell Research* 317 (3): 262–75.
- Chaudhary, J, and M K Skinner. 1999. "Basic Helix-Loop-Helix Proteins Can Act at the E-Box within the Serum Response Element of the c-Fos Promoter to Influence Hormone-Induced Promoter Activation in Sertoli Cells." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 13 (5): 774–86.
- Chen, Chen, Wenjun Ouyang, Vadim Grigura, Qing Zhou, Kay Carnes, Hyunjung Lim, Guang-Quan Zhao, et al. 2005. "ERM Is Required for Transcriptional Control of the Spermatogonial Stem Cell Niche." *Nature* 436 (7053): 1030–34.
- Chen, Chong, Qiuyang Zhang, Sen Liu, Keshab R Parajuli, Yine Qu, Jiandong Mei, Zhiquan Chen, Hui Zhang, Damir B Khismatullin, and Zongbing You. 2015. "IL-17 and insulin/IGF1 Enhance Adhesion of Prostate Cancer Cells to Vascular Endothelial Cells through CD44-VCAM-1 Interaction." *The Prostate* 75 (8): 883–95.
- Chen, Nanyue, Xiang-Cang Ye, Khoi Chu, Nora M Navone, E Helene Sage, Li-Yuan Yu-Lee, Christopher J Logothetis, and Sue-Hwa Lin. 2007. "A Secreted Isoform of ErbB3 Promotes Osteonectin Expression in Bone and Enhances the Invasiveness of Prostate Cancer Cells." *Cancer Research* 67 (14): 6544–48.
- Chi, Ping, Yu Chen, Lei Zhang, Xingyi Guo, John Wongvipat, Tambudzai Shamu, Jonathan A Fletcher, et al. 2010. "ETV1 Is a Lineage Survival Factor That Cooperates with KIT in Gastrointestinal Stromal Tumours." *Nature* 467 (7317): 849–53.
- Chlenski, Alexandre, Shuqing Liu, Susan E Crawford, Olga V Volpert, George H DeVries, Amy Evangelista, Qiwei Yang, et al. 2002. "SPARC Is a Key Schwannian-Derived Inhibitor Controlling Neuroblastoma Tumor Angiogenesis." *Cancer Research* 62 (24): 7357–63.

Bibliographie

- Chotteau-Lelièvre, Anne, Xavier Desbiens, Hélène Pelczar, Pierre-Antoine Defosse, and Yvan de Launoit. 1997. "Differential Expression Patterns of the PEA3 Group Transcription Factors through Murine Embryonic Development." *Oncogene* 15 (8). Nature Publishing Group: 937–52.
- Chotteau-Lelievre, Anne, Roberto Montesano, Jesus Soriano, Priscilla Soulie, Xavier Desbiens, and Yvan de Launoit. 2003. "PEA3 Transcription Factors Are Expressed in Tissues Undergoing Branching Morphogenesis and Promote Formation of Duct-like Structures by Mammary Epithelial Cells in Vitro." *Developmental Biology* 259 (2): 241–57.
- Clementz, Anthony G, Allison Rogowski, Kinnari Pandya, Lucio Miele, and Clodia Osipo. 2011. "NOTCH-1 and NOTCH-4 Are Novel Gene Targets of PEA3 in Breast Cancer: Novel Therapeutic Implications." *Breast Cancer Research* 13 (3): R63.
- Cojoc, Monica, Claudia Peitzsch, Franziska Trautmann, Leo Polishchuk, Gennady D Telegeev, and Anna Dubrovskaya. 2013. "Emerging Targets in Cancer Management: Role of the CXCL12/CXCR4 Axis." *OncoTargets and Therapy* 6 (September): 1347–61.
- Coleman, R. E. 2006. "Clinical Features of Metastatic Bone Disease and Risk of Skeletal Morbidity." *Clinical Cancer Research* 12 (20): 6243s–6249s..
- Conley-LaComb, M Katie, Louie Semaan, Rajareddy Singareddy, Yanfeng Li, Elisabeth I Heath, Seongho Kim, Michael L Cher, and Sreenivasa R Chinni. 2016. "Pharmacological Targeting of CXCL12/CXCR4 Signaling in Prostate Cancer Bone Metastasis." *Molecular Cancer* 15 (1): 68.
- Cowden Dahl, Karen D, Richard Dahl, Jessica N Kruichak, and Laurie G Hudson. 2009. "The Epidermal Growth Factor Receptor Responsive miR-125a Represses Mesenchymal Morphology in Ovarian Cancer Cells." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (11): 1208–15.

Bibliographie

- Cowley, D O, and B J Graves. 2000. "Phosphorylation Represses Ets-1 DNA Binding by Reinforcing Autoinhibition." *Genes & Development* 14 (3): 366–76.
- Craene, Bram De, and Geert Berx. 2013. "Regulatory Networks Defining EMT during Cancer Initiation and Progression." *Nature Reviews Cancer* 13 (2): 97–110.
- Crawford, H C, B Fingleton, M D Gustavson, N Kurpios, R A Wagenaar, J A Hassell, and L M Matrisian. 2001. "The PEA3 Subfamily of Ets Transcription Factors Synergizes with Beta-Catenin-LEF-1 to Activate Matrilysin Transcription in Intestinal Tumors." *Molecular and Cellular Biology* 21 (4): 1370–83.
- Cutress, Mark L, Hayley C Whitaker, Ian G Mills, Murray Stewart, and David E Neal. 2008. "Structural Basis for the Nuclear Import of the Human Androgen Receptor." *Journal of Cell Science* 121 (Pt 7): 957–68.
- D'Amico, A V, R Whittington, S B Malkowicz, D Schultz, K Blank, G A Broderick, J E Tomaszewski, et al. 1998. "Biochemical Outcome after Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer." *JAMA* 280 (11): 969–74.
- D'Amico, Anthony V., Judd Moul, Peter R. Carroll, Leon Sun, Deborah Lubeck, and Ming-Hui Chen. 2003. "Cancer-Specific Mortality After Surgery or Radiation for Patients With Clinically Localized Prostate Cancer Managed During the Prostate-Specific Antigen Era." *Journal of Clinical Oncology* 21 (11): 2163–72.
- Davidson, Ben, Iris Goldberg, Liora Tell, Sophya Vigdorich, Mark Baekelandt, Aasmund Berner, Gunnar B Kristensen, Reuven Reich, and Juri Kopolovic. 2004. "The Clinical Role of the PEA3 Transcription Factor in Ovarian and Breast Carcinoma in Effusions." *Clinical & Experimental Metastasis* 21: 191–99.
- De, Sarmishtha, Juhua Chen, Natalya V. Narizhneva, Warren Heston, Jennifer Brainard, E. Helene Sage, and Tatiana V. Byzova. 2003. "Molecular Pathway for Cancer

Bibliographie

- Metastasis to Bone.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (40): 39044–50.
- Dehm, S. M., and D. J. Tindall. 2011. “Alternatively Spliced Androgen Receptor Variants.” *Endocrine Related Cancer* 18 (5): R183–96.
- Delany, A.M., M. Amling, M. Priemel, C. Howe, R. Baron, and E. Canalis. 2000. “Osteopenia and Decreased Bone Formation in Osteonectin-Deficient Mice.” *Journal of Clinical Investigation* 105 (7): 915–23.
- Deplus, Rachel, Carine Delliaux, Nathalie Marchand, Anne Flourens, Nathalie Vanpouille, Xavier Leroy, Yvan de Launoit, and Martine Duterque-Coquillaud. 2017. “TMPRSS2-ERG Fusion Promotes Prostate Cancer Metastases in Bone.” *Oncotarget* 8 (7): 11827–40.
- Delany, A M, S Rydziel, and E Canalis. 1996. “Autocrine down-Regulation of Collagenase-3 in Rat Bone Cell Cultures by Insulin-like Growth Factors.” *Endocrinology* 137 (11): 4665–70.
- Dimitroff, Charles J., Mirna Lechpammer, Denise Long-Woodward, and Jeffery L. Kutok. 2004. “Rolling of Human Bone-Metastatic Prostate Tumor Cells on Human Bone Marrow Endothelium under Shear Flow Is Mediated by E-Selectin.” *Cancer Research* 64 (15): 5261–69.
- Dimitroff, Charles J, Leyla Descheny, Natalia Trujillo, Robert Kim, Vuong Nguyen, Wei Huang, Kenneth J Pienta, Jeffery L Kutok, and Mark A Rubin. 2005. “Identification of Leukocyte E-Selectin Ligands, P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 and E-Selectin Ligand-1, on Human Metastatic Prostate Tumor Cells.” *Cancer Research* 65 (13): 5750–60.
- Donaldson, L. W., J. M. Petersen, B. J. Graves, and L. P. McIntosh. 1996a. “Solution Structure of the ETS Domain from Murine Ets-1: A Winged Helix-Turn-Helix DNA Binding Motif.” *The EMBO Journal* 15 (1): 125–34.

Bibliographie

- Donaldson, L W, J M Petersen, B J Graves, and L P McIntosh. 1996b. "Solution Structure of the {ETS} Domain from Murine {Ets}-1: A Winged Helix-Turn-Helix {DNA} Binding Motif." *EMBO J.* 15 (1): 125–34.
- Dong, Jun, Li Xiao, Lu Sheng, Jun Xu, and Zhong-Quan Sun. 2014. "TMPRSS2:ETS Fusions and Clinicopathologic Characteristics of Prostate Cancer Patients from Eastern China." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 15 (7): 3099–3103.
- Egeblad, Mikala, and Zena Werb. 2002. "New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression." *Nature Reviews Cancer* 2 (3): 161–74.
- El-Alfy, Mohamed, Van Luu-The, Xiao-Fang Huang, Louise Berger, Fernand Labrie, and Georges Pelletier. 1999. "Localization of Type 5 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, and Androgen Receptor in the Human Prostate by *in Situ* Hybridization and Immunocytochemistry." *Endocrinology* 140 (3): 1481–91.
- Epstein, Jonathan I., Lars Egevad, Mahul B. Amin, Brett Delahunt, John R. Srigley, Peter A. Humphrey, and Grading Committee. 2015. "The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma." *The American Journal of Surgical Pathology* 40 (2): 1.
- Epstein, Jonathan I., Michael J. Zelefsky, Daniel D. Sjoberg, Joel B. Nelson, Lars Egevad, Cristina Magi-Galluzzi, Andrew J. Vickers, et al. 2016. "A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score." *European Urology* 69 (3): 428–35..
- Epstein, Jonathan I, William C Allsbrook, Mahul B Amin, Lars L Egevad, and ISUP Grading Committee. 2005. "The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma." *The American Journal of Surgical Pathology* 29 (9): 1228–42.

Bibliographie

- Erkizan, Hayriye V, Yali Kong, Melinda Merchant, Silke Schlottmann, Julie S Barber-Rotenberg, Linshan Yuan, Ogan D Abaan, et al. 2009. "A Small Molecule Blocking Oncogenic Protein EWS-FLI1 Interaction with RNA Helicase A Inhibits Growth of Ewing's Sarcoma." *Nature Medicine* 15 (7). NIH Public Access: 750–56.
- Esgueva, Raquel, Sven Perner, Christopher J LaFargue, Veit Scheble, Carsten Stephan, Michael Lein, Florian R Fritzsche, Manfred Dietel, Glen Kristiansen, and Mark A Rubin. 2010. "Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG Gene Fusions in a Large Prostatectomy Cohort." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23 (4): 539–46.
- Etoh, T, H Inoue, Y Yoshikawa, G F Barnard, S Kitano, and M Mori. 2000. "Increased Expression of Collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in Oesophageal Cancer Is Related to Cancer Aggressiveness." *Gut* 47 (1): 50–56.
- Fang, Y, A E Fliss, D M Robins, and A J Caplan. 1996. "Hsp90 Regulates Androgen Receptor Hormone Binding Affinity in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (45): 28697–702.
- Farnham, Peggy J. 2009. "Insights from Genomic Profiling of Transcription Factors." *Nat. Rev. Genet.* 10 (9): 605–16.
- Fata, J E, K J Leco, E B Voura, H Y Yu, P Waterhouse, G Murphy, R A Moorehead, and R Khokha. 2001. "Accelerated Apoptosis in the Timp-3-Deficient Mammary Gland." *The Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 831–41.
- Ferrer-Batallé, Montserrat, Esther Llop, Manel Ramírez, Rosa Núria Aleixandre, Marc Saez, Josep Comet, Rafael de Llorens, and Rosa Peracaula. 2017. "Comparative Study of Blood-Based Biomarkers, α 2,3-Sialic Acid PSA and PHI, for High-Risk Prostate Cancer Detection." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

Bibliographie

- Firlej, Virginie, Béatrice Bocquet, Xavier Desbiens, Yvan de Launoit, and Anne Chotteau-Lelièvre. 2005. "Pea3 Transcription Factor Cooperates with USF-1 in Regulation of the Murine Bax Transcription without Binding to an Ets-Binding Site." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2): 887–98.
- Firlej, Virginie, Franck Ladam, Guillaume Brysbaert, Patrick Dumont, François Fuks, Yvan de Launoit, Arndt Benecke, and Anne Chotteau-Lelievre. 2008. "Reduced Tumorigenesis in Mouse Mammary Cancer Cells Following Inhibition of Pea3- or Erm-Dependent Transcription." *Journal of Cell Science* 121 (Pt 20): 3393–3402.
- Fizazi, Karim, Jun Yang, Sara Peleg, Charles R Sikes, Erica L Kreimann, Danai Daliani, Matilde Olive, et al. 2003. "Prostate Cancer Cells-Osteoblast Interaction Shifts Expression of Growth/survival-Related Genes in Prostate Cancer and Reduces Expression of Osteoprotegerin in Osteoblasts." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9 (7): 2587–97.
- Fleming, F J, E Myers, G Kelly, T B Crotty, E W McDermott, N J O'Higgins, A D K Hill, and L S Young. 2004. "Expression of SRC-1, AIB1, and PEA3 in HER2 Mediated Endocrine Resistant Breast Cancer; a Predictive Role for SRC-1." *Journal of Clinical Pathology* 57 (10): 1069–74.
- Folgueira, Maria Aparecida Azevedo Koike, Simone Maistro, Maria Lucia Hirata Katayama, Rosimeire Aparecida Roela, Fiorita Gonzales Lopes Mundim, Suely Nanogaki, Geertruida H. de Bock, and M. Mitzi Brentani. 2013. "Markers of Breast Cancer Stromal Fibroblasts in the Primary Tumour Site Associated with Lymph Node Metastasis: A Systematic Review Including Our Case Series." *Bioscience Reports* 33 (6): 921–29.
- Foos, G, J J García-Ramírez, C K Galang, and C A Hauser. 1998. "Elevated Expression of Ets2 or Distinct Portions of Ets2 Can Reverse Ras-Mediated Cellular Transformation." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (30): 18871–80.

Bibliographie

- Forbes, Simon A, David Beare, Prasad Gunasekaran, Kenric Leung, Nidhi Bindal, Harry Boutselakis, Minjie Ding, et al. 2015. "COSMIC: Exploring the World's Knowledge of Somatic Mutations in Human Cancer." *Nucleic Acids Research* 43 (Database issue): D805-11.
- Fosang, A J, K Last, V Knäuper, G Murphy, and P J Neame. 1996. "Degradation of Cartilage Aggrecan by Collagenase-3 (MMP-13)." *FEBS Letters* 380 (1-2): 17-20.
- Framson, Paul E, and E Helene Sage. 2004. "SPARC and Tumor Growth: Where the Seed Meets the Soil?" *Journal of Cellular Biochemistry* 92 (4): 679-90.
- Freije, J M, I Díez-Itza, M Balbín, L M Sánchez, R Blasco, J Tolivia, and C López-Otín. 1994a. "Molecular Cloning and Expression of Collagenase-3, a Novel Human Matrix Metalloproteinase Produced by Breast Carcinomas." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (24): 16766-73.
- Galang, Christina K, William J Muller, Gabriele Foos, Robert G Oshima, and Craig A Hauser. 2004. "Changes in the Expression of Many Ets Family Transcription Factors and of Potential Target Genes in Normal Mammary Tissue and Tumors." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (12): 11281-92.
- Gallego, M I, N Binart, G W Robinson, R Okagaki, K T Coschigano, J Perry, J J Kopchick, T Oka, P A Kelly, and L Hennighausen. 2001. "Prolactin, Growth Hormone, and Epidermal Growth Factor Activate Stat5 in Different Compartments of Mammary Tissue and Exert Different and Overlapping Developmental Effects." *Developmental Biology* 229 (1): 163-75.
- Gasi, Delila, Hetty a. van der Korput, Hannie C. Douben, Annelies de Klein, Corrina M. de Ridder, Wytske M. van Weerden, and Jan Trapman. 2011. "Overexpression of Full-Length ETV1 Transcripts in Clinical Prostate Cancer due to Gene Translocation." *PLoS ONE* 6 (1).

Bibliographie

- Gazzerro, E, S Rydziel, and E Canalis. 1999. "Skeletal Bone Morphogenetic Proteins Suppress the Expression of Collagenase-3 by Rat Osteoblasts." *Endocrinology* 140 (2): 562–67.
- Geevarghese, Anita, and Ira M Herman. 2014. "Pericyte-Endothelial Crosstalk: Implications and Opportunities for Advanced Cellular Therapies." *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 163 (4): 296–306.
- Gilany, Kambiz, Arash Minai-Tehrani, Elham Savadi-Shiraz, Hassan Rezaadoost, and Niknam Lakpour. 2015. "Exploring the Human Seminal Plasma Proteome: An Unexplored Gold Mine of Biomarker for Male Infertility and Male Reproduction Disorder." *Journal of Reproduction & Infertility* 16 (2): 61–71.
- Gille, H, M Kortenjann, O Thomae, C Moomaw, C Slaughter, M H Cobb, and P E Shaw. 1995. "ERK Phosphorylation Potentiates Elk-1-Mediated Ternary Complex Formation and Transactivation." *The EMBO Journal* 14 (5): 951–62.
- Gillham, H, M C Golding, R Pepperkok, and W J Gullick. 1999. "Intracellular Movement of Green Fluorescent Protein-Tagged Phosphatidylinositol 3-Kinase in Response to Growth Factor Receptor Signaling." *The Journal of Cell Biology* 146 (4): 869–80.
- Gilmore, Thomas D. 1999. "The Rel/NF- κ B Signal Transduction Pathway: Introduction." *Oncogene* 18 (49): 6842–44.
- Gleason, D F. 1966. "Classification of Prostatic Carcinomas." *Cancer Chemotherapy Reports* 50 (3): 125–28.
- Glover, J. N. Mark, and Stephen C. Harrison. 1995. "Crystal Structure of the Heterodimeric bZIP Transcription Factor c-Fos-c-Jun Bound to DNA." *Nature* 373 (6511): 257–61.
- Golembieski, W A, S Ge, K Nelson, T Mikkelsen, and S A Rempel. 2017. "Increased SPARC

Bibliographie

- Expression Promotes U87 Glioblastoma Invasion in Vitro.” *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 17 (5–6): 463–72. Accessed November 30.
- Gontero, P, and R S Kirby. 2005. “Nerve-Sparing Radical Retropubic Prostatectomy: Techniques and Clinical Considerations.” *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 8 (2): 133–39.
- Gorska, A E, H Joseph, R Derynck, H L Moses, and R Serra. 1998. “Dominant-Negative Interference of the Transforming Growth Factor Beta Type II Receptor in Mammary Gland Epithelium Results in Alveolar Hyperplasia and Differentiation in Virgin Mice.” *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 9 (3): 229–38.
- Gosselaar, Claartje, Monique J Roobol, Stijn Roemeling, and Fritz H Schröder. 2008. “The Role of the Digital Rectal Examination in Subsequent Screening Visits in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC), Rotterdam.” *European Urology* 54 (3): 581–88.
- Gottlieb, Bruce, Lenore K. Beitel, Jian Hui Wu, and Mark Trifiro. 2004. “The Androgen Receptor Gene Mutations Database (ARDB): 2004 Update.” *Human Mutation* 23 (6): 527–33.
- Gottlieb, Bruce, Lenore K Beitel, Abbesha Nadarajah, Miltiadis Paliouras, and Mark Trifiro. 2012. “The Androgen Receptor Gene Mutations Database: 2012 Update.” *Human Mutation* 33 (5): 887–94.
- Gottschalk, L R, D M Giannola, and S G Emerson. 1993. “Molecular Regulation of the Human IL-3 Gene: Inducible T Cell-Restricted Expression Requires Intact AP-1 and Elf-1 Nuclear Protein Binding Sites.” *The Journal of Experimental Medicine* 178 (5): 1681–92.

Bibliographie

- Grasso, Catherine S, Yi-Mi Wu, Dan R Robinson, Xuhong Cao, Saravana M Dhanasekaran, Amjad P Khan, Michael J Quist, et al. 2012. "The Mutational Landscape of Lethal Castration-Resistant Prostate Cancer." *Nature* 487 (7406): 239–43.
- Graves, B J, D O Cowley, T L Goetz, J M Petersen, M D Jonsen, and M E Gillespie. 1998. "Autoinhibition as a Transcriptional Regulatory Mechanism." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 63: 621–29.
- Greenall, A., N. Willingham, E. Cheung, D. S. Boam, and A. D. Sharrocks. 2001. "DNA Binding by the ETS-Domain Transcription Factor PEA3 Is Regulated by Intramolecular and Intermolecular Protein-protein Interactions." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (19): 16207–15.
- Gri, G, D Savio, G Trinchieri, and X Ma. 1998. "Synergistic Regulation of the Human Interleukin-12 p40 Promoter by NFkappaB and Ets Transcription Factors in Epstein-Barr Virus-Transformed B Cells and Macrophages." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (11): 6431–38.
- Grund, Eric M, David Kagan, Cam Anh Tran, Andreas Zeitvogel, Anna Starzinski-Powitz, Selvaraj Nataraja, and Stephen S Palmer. 2008. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Regulates Inflammatory and Mesenchymal Responses via Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase, p38, and Nuclear Factor kappaB in Human Endometriotic Epithelial Cells." *Molecular Pharmacology* 73 (5): 1394–1404.
- Guo, Zhiyong, Xi Yang, Feng Sun, Richeng Jiang, Douglas E Linn, Hege Chen, Hegang Chen, et al. 2009. "A Novel Androgen Receptor Splice Variant Is up-Regulated during Prostate Cancer Progression and Promotes Androgen Depletion-Resistant Growth." *Cancer Research* 69 (6): 2305–13.
- Gutierrez-Hartmann, Arthur, Dawn L Duval, and Andrew P Bradford. 2007. "ETS Transcription Factors in Endocrine Systems." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 18 (4): 150–58.

Bibliographie

- Gutman, A, and B Wasylyk. 1990. "The Collagenase Gene Promoter Contains a TPA and Oncogene-Responsive Unit Encompassing the PEA3 and AP-1 Binding Sites." *The EMBO Journal* 9 (7): 2241–46.
- Hagman, J, and R Grosschedl. 1992. "An Inhibitory Carboxyl-Terminal Domain in Ets-1 and Ets-2 Mediates Differential Binding of ETS Family Factors to Promoter Sequences of the Mb-1 Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (19): 8889–93.
- Han, Bo, Rohit Mehra, Saravana M. Dhanasekaran, Jindan Yu, Anjana Menon, Robert J. Lonigro, Xiaosong Wang, et al. 2008. "A Fluorescence in Situ Hybridization Screen for E26 Transformation-Specific Aberrations: Identification of DDX5-ETV4 Fusion Protein in Prostate Cancer." *Cancer Research* 68 (18): 7629–37.
- Hanzawa, M, M Shindoh, F Higashino, M Yasuda, N Inoue, K Hida, M Ono, et al. 2000. "Hepatocyte Growth Factor Upregulates E1AF That Induces Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Invasion by Activating Matrix Metalloproteinase Genes." *Carcinogenesis* 21 (6): 1079–85.
- Harada, Hiroshi, Satoshi Itasaka, Shinae Kizaka-Kondoh, Keiko Shibuya, Akiyo Morinibu, Kazumi Shinomiya, and Masahiro Hiraoka. 2009. "The Akt/mTOR Pathway Assures the Synthesis of HIF-1alpha Protein in a Glucose- and Reoxygenation-Dependent Manner in Irradiated Tumors." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (8): 5332–42.
- Hasselaar, P, and E H Sage. 1992. "SPARC Antagonizes the Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on the Migration of Bovine Aortic Endothelial Cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 49 (3): 272–83.
- Hayward, S W, L S Baskin, P C Haughney, B A Foster, A R Cunha, R Dahiya, G S Prins, and G R Cunha. 1996. "Stromal Development in the Ventral Prostate, Anterior Prostate and Seminal Vesicle of the Rat." *Acta Anatomica* 155 (2): 94–103.

Bibliographie

- Heeg, Steffen, Koushik K Das, Maximilian Reichert, Basil Bakir, Shigetsugu Takano, Julia Caspers, Nicole M Aiello, et al. 2016. "ETS-Transcription Factor ETV1 Regulates Stromal Expansion and Metastasis in Pancreatic Cancer." *Gastroenterology* 151 (3): 540–553.e14.
- Heemers, Hannelore V, and Donald J Tindall. 2007. "Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex." *Endocrine Reviews* 28 (7): 778–808.
- Heidenreich, Axel, Carsten H. Ohlmann, and Sergej Polyakov. 2007. "Anatomical Extent of Pelvic Lymphadenectomy in Patients Undergoing Radical Prostatectomy." *European Urology* 52 (1): 29–37.
- Heinävaara, Sirpa, Tytti Sarkeala, and Ahti Anttila. 2016. "Impact of Organised Mammography Screening on Breast Cancer Mortality in a Case-Control and Cohort Study." *British Journal of Cancer* 114 (9): 1038–44.
- Helgeson, Beth E., Scott a. Tomlins, Nameeta Shah, Bharathi Laxman, Qi Cao, John R. Prensner, Xuhong Cao, et al. 2008. "Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 Gene Fusions in Prostate Cancer." *Cancer Research* 68 (1): 73–80.
- Hens, J. R., P. Dann, J.-P. Zhang, S. Harris, G. W. Robinson, and J. Wysolmerski. 2007. "BMP4 and PTHrP Interact to Stimulate Ductal Outgrowth during Embryonic Mammary Development and to Inhibit Hair Follicle Induction." *Development* 134 (6): 1221–30.
- Hens, Julie R, and John J Wysolmerski. 2005. "Key Stages of Mammary Gland Development: Molecular Mechanisms Involved in the Formation of the Embryonic Mammary Gland." *Breast Cancer Research : BCR* 7 (5): 220–24.
- Heppner, K J, L M Matrisian, R A Jensen, and W H Rodgers. 1996. "Expression of Most Matrix Metalloproteinase Family Members in Breast Cancer Represents a Tumor-

Bibliographie

Induced Host Response." *The American Journal of Pathology* 149 (1): 273–82.

Hermans, Karin G., Hetty a. Van Der Korput, Ronald Van Marion, Dennis J. Van De Wijngaart, Angelique Ziel Van Der Made, Natasja F. Dits, Joost L. Boormans, et al. 2008. "Truncated ETV1, Fused to Novel Tissue-Specific Genes, and Full-Length ETV1 in Prostate Cancer." *Cancer Research* 68 (18): 7541–49.

Hermans, Karin G., Ronald Van Marion, Herman Van Dekken, Guido Jenster, Wytske M. Van Weerden, and Jan Trapman. 2006. "TMPRSS2:ERG Fusion by Translocation or Interstitial Deletion Is Highly Relevant in Androgen-Dependent Prostate Cancer, but Is Bypassed in Late-Stage Androgen Receptor-Negative Prostate Cancer." *Cancer Research* 66 (22): 10658–63.

Hermans, Karin G, Hetty A van der Korput, Ronald van Marion, Dennis J van de Wijngaart, Angelique Ziel-van der Made, Natasja F Dits, Joost L Boormans, et al. 2008. "Truncated ETV1, Fused to Novel Tissue-Specific Genes, and Full-Length ETV1 in Prostate Cancer." *Cancer Research* 68 (18): 7541–49.

Hermanson, Ola, Christopher K Glass, and Michael G Rosenfeld. 2002. "Nuclear Receptor Coregulators: Multiple Modes of Modification." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 13 (2): 55–60.

Hindson, V J, J L Ashworth, M J Rock, S Cunliffe, C A Shuttleworth, and C M Kielty. 1999. "Fibrillin Degradation by Matrix Metalloproteinases: Identification of Amino- and Carboxy-Terminal Cleavage Sites." *FEBS Letters* 452 (3): 195–98.

Hoffman, Robert M. 2013. "Stromal-Cell and Cancer-Cell Exosomes Leading the Metastatic Exodus for the Promised Niche." *Breast Cancer Research* 15 (3): 310.

Hollenhorst, Peter C, David A Jones, and Barbara J Graves. 2004. "Expression Profiles Frame the Promoter Specificity Dilemma of the ETS Family of Transcription Factors." *Nucleic Acids Research* 32 (18): 5693–5702.

Bibliographie

- Hollenhorst, Peter C, Atul A Shah, Christopher Hopkins, and Barbara J Graves. 2007. "Genome-Wide Analyses Reveal Properties of Redundant and Specific Promoter Occupancy within the {ETS} Gene Family." *Genes Dev.* 21 (15): 1882–94.
- Howe, Louise R, Howard C Crawford, Kotha Subbaramaiah, John A Hassell, Andrew J Dannenberg, and Anthony M C Brown. 2001. "PEA3 Is Up-Regulated in Response to Wnt1 and Activates the Expression of Cyclooxygenase-2*." in Press.
- Howe, Louise R, Osamu Watanabe, James Leonard, and Anthony M C Brown. 1906. "Twist Is Up-Regulated in Response to Wnt1 and Inhibits Mouse Mammary Cell Differentiation." *CANCER RESEARCH* 63.
- Hsu, T., and R. A. Schulz. 2000. "Sequence and Functional Properties of Ets Genes in the Model Organism *Drosophila*." *Oncogene* 19 (55): 6409–16.
- Hu, Rong, Thomas A Dunn, Shuanzeng Wei, Sumit Isharwal, Robert W Veltri, Elizabeth Humphreys, Misop Han, et al. 2009. "Ligand-Independent Androgen Receptor Variants Derived from Splicing of Cryptic Exons Signify Hormone-Refractory Prostate Cancer." *Cancer Research* 69 (1): 16–22.
- Huang, Suyun, Melissa Van Arsdall, Sean Tedjarati, Marya McCarty, Wenjuan Wu, Robert Langley, and Isaiah J Fidler. 2002. "Contributions of Stromal Metalloproteinase-9 to Angiogenesis and Growth of Human Ovarian Carcinoma in Mice." *Journal of the National Cancer Institute* 94 (15): 1134–42.
- Iacobuzio-Donahue, Christine A, Pedram Argani, Paula M Hennen, Jessa Jones, and Scott E Kern. 2002. "The Desmoplastic Response to Infiltrating Breast Carcinoma: Gene Expression at the Site of Primary Invasion and Implications for Comparisons between Tumor Types." *Cancer Research* 62 (18): 5351–57.
- Ingman, Wendy V, and Sarah A Robertson. 2008. "Mammary Gland Development in Transforming Growth Factor beta1 Null Mutant Mice: Systemic and Epithelial

Bibliographie

Effects." *Biology of Reproduction* 79 (4): 711–17.

Iruela-Arispe, M L, T F Lane, D Redmond, M Reilly, R P Bolender, T J Kavanagh, and E H Sage. 1995. "Expression of SPARC during Development of the Chicken Chorioallantoic Membrane: Evidence for Regulated Proteolysis in Vivo." *Molecular Biology of the Cell* 6 (3): 327–43.

J, Kinoshita, et al. 2002. "Clinical Significance of PEA3 in Human Breast Cancer." *Surgery* 131 (1). Mosby: S222–25.

Jackson, Brian C, Daniel W Nebert, and Vasilis Vasiliou. 2010. "Update of Human and Mouse Matrix Metalloproteinase Families." *Human Genomics* 4 (3): 194–201.

Jacob, K, M Webber, D Benayahu, and H K Kleinman. 1999. "Osteonectin Promotes Prostate Cancer Cell Migration and Invasion: A Possible Mechanism for Metastasis to Bone." *Cancer Research* 59 (17): 4453–57.

Jain, Rakesh K. 2003. "Molecular Regulation of Vessel Maturation." *Nature Medicine* 9 (6): 685–93.

Janknecht, R, W H Ernst, V Pingoud, and A Nordheim. 1993. "Activation of Ternary Complex Factor Elk-1 by MAP Kinases." *The EMBO Journal* 12 (13): 5097–5104.

Janknecht, R, R Zinck, W H Ernst, and A Nordheim. 1994. "Functional Dissection of the Transcription Factor Elk-1." *Oncogene* 9 (4): 1273–78.

Jayaraman, G, R Srinivas, C Duggan, E Ferreira, S Swaminathan, K Somasundaram, J Williams, et al. 1999. "p300/cAMP-Responsive Element-Binding Protein Interactions with Ets-1 and Ets-2 in the Transcriptional Activation of the Human Stromelysin Promoter." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (24): 17342–52.

Jenkins, Darlene E, Shang-Fan Yu, Yvette S Hornig, Tony Purchio, and Pamela R Contag.

Bibliographie

2003. "In Vivo Monitoring of Tumor Relapse and Metastasis Using Bioluminescent PC-3M-Luc-C6 Cells in Murine Models of Human Prostate Cancer." *Clinical & Experimental Metastasis* 20 (8): 745–56.
- Jiang, Jianhai, Yuanyan Wei, Dan Liu, Jin Zhou, Jialin Shen, Xiaoning Chen, Si Zhang, Xiangfei Kong, and Jianxin Gu. 2007. "E1AF Promotes Breast Cancer Cell Cycle Progression via Upregulation of Cyclin D3 Transcription." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358 (1): 53–58.
- Jiménez, M J, M Balbín, J M López, J Alvarez, T Komori, and C López-Otín. 1999. "Collagenase 3 Is a Target of Cbfa1, a Transcription Factor of the Runt Gene Family Involved in Bone Formation." *Molecular and Cellular Biology* 19 (6): 4431–42.
- Jin, Guang, Min Jung Kim, Hyo-Sung Jeon, Jin Eun Choi, Dong Sun Kim, Eung Bae Lee, Sung Ick Cha, et al. 2010. "PTEN Mutations and Relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancers." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 69 (3): 279–83.
- Joensuu, H, L Pylkkänen, and S Toikkanen. 1994. "Bcl-2 Protein Expression and Long-Term Survival in Breast Cancer." *The American Journal of Pathology* 145 (5): 1191–98.
- Johansson, N, K Airola, R Grénman, A L Kariniemi, U Saarialho-Kere, and V M Kähäri. 1997. "Expression of Collagenase-3 (Matrix Metalloproteinase-13) in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck." *The American Journal of Pathology* 151 (2): 499–508.
- Johansson, Nina, Ulpu Saarialho-Kere, Kristiina Airola, Riitta Herva, Liisa Nissinen, Jukka Westermarck, Eero Vuorio, Jyrki Heino, and Veli-Matti Kähäri. 1997. "Collagenase-3 (MMP-13) Is Expressed by Hypertrophic Chondrocytes, Periosteal Cells, and Osteoblasts during Human Fetal Bone Development." *Developmental Dynamics* 208 (3): 387–97.

Bibliographie

- Jones, Chris, Alan Mackay, Anita Grigoriadis, Antonio Cossu, Jorge S Reis-Filho, Laura Fulford, Tim Dexter, et al. 2004. "Expression Profiling of Purified Normal Human Luminal and Myoepithelial Breast Cells: Identification of Novel Prognostic Markers for Breast Cancer." *Cancer Research* 64 (9): 3037–45.
- Jung, Younghun, Jin Koo Kim, Yusuke Shiozawa, Jingcheng Wang, Anjali Mishra, Jeena Joseph, Janice E Berry, et al. 2013. "Recruitment of Mesenchymal Stem Cells into Prostate Tumours Promotes Metastasis." *Nature Communications* 4 (April): 1795.
- Kalinska, Magdalena, Ulf Meyer-Hoffert, Tomasz Kantyka, and Jan Potempa. 2016. "Kallikreins – The Melting Pot of Activity and Function." *Biochimie* 122 (March): 270–82.
- Kaltz-Wittmer, C, U Klenk, A Glaessgen, D E Aust, J Diebold, U Löhrs, and G B Baretton. 2000. "FISH Analysis of Gene Aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in Advanced Prostatic Carcinomas before and after Androgen Deprivation Therapy." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80 (9): 1455–64.
- Kandemir, Başak, Ugur Dag, Burcu Bakir Gungor, İlknur Melis Durasi, Burcu Erdogan, Eray Sahin, Ugur Sezerman, and Isil Aksan Kurnaz. 2017. "In Silico Analyses and Global Transcriptional Profiling Reveal Novel Putative Targets for Pea3 Transcription Factor Related to Its Function in Neurons." Edited by Jinsong Zhang. *PLOS ONE* 12 (2): e0170585.
- Kang, Hyun-Seo, Mary L. Nelson, Cameron D. Mackereth, Manuela Schärpf, Barbara J. Graves, and Lawrence P. McIntosh. 2008. "Identification and Structural Characterization of a CBP/p300-Binding Domain from the ETS Family Transcription Factor GABP α ." *Journal of Molecular Biology* 377 (3): 636–46.
- Kapila, S, Y Xie, and W Wang. 2009. "Induction of MMP-1 (Collagenase-1) by Relaxin in Fibrocartilaginous Cells Requires Both the AP-1 and PEA-3 Promoter Sites."

Bibliographie

Orthodontics & Craniofacial Research 12 (3): 178–86.

Kaya, M, K Yoshida, F Higashino, T Mitaka, S Ishii, and K Fujinaga. 1996. “A Single Ets-Related Transcription Factor, E1AF, Confers Invasive Phenotype on Human Cancer Cells.” *Oncogene* 12 (2): 221–27.

Kellokumpu-Lehtinen, P., R. Santti, and L. J. Pelliniemi. 1980. “Correlation of Early Cytodifferentiation of the Human Fetal Prostate and Leydig Cells.” *The Anatomical Record* 196 (3): 263–73.

Kelm, R J, N A Swords, T Orfeo, and K G Mann. 1994. “Osteonectin in Matrix Remodeling. A Plasminogen-Osteonectin-Collagen Complex.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (48): 30147–53.

Kerkelä, E, and U Saarialho-Kere. 2003. “Matrix Metalloproteinases in Tumor Progression: Focus on Basal and Squamous Cell Skin Cancer.” *Experimental Dermatology* 12 (2): 109–25.

Kim, C. A., M. L. Phillips, W. Kim, M. Gingery, H. H. Tran, M. A. Robinson, S. Faham, and J. U. Bowie. 2001. “Polymerization of the SAM Domain of TEL in Leukemogenesis and Transcriptional Repression.” *The EMBO Journal* 20 (15): 4173–82.

Kim, Chongwoo A, and James U Bowie. 2003. “{SAM} Domains: Uniform Structure, Diversity of Function.” *Trends Biochem. Sci.* 28 (12): 625–28.

Kim, H J, S-H Kim, E J Yu, W-Y Seo, and J H Kim. 2015. “A Positive Role of DBC1 in PEA3-Mediated Progression of Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer.” *Oncogene* 34 (34): 4500–4508.

Kim, Tae-Dong, Fang Jin, Sook Shin, Sangphil Oh, Stan A Lightfoot, Joseph P Grande, Aaron J Johnson, Jan M van Deursen, Jonathan D Wren, and Ralf Janknecht. 2016. “Histone Demethylase JMJD2A Drives Prostate Tumorigenesis through

Bibliographie

Transcription Factor ETV1." *The Journal of Clinical Investigation* 126 (2): 706–20.

Kimura, Takahiro, Bungo Furusato, Jun Miki, Toshihiro Yamamoto, Norihiro Hayashi, Hiroyuki Takahashi, Yuko Kamata, Geert J H L van Leenders, Tapio Visakorpi, and Shin Egawa. 2012. "Expression of ERG Oncoprotein Is Associated with a Less Aggressive Tumor Phenotype in Japanese Prostate Cancer Patients." *Pathology International* 62 (11): 742–48.

King, Jennifer C, Jin Xu, John Wongvipat, Haley Hieronymus, Brett S Carver, David H Leung, Barry S Taylor, et al. 2009. "Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-Kinase Pathway Activation in Prostate Oncogenesis." *Nature Genetics* 41 (5): 524–26.

Klämbt, C. 1993. "The {Drosophila} Gene Pointed Encodes Two {ETS}-like Proteins Which Are Involved in the Development of the Midline Glial Cells." *Development* 117 (1): 163–76.

Klein, A de, A G van Kessel, G Grosveld, C R Bartram, A Hagemeijer, D Bootsma, N K Spurr, N Heisterkamp, J Groffen, and J R Stephenson. 1982. "A Cellular Oncogene Is Translocated to the Philadelphia Chromosome in Chronic Myelocytic Leukaemia." *Nature* 300 (5894): 765–67.

Klezovitch, Olga, Michael Risk, Ilsa Coleman, Jared M Lucas, Manda Null, Lawrence D True, Peter S Nelson, and Valeri Vasioukhin. 2008. "A Causal Role for ERG in Neoplastic Transformation of Prostate Epithelium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6): 2105–10.

Knäuper, V, S Cowell, B Smith, C López-Otin, M O'Shea, H Morris, L Zardi, and G Murphy. 1997. "The Role of the C-Terminal Domain of Human Collagenase-3 (MMP-13) in the Activation of Procollagenase-3, Substrate Specificity, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Interaction." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (12): 7608–16.

Bibliographie

- Knäuper, V, C López-Otin, B Smith, G Knight, and G Murphy. 1996. "Biochemical Characterization of Human Collagenase-3." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (3): 1544–50.
- Kodandapani, R, F Pio, C Z Ni, G Piccialli, M Klemsz, S McKercher, R A Maki, and K R Ely. 1996. "A New Pattern for Helix-Turn-Helix Recognition Revealed by the {PU}.1 {ETS}-Domain-{DNA} Complex." *Nature* 380 (6573): 456–60.
- Koivisto, P, J Kononen, C Palmberg, T Tammela, E Hyytinen, J Isola, J Trapman, et al. 1997. "Androgen Receptor Gene Amplification: A Possible Molecular Mechanism for Androgen Deprivation Therapy Failure in Prostate Cancer." *Cancer Research* 57 (2): 314–19.
- Koo, Sonya J, and Samuel L Pfaff. 2002. "Fine-Tuning Motor Neuron Properties: Signaling from the Periphery." *Neuron* 35 (5): 823–26.
- Kucera, J., W. Cooney, A. Que, V. Szeder, H. Stancz-Szeder, and J. Walro. 2002. "Formation of Supernumerary Muscle Spindles at the Expense of Golgi Tendon Organs in ER81-Deficient Mice." *Developmental Dynamics* 223 (3): 389–401.
- Kumagai, Jinpei, Johannes Hofland, Sigrun Erkens-Schulze, Natasja F J Dits, Jacobie Steenbergen, Guido Jenster, Yukio Homma, Frank H de Jong, and Wytske M van Weerden. 2013. "Intratumoral Conversion of Adrenal Androgen Precursors Drives Androgen Receptor-Activated Cell Growth in Prostate Cancer More Potently than de Novo Steroidogenesis." *The Prostate* 73 (15): 1636–50.
- Kunath, Frank, Henrik R Grobe, Gerta Rücker, Edith Motschall, Gerd Antes, Philipp Dahm, Bernd Wullich, and Joerg J Meerpohl. 2014. "Non-Steroidal Antiandrogen Monotherapy Compared with Luteinising Hormone-Releasing Hormone Agonists or Surgical Castration Monotherapy for Advanced Prostate Cancer." In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, edited by Frank Kunath, CD009266. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Bibliographie

- Kupprion, C, K Motamed, and E H Sage. 1998. "SPARC (BM-40, Osteonectin) Inhibits the Mitogenic Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Microvascular Endothelial Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (45): 29635–40.
- Kurpios, Natasza A., Lesley MacNeil, Trevor G. Shepherd, David W. Gludish, Andrew O. Giacomelli, and John A. Hassell. 2009. "The Pea3 Ets Transcription Factor Regulates Differentiation of Multipotent Progenitor Cells during Mammary Gland Development." *Developmental Biology*.
- Kurpios, Natasza A, Nancy A Sabolic, Trevor G Shepherd, Gina M Fidalgo, and John A Hassell. 2003. "Function of PEA3 Ets Transcription Factors in Mammary Gland Development and Oncogenesis." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 8 (2): 177–90.
- Kusano, K, C Miyaura, M Inada, T Tamura, A Ito, H Nagase, K Kamoi, and T Suda. 1998. "Regulation of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by Interleukin-1 and Interleukin-6 in Mouse Calvaria: Association of MMP Induction with Bone Resorption." *Endocrinology* 139 (3): 1338–45.
- Labrie, Fernand. 2004. "Adrenal Androgens and Intracrinology." *Seminars in Reproductive Medicine* 22 (4): 299–309.
- Ladam, F., I. Damour, P. Dumont, Z. Kherrouche, Y. de Launoit, D. Tulasne, and A. Chotteau-Lelievre. 2013. "Loss of a Negative Feedback Loop Involving Pea3 and Cyclin D2 Is Required for Pea3-Induced Migration in Transformed Mammary Epithelial Cells." *Molecular Cancer Research* 11 (11): 1412–24.
- Ladle, David R, and Eric Frank. 2002. "The Role of the ETS Gene PEA3 in the Development of Motor and Sensory Neurons." *Physiology & Behavior* 77 (4–5): 571–76.
- Lafleur, Marc A., Angela F. Drew, Emma L. de Sousa, Tony Blick, Margaret Bills, Emma C.

Bibliographie

- Walker, Elizabeth D. Williams, Mark Waltham, and Erik W. Thompson. 2005. "Upregulation of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Breast Cancer Xenografts: A Major Induction of Stromal MMP-13." *International Journal of Cancer* 114 (4): 544–54.
- Laget, M. P., P. A. Defosse, O. Albagli, J. L. Baert, F. Dewitte, D. Stehelin, and Y. de Launoit. 1996. "Two Functionally Distinct Domains Responsible for Transactivation by the Ets Family Member ERM." *Oncogene* 12 (6): 1325–36.
- Lakhani, Sunil R, Jorge S Reis-Filho, Laura Fulford, Frederique Penault-Llorca, Marc van der Vijver, Suzanne Parry, Timothy Bishop, et al. 2005. "Prediction of BRCA1 Status in Patients with Breast Cancer Using Estrogen Receptor and Basal Phenotype." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (14): 5175–80.
- Lane, T F, M L Iruela-Arispe, R S Johnson, and E H Sage. 1994. "SPARC Is a Source of Copper-Binding Peptides That Stimulate Angiogenesis." *The Journal of Cell Biology* 125 (4): 929–43.
- Launoit, Y de, A Chotteau-Lelievre, C Beaudoin, L Coutte, S Netzer, C Brenner, I Huvent, and J L Baert. 2000. "The PEA3 Group of ETS-Related Transcription Factors. Role in Breast Cancer Metastasis." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 480: 107–16.
- Launoit, Yvan de, Jean-Luc Baert, Anne Chotteau-Lelievre, Didier Monte, Laurent Coutte, Sébastien Mauén, Virginie Firlej, Cindy Degerny, and Kathye Verreman. 2006. "The Ets Transcription Factors of the PEA3 Group: Transcriptional Regulators in Metastasis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1766 (1): 79–87.
- Lázaro-Ibáñez, Elisa, Taral R Lunavat, Su Chul Jang, Carmen Escobedo-Lucea, Jorge Oliver-De La Cruz, Pia Siljander, Jan Lötval, and Marjo Yliperttula. 2017. "Distinct

Bibliographie

- Prostate Cancer-Related mRNA Cargo in Extracellular Vesicle Subsets from Prostate Cell Lines." *BMC Cancer* 17 (1): 92.
- Ledda, F, A I Bravo, S Adris, L Bover, J Mordoh, and O L Podhajcer. 1997. "The Expression of the Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Is Associated with the Neoplastic Progression of Human Melanoma." *The Journal of Investigative Dermatology* 108 (2): 210–14.
- Lee, C.-G., H.-K. Kwon, A. Sahoo, W. Hwang, J.-S. So, J.-S. Hwang, C.-S. Chae, et al. 2012. "Interaction of Ets-1 with HDAC1 Represses IL-10 Expression in Th1 Cells." *The Journal of Immunology* 188 (5): 2244–53.
- Lee, J, M Weber, S Mejia, E Bone, P Watson, and W Orr. 2001. "A Matrix Metalloproteinase Inhibitor, Batimastat, Retards the Development of Osteolytic Bone Metastases by MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells in Balb C Nu/nu Mice." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 37 (1): 106–13.
- Lee, Jong-Kuen, Sae-Ra Park, Bong-Kwang Jung, Yoon-Kyung Jeon, Yeong-Shin Lee, Min-Kyoung Kim, Yong-Goo Kim, Ji-Young Jang, and Chul-Woo Kim. 2013. "Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells." Edited by Songtao Shi. *PLoS ONE* 8 (12): e84256.
- Leprince, D, A Geronne, J Coll, C de Taisne, A Schneeberger, C Lagrou, and D Stehelin. 1983. "A Putative Second Cell-Derived Oncogene of the Avian Leukaemia Retrovirus {E}26." *Nature* 306 (5941): 395–97.
- Li, H, F Huang, L Fan, Y Jiang, X Wang, J Li, Q Wang, et al. 2014. "Phosphatidylethanolamine-Binding Protein 4 Is Associated with Breast Cancer Metastasis through Src-Mediated Akt Tyrosine Phosphorylation." *Oncogene* 33 (37): 4589–98.

Bibliographie

- Li, M, X Liu, G Robinson, U Bar-Peled, K U Wagner, W S Young, L Hennighausen, and P A Furth. 1997. "Mammary-Derived Signals Activate Programmed Cell Death during the First Stage of Mammary Gland Involution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (7): 3425–30.
- Li, Runzhao, Huiping Pei, and Dennis K Watson. 2000. "Regulation of Ets Function by Protein–protein Interactions." *Oncogene* 19 (55): 6514–23.
- Li, Runzhao, Huiping Pei, Dennis K Watson, and Takis S Papas. 2000. "EAP1/Daxx Interacts with ETS1 and Represses Transcriptional Activation of ETS1 Target Genes." *Oncogene* 19 (6): 745–53.
- Li, Shufeng, Xiaofeng Huang, Dapeng Zhang, Qilai Huang, Guoshun Pei, Lixiang Wang, Wenhui Jiang, Qingang Hu, Renxiang Tan, and Zi-Chun Hua. 2013. "Requirement of PEA3 for Transcriptional Activation of FAK Gene in Tumor Metastasis." Edited by Claude Prigent. *PLoS One* 8 (11): e79336.
- Lim, F., N. Kraut, J. Framptom, and T. Graf. 1992. "DNA Binding by c-Ets-1, but Not v-Ets, Is Repressed by an Intramolecular Mechanism." *The EMBO Journal* 11 (2): 643.
- Lin, Chunru, Liuqing Yang, and Michael G. Rosenfeld. 2012. "Molecular Logic Underlying Chromosomal Translocations, Random or Non-Random?" In *Advances in Cancer Research*, 113:241–79.
- Lin, Chunru, Liuqing Yang, Bogdan Tanasa, Kasey Hutt, Bong-gun Ju, Kenny Ohgi, Jie Zhang, et al. 2009. "Nuclear Receptor-Induced Chromosomal Proximity and DNA Breaks Underlie Specific Translocations in Cancer." *Cell* 139 (6): 1069–83.
- Lin, J H, T Saito, D J Anderson, C Lance-Jones, T M Jessell, and S Arber. 1998. "Functionally Related Motor Neuron Pool and Muscle Sensory Afferent Subtypes Defined by Coordinate ETS Gene Expression." *Cell* 95 (3): 393–407.

Bibliographie

- Ling, Y, J H Lakey, C E Roberts, and A D Sharrocks. 1997. "Molecular Characterization of the B-Box Protein-Protein Interaction Motif of the ETS-Domain Transcription Factor Elk-1." *The EMBO Journal* 16 (9): 2431–40.
- Ling, Y, A G West, E C Roberts, J H Lakey, and A D Sharrocks. 1998. "Interaction of Transcription Factors with Serum Response Factor. Identification of the Elk-1 Binding Surface." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (17): 10506–14.
- Liu, A Y, L D True, L LaTray, P S Nelson, W J Ellis, R L Vessella, P H Lange, L Hood, and G van den Engh. 1997. "Cell-Cell Interaction in Prostate Gene Regulation and Cytodifferentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (20): 10705–10.
- Liu, Bo, Jian Cui, Jing Sun, Juan Li, Xiuchun Han, Jie Guo, Min Yi, Norio Amizuka, Xin Xu, and Minqi Li. 2016a. "Immunolocalization of MMP9 and MMP2 in Osteolytic Metastasis Originating from MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells." *Molecular Medicine Reports* 14 (2): 1099–1106.
- Liu, Xin, Ling Wang, Kehao Zhao, Paul R. Thompson, Yousang Hwang, Ronen Marmorstein, and Philip A. Cole. 2008. "The Structural Basis of Protein Acetylation by the p300/CBP Transcriptional Coactivator." *Nature* 451 (7180): 846–50.
- Liu, Yuru, Haiyan Jiang, Howard C Crawford, and Brigid L M Hogan. 2003. "Role for ETS Domain Transcription Factors Pea3/Erm in Mouse Lung Development." *Developmental Biology* 261 (1): 10–24.
- Livet, Jean, Markus Sigrist, Simon Stroebel, Vincenzo De Paola, Stephen R Price, Christopher E Henderson, Thomas M Jessell, and Silvia Arber. 2002. "ETS Gene Pea3 Controls the Central Position and Terminal Arborization of Specific Motor Neuron Pools." *Neuron* 35 (5): 877–92.
- Loeb, Stacy, and William J Catalona. 2014. "The Prostate Health Index: A New Test for

Bibliographie

- the Detection of Prostate Cancer.” *Therapeutic Advances in Urology* 6 (2). SAGE Publications: 74–77.
- Logothetis, Christopher J, and Sue-Hwa Lin. 2005. “Osteoblasts in Prostate Cancer Metastasis to Bone.” *Nature Reviews. Cancer* 5 (1): 21–28.
- Lopez, R G, C Carron, C Oury, P Gardellin, O Bernard, and J Ghysdael. 1999. “TEL Is a Sequence-Specific Transcriptional Repressor.” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 30132–38.
- Lu, Benson C, Cristina Cebrian, Xuan Chi, Satu Kuure, Richard Kuo, Carlton M Bates, Silvia Arber, et al. 2009. “Etv4 and Etv5 Are Required Downstream of GDNF and Ret for Kidney Branching Morphogenesis.” *Nature Genetics* 41 (12): 1295–1302.
- Lu, Zhi Hong, Sergey Kaliberov, Rebecca E Sohn, Lyudmila Kaliberova, Yingqiu Du, Julie L Prior, Daniel J Leib, et al. 2017. “A New Model of Multi-Visceral and Bone Metastatic Prostate Cancer with Perivascular Niche Targeting by a Novel Endothelial Specific Adenoviral Vector.” *Oncotarget* 8 (7). Impact Journals, LLC: 12272–89.
- Luga, Valbona, and Jeffrey L Wrana. 2013. “Tumor-Stroma Interaction: Revealing Fibroblast-Secreted Exosomes as Potent Regulators of Wnt-Planar Cell Polarity Signaling in Cancer Metastasis.” *Cancer Research* 73 (23): 6843–47.
- Maher, C. A., N. Palanisamy, J. C. Brenner, X. Cao, S. Kalyana-Sundaram, S. Luo, I. Khrebtukova, et al. 2009. “Chimeric Transcript Discovery by Paired-End Transcriptome Sequencing.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (30): 12353–58.
- Maira, S M, J M Wurtz, and B Wasylyk. 1996. “Net (ERP/SAP2) One of the Ras-Inducible TCFs, Has a Novel Inhibitory Domain with Resemblance to the Helix-Loop-Helix Motif.” *The EMBO Journal* 15 (21): 5849–65.

Bibliographie

- Mallini, Paraskevi, Thomas Lennard, John Kirby, and Annette Meeson. 2014. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition: What Is the Impact on Breast Cancer Stem Cells and Drug Resistance." *Cancer Treatment Reviews* 40 (3): 341–48.
- Mani, R.-S., S. A. Tomlins, K. Callahan, A. Ghosh, M. K. Nyati, S. Varambally, N. Palanisamy, and A. M. Chinnaiyan. 2009. "Induced Chromosomal Proximity and Gene Fusions in Prostate Cancer." *Science* 326 (5957): 1230–1230.
- Markozannes, Georgios, Ioanna Tzoulaki, Dimitra Karli, Evangelos Evangelou, Evangelia Ntzani, Marc J Gunter, Teresa Norat, John P Ioannidis, and Konstantinos K Tsilidis. 2016. "Diet, Body Size, Physical Activity and Risk of Prostate Cancer: An Umbrella Review of the Evidence." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 69 (December): 61–69.
- Marra, Amanda N., and Rebecca A. Wingert. 2016. "Epithelial Cell Fate in the Nephron Tubule Is Mediated by the ETS Transcription Factors *etv5a* and *etv4* during Zebrafish Kidney Development." *Developmental Biology* 411 (2): 231–45.
- Mason, I J, D Murphy, M Münke, U Francke, R W Elliott, and B L Hogan. 1986. "Developmental and Transformation-Sensitive Expression of the Sparc Gene on Mouse Chromosome 11." *The EMBO Journal* 5 (8): 1831–37.
- Matsui, Koshi, Kazuhito Sugimori, Hiraku Motomura, Naoko Ejiri, Kazuhiro Tsukada, and Isao Kitajima. 2006. "PEA3 Cooperates with c-Jun in Regulation of HER2/neu Transcription." *Oncology Reports* 16 (1): 153–58.
- Mavrothalassitis, George, and Jacques Ghysdael. 2000. "Proteins of the ETS Family with Transcriptional Repressor Activity." *Oncogene* 19 (55): 6524–32.
- McNeal, J E. 1968. "Regional Morphology and Pathology of the Prostate." *American Journal of Clinical Pathology* 49 (3): 347–57.

Bibliographie

- Medrano, Antonio, Josep Ma Fernández-Novell, Laura Ramió, Juan Alvarez, Erwin Goldberg, Ma Montserrat Rivera, Joan J Guinovart, Teresa Rigau, and Joan E Rodríguez-Gil. 2006. "Utilization of Citrate and Lactate through a Lactate Dehydrogenase and ATP-Regulated Pathway in Boar Spermatozoa." *Molecular Reproduction and Development* 73 (3): 369–78.
- Mehra, Rohit, Saravana M Dhanasekaran, Nallasivam Palanisamy, Pankaj Vats, Xuhong Cao, Jung H Kim, David Sl Kim, Timothy Johnson, Douglas R Fullen, and Arul M Chinnaiyan. 2013. "Comprehensive Analysis of ETS Family Members in Melanoma by Fluorescence In Situ Hybridization Reveals Recurrent ETV1 Amplification." *Translational Oncology* 6 (4): 405–12.
- Mehra, Rohit, Scott a. Tomlins, Jianjun Yu, Xuhong Cao, Lei Wang, Anjana Menon, Mark a. Rubin, Kenneth J. Pienta, Rajal B. Shah, and Arul M. Chinnaiyan. 2008. "Characterization of TMPRSS2-ETS Gene Aberrations in Androgen-Independent Metastatic Prostate Cancer." *Cancer Research* 68 (10): 3584–90.
- Mehra, Rohit, Scott a Tomlins, Ronglai Shen, Owais Nadeem, Lei Wang, John T Wei, Kenneth J Pienta, et al. 2007. "Comprehensive Assessment of TMPRSS2 and ETS Family Gene Aberrations in Clinically Localized Prostate Cancer." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 20 (5): 538–44.
- Mendez, M. G., S. I. Kojima, and R. D. Goldman. 2010. "Vimentin Induces Changes in Cell Shape, Motility, and Adhesion during the Epithelial to Mesenchymal Transition." *The FASEB Journal* 24 (6): 1838–51.
- Mengshol, J A, M P Vincenti, and C E Brinckerhoff. 2001. "IL-1 Induces Collagenase-3 (MMP-13) Promoter Activity in Stably Transfected Chondrocytic Cells: Requirement for Runx-2 and Activation by p38 MAPK and JNK Pathways." *Nucleic Acids Research* 29 (21): 4361–72.

Bibliographie

- Mengshol, J A, M P Vincenti, C I Coon, A Barchowsky, and C E Brinckerhoff. 2000. "Interleukin-1 Induction of Collagenase 3 (Matrix Metalloproteinase 13) Gene Expression in Chondrocytes Requires p38, c-Jun N-Terminal Kinase, and Nuclear Factor kappaB: Differential Regulation of Collagenase 1 and Collagenase 3." *Arthritis and Rheumatism* 43 (4): 801–11.
- Mesci, Aruz, Samira Taeb, Xiaoyong Huang, Rishi Jairath, Darshan Sivaloganathan, and Stanley K Liu. 2014. "Pea3 Expression Promotes the Invasive and Metastatic Potential of Colorectal Carcinoma." *World Journal of Gastroenterology* 20 (46): 17376.
- Mesquita, Diana, João D. Barros-Silva, Joana Santos, Rolf I. Skotheim, Ragnhild A. Lothe, Paula Paulo, and Manuel R. Teixeira. 2015. "Specific and Redundant Activities of *ETV1* and *ETV4* in Prostate Cancer Aggressiveness Revealed by Co-Overexpression Cellular Contexts." *Oncotarget* 6 (7): 5217–36.
- Mimeault, Murielle, and Surinder K. Batra. 2013. "Hypoxia-Inducing Factors as Master Regulators of Stemness Properties and Altered Metabolism of Cancer- and Metastasis-Initiating Cells." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17 (1): 30–54.
- Mitchell, P G, H A Magna, L M Reeves, L L Lopresti-Morrow, S A Yocum, P J Rosner, K F Geoghegan, and J E Hambor. 1996. "Cloning, Expression, and Type II Collagenolytic Activity of Matrix Metalloproteinase-13 from Human Osteoarthritic Cartilage." *The Journal of Clinical Investigation* 97 (3): 761–68.
- Miyagi, Yohei, Takeshi Sasaki, Kiyoshi Fujinami, Jinyu Sano, Yutaka Senga, Takeshi Miura, Yoichi Kameda, et al. 2010. "ETS Family-Associated Gene Fusions in Japanese Prostate Cancer: Analysis of 194 Radical Prostatectomy Samples." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23 (11). Nature Publishing Group: 1492–98.

Bibliographie

- Mongiart-Artus, P., I. Brenot-Rossi, P. Beuzeboc, F. Bruyère, G. Karsenty, L. Guy, and C. Bastide. 2013. "Le Traitement Non Hormonal de La Maladie Métastatique Du Cancer de La Prostate." *Progrès En Urologie* 23 (15): 1258–64.
- Monté, D, J L Baert, P A Defosse, Y de Launoit, and D Stéhelin. 1994. "Molecular Cloning and Characterization of Human ERM, a New Member of the Ets Family Closely Related to Mouse PEA3 and ER81 Transcription Factors." *Oncogene* 9 (5): 1397–1406.
- Monté, D, L Coutte, J L Baert, I Angeli, D Stéhelin, and Y de Launoit. 1995. "Molecular Characterization of the Ets-Related Human Transcription Factor ER81." *Oncogene* 11 (4): 771–79.
- Montgomery, R Bruce, Elahe A Mostaghel, Robert Vessella, David L Hess, Thomas F Kalthorn, Celestia S Higano, Lawrence D True, and Peter S Nelson. 2008. "Maintenance of Intratumoral Androgens in Metastatic Prostate Cancer: A Mechanism for Castration-Resistant Tumor Growth." *Cancer Research* 68 (11): 4447–54.
- Morsalin, Sharif, Chunshu Yang, Jinbo Fang, Sampreet Reddy, Shubhalaxmi Kayarthodi, Ed Childs, Roland Matthews, Veena N Rao, and E Shyam P Reddy. 2015. "Molecular Mechanism of β -Catenin Signaling Pathway Inactivation in ETV1-Positive Prostate Cancers." *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology* 2 (3): 208–16.
- Mulholland, David J, Naoko Kobayashi, Marcus Ruscetti, Allen Zhi, Linh M Tran, Jiaoti Huang, Martin Gleave, and Hong Wu. 2012. "Pten Loss and RAS/MAPK Activation Cooperate to Promote EMT and Metastasis Initiated from Prostate Cancer Stem/progenitor Cells." *Cancer Research* 72 (7): 1878–89.
- Mundy, Gregory R. 2002. "Metastasis: Metastasis to Bone: Causes, Consequences and Therapeutic Opportunities." *Nature Reviews Cancer* 2 (8): 584–93.

Bibliographie

- Murre, C, G Bain, M A van Dijk, I Engel, B A Furnari, M E Massari, J R Matthews, M W Quong, R R Rivera, and M H Stuver. 1994. "Structure and Function of Helix-Loop-Helix Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1218 (2): 129–35.
- Myers, E, A D K Hill, G Kelly, E W McDermott, N J O'Higgins, and L S Young. 2006. "A Positive Role for PEA3 in HER2-Mediated Breast Tumour Progression." *British Journal of Cancer* 95 (10): 1404–9.
- Nadiminty, Nagalakshmi, Ramakumar Tummala, Chengfei Liu, Joy Yang, Wei Lou, Christopher P Evans, and Allen C Gao. 2013. "NF- κ B2/p52 Induces Resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer: Role of Androgen Receptor and Its Variants." *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (8): 1629–37.
- Nakouzi, Nader Al, Olivia Bawa, Alain Le Pape, Stéphanie Lerondel, Catherine Gaudin, Paule Opolon, Patrick Gonin, Karim Fizazi, and Anne Chauchereau. 2012. "The IGR-CaP1 Xenograft Model Recapitulates Mixed Osteolytic/Blastic Bone Lesions Observed in Metastatic Prostate Cancer." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 14 (5): 376–87.
- Nan, Ke-Jun, and Ke-Jun Nan. 2011. "Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1 α Pathway Contributes to Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Hepatocellular Carcinoma." *International Journal of Oncology* 40 (2): 461–68.
- Nannuru, Kalyan C, Mitsuru Futakuchi, Michelle L Varney, Thomas M Vincent, Eric G Marcusson, and Rakesh K Singh. 2010. "Matrix Metalloproteinase (MMP)-13 Regulates Mammary Tumor-Induced Osteolysis by Activating MMP9 and Transforming Growth Factor-Beta Signaling at the Tumor-Bone Interface." *Cancer Research* 70 (9): 3494–3504.
- Navone, N M, M Olive, M Ozen, R Davis, P Troncoso, S M Tu, D Johnston, et al. 1997. "Establishment of Two Human Prostate Cancer Cell Lines Derived from a Single Bone Metastasis." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American*

Bibliographie

Association for Cancer Research 3 (12 Pt 1): 2493–2500.

Naylor, Matthew J, Na Li, Julia Cheung, Emma T Lowe, Elise Lambert, Rebecca Marlow, Pengbo Wang, et al. 2005. "Ablation of beta1 Integrin in Mammary Epithelium Reveals a Key Role for Integrin in Glandular Morphogenesis and Differentiation." *The Journal of Cell Biology* 171 (4): 717–28.

Nieto, Cera M, Leah C Rider, and Scott D Cramer. 2014. "Influence of Stromal-Epithelial Interactions on Androgen Action." *Endocrine-Related Cancer* 21 (4): T147-60.

Nodin, Björn, Nooreldin Zendeirokh, Magnus Sundström, and Karin Jirström. 2013. "Clinicopathological Correlates and Prognostic Significance of KRAS Mutation Status in a Pooled Prospective Cohort of Epithelial Ovarian Cancer." *Diagnostic Pathology* 8 (1): 106.

Nothias, J Y, R Weinmann, D Blangy, and F Melin. 1993. "Analysis of Transcription Factors Binding to the Duplicated PEA1 and PEA3 Sites That Are Required for Polyomavirus Mutant Expression in PCC4 Embryonic Carcinoma Cells." *Journal of Virology* 67 (6): 3036–47.

O'Malley, B. 1990. "The Steroid Receptor Superfamily: More Excitement Predicted for the Future." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 4 (3): 363–69.

O'Neill, E M, I Rebay, R Tjian, and G M Rubin. 1994. "The Activities of Two Ets-Related Transcription Factors Required for Drosophila Eye Development Are Modulated by the Ras/MAPK Pathway." *Cell* 78 (1): 137–47.

Oefelein, M G, A Feng, M J Scolieri, D Ricchiutti, and M I Resnick. 2000. "Reassessment of the Definition of Castrate Levels of Testosterone: Implications for Clinical Decision Making." *Urology* 56 (6): 1021–24.

Oh, Sangphil, Sook Shin, and Ralf Janknecht. 2012. "ETV1, 4 and 5: An Oncogenic

Bibliographie

Subfamily of ETS Transcription Factors." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*.

Oh, Sangphil, Sook Shin, Stan A Lightfoot, and Ralf Janknecht. 2013. "14-3-3 Proteins Modulate the ETS Transcription Factor ETV1 in Prostate Cancer." *Cancer Research* 73 (16). NIH Public Access: 5110–19.

Ohshiba, T, C Miyaura, M Inada, and A Ito. 2003. "Role of RANKL-Induced Osteoclast Formation and MMP-Dependent Matrix Degradation in Bone Destruction by Breast Cancer Metastasis." *British Journal of Cancer* 88 (8). Nature Publishing Group: 1318–26.

Oikawa, Tsuneyuki, and Toshiyuki Yamada. 2003. "Molecular Biology of the Ets Family of Transcription Factors." *Gene* 303 (January): 11–34.

Osako, Yusaku, Naohiko Seki, Yoshiaki Kita, Keiichi Yonemori, Keiichi Koshizuka, Akira Kurozumi, Itaru Omoto, et al. 2016. "Regulation of MMP13 by Antitumor microRNA-375 Markedly Inhibits Cancer Cell Migration and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *International Journal of Oncology* 49 (6): 2255–64.

Otero, Miguel, Darren A Plumb, Kaneyuki Tsuchimochi, Cecilia L Dragomir, Ko Hashimoto, Haibing Peng, Eleonora Olivotto, et al. 2012. "E74-like Factor 3 (ELF3) Impacts on Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13) Transcriptional Control in Articular Chondrocytes under Proinflammatory Stress." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (5): 3559–72.

Palanisamy, Nallasivam, Bushra Ateeq, Shanker Kalyana-Sundaram, Dorothee Pflueger, Kalpana Ramnarayanan, Sunita Shankar, Bo Han, et al. 2010. "Rearrangements of the RAF Kinase Pathway in Prostate Cancer, Gastric Cancer and Melanoma." *Nature Medicine* 16 (7): 793–98.

Papas, T S, D K Watson, N Sacchi, S J O'Brien, and R Ascione. 1986. "Molecular Evolution

Bibliographie

of Ets Genes from Avians to Mammals and Their Cytogenetic Localization to Regions Involved in Leukemia." *Gene Amplif Anal* 4: 207–38.

Paulo, Paula, João D. Barros-Silva, Franclim R. Ribeiro, João Ramalho-Carvalho, Carmen Jerónimo, Rui Henrique, Guro E. Lind, Rolf I. Skotheim, Ragnhild A. Lothe, and Manuel R. Teixeira. 2012. "FLI1 Is a Novel ETS Transcription Factor Involved in Gene Fusions in Prostate Cancer." *Genes, Chromosomes and Cancer* 51 (3): 240–49.

Paulo, Paula, Franclim R Ribeiro, Joana Santos, Diana Mesquita, Mafalda Almeida, João D Barros-Silva, Harri Itkonen, et al. 2012. "Molecular Subtyping of Primary Prostate Cancer Reveals Specific and Shared Target Genes of Different ETS Rearrangements." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 14 (7): 600–611.

Peinado, Héctor, David Olmeda, and Amparo Cano. 2007. "Snail, Zeb and bHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype?" *Nature Reviews. Cancer* 7 (6): 415–28.

Pendás, A M, T Matilla, X Estivill, and C López-Otín. 1995. "The Human Collagenase-3 (CLG3) Gene Is Located on Chromosome 11q22.3 Clustered to Other Members of the Matrix Metalloproteinase Gene Family." *Genomics* 26 (3): 615–18.

Pendás, Alberto M., Milagros Balbín, Elena Llano, Maria G. Jiménez, and Carlos López-Otín. 1997. "Structural Analysis and Promoter Characterization of the Human Collagenase-3 Gene (MMP13)." *Genomics* 40 (2): 222–33.

Petitjean, A, M I W Achatz, A L Borresen-Dale, P Hainaut, and M Olivier. 2007. "TP53 Mutations in Human Cancers: Functional Selection and Impact on Cancer Prognosis and Outcomes." *Oncogene* 26 (15): 2157–65.

Pettaway, C A, S Pathak, G Greene, E Ramirez, M R Wilson, J J Killion, and I J Fidler. 1996. "Selection of Highly Metastatic Variants of Different Human Prostatic Carcinomas Using Orthotopic Implantation in Nude Mice." *Clinical Cancer Research : An Official*

Bibliographie

Journal of the American Association for Cancer Research 2 (9): 1627–36.

Pettersson, Andreas, Rebecca E Graff, Scott R Bauer, Michael J Pitt, Rosina T Lis, Edward C Stack, Neil E Martin, et al. 2012. “The TMPRSS2:ERG Rearrangement, ERG Expression, and Prostate Cancer Outcomes: A Cohort Study and Meta-Analysis.” *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 21 (9): 1497–1509.

Pflueger, Dorothee, David S Rickman, Andrea Sboner, Sven Perner, Christopher J LaFargue, Maria A Svensson, Benjamin J Moss, et al. 2009. “N-Myc Downstream Regulated Gene 1 (NDRG1) Is Fused to ERG in Prostate Cancer.” *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (8): 804–11.

Phillips, Roderick J., Javier Mestas, Mehrnaz Gharaee-Kermani, Marie D. Burdick, Antonio Sica, John A. Belperio, Michael P. Keane, and Robert M. Strieter. 2005. “Epidermal Growth Factor and Hypoxia-Induced Expression of CXC Chemokine Receptor 4 on Non-Small Cell Lung Cancer Cells Is Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway and Activation of Hypoxia Inducible Factor-1 α .” *Journal of Biological Chemistry* 280 (23): 22473–81.

Pienta, K. J., and Deborah Bradley. 2006. “Mechanisms Underlying the Development of Androgen-Independent Prostate Cancer.” *Clinical Cancer Research* 12 (6): 1665–71.

Pivetta, Eliana, Martina Scapolan, Marina Pecolo, Bruna Wassermann, Imad Abu-Rumeileh, Luca Balestreri, Eugenio Borsatti, Claudio Tripodo, Alfonso Colombatti, and Paola Spessotto. 2017. “MMP-13 Stimulates Osteoclast Differentiation and Activation in Tumour Breast Bone Metastases.” Accessed October 2.

Podhajcer, Osvaldo L., Lorena Gabriela Benedetti, Maria Romina Girotti, Federico Prada, Edgardo Salvatierra, and Andrea S. Llera. 2008. “The Role of the Matricellular

Bibliographie

- Protein SPARC in the Dynamic Interaction between the Tumor and the Host.” *Cancer and Metastasis Reviews* 27 (4): 691–705.
- Pop, M. S., N. Stransky, C. W. Garvie, J.-P. Theurillat, E. C. Hartman, T. A. Lewis, C. Zhong, et al. 2014. “A Small Molecule That Binds and Inhibits the ETV1 Transcription Factor Oncoprotein.” *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (6): 1492–1502.
- Pratt, William B, Mario D Galigniana, Yoshihiro Morishima, and Patrick J M Murphy. 2004. “Role of Molecular Chaperones in Steroid Receptor Action.” *Essays in Biochemistry* 40: 41–58..
- Pufall, Miles A, and Barbara J Graves. 2002. “Autoinhibitory Domains: Modular Effectors of Cellular Regulation.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18 (1): 421–62.
- Punnen, Sanoj, Nicola Pavan, and Dipen J Parekh. 2015. “Finding the Wolf in Sheep’s Clothing: The 4Kscore Is a Novel Blood Test That Can Accurately Identify the Risk of Aggressive Prostate Cancer.” *Reviews in Urology* 17 (1). MedReviews, LLC: 3–13.
- Qin, Li, Lan Liao, Aisling Redmond, Leonie Young, Yuhui Yuan, Hongwu Chen, Bert W O’Malley, and Jianming Xu. 2008. “The AIB1 Oncogene Promotes Breast Cancer Metastasis by Activation of PEA3-Mediated Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 Expression.” *Molecular and Cellular Biology* 28 (19): 5937–50.
- Qin, Li, Zhaoliang Liu, Hongwu Chen, and Jianming Xu. 2009. “The Steroid Receptor Coactivator-1 Regulates Twist Expression and Promotes Breast Cancer Metastasis.” *Cancer Research* 69 (9): 3819–27.
- Radisky, Evette S., and Derek C. Radisky. 2010. “Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer.” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15 (2): 201–12.

Bibliographie

- Rahim, Said, Elspeth M. Beauchamp, Yali Kong, Milton L. Brown, Jeffrey A. Toretzky, and Aykut Üren. 2011. "YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion." Edited by James McCubrey. *PLoS ONE* 6 (4): e19343.
- Rahim, Said, Tsion Minas, Sung-Hyeok Hong, Sarah Justvig, Haydar Çelik, Yasemin Saygideger Kont, Jenny Han, et al. 2014. "A Small Molecule Inhibitor of ETV1, YK-4-279, Prevents Prostate Cancer Growth and Metastasis in a Mouse Xenograft Model." *PLoS ONE* 9 (12): e114260.
- Ramani, Vishnu C., Anurag Purushothaman, Mark D. Stewart, Camilla A. Thompson, Israel Vlodaysky, Jessie L-S. Au, and Ralph D. Sanderson. 2013. "The Heparanase/syndecan-1 Axis in Cancer: Mechanisms and Therapies." *FEBS Journal* 280 (10): 2294–2306.
- Ran, Leili, Inna Sirota, Zhen Cao, Devan Murphy, Yuedan Chen, Shipra Shukla, Yuanyuan Xie, et al. 2015. "Combined Inhibition of MAP Kinase and KIT Signaling Synergistically Destabilizes ETV1 and Suppresses GIST Tumor Growth." *Cancer Discovery* 5 (3). NIH Public Access: 304–15.
- Ratajczak, J, M Wysoczynski, F Hayek, A Janowska-Wieczorek, and M Z Ratajczak. 2006. "Membrane-Derived Microvesicles: Important and Underappreciated Mediators of Cell-to-Cell Communication." *Leukemia* 20 (9): 1487–95.
- Record, Michel, Kevin Carayon, Marc Poirot, and Sandrine Silvente-Poirot. 2014. "Exosomes as New Vesicular Lipid Transporters Involved in Cell-cell Communication and Various Pathophysiologicals." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (1): 108–20.
- Rimawi, Mothaffar F., Rachel Schiff, and C. Kent Osborne. 2015. "Targeting HER2 for the Treatment of Breast Cancer." *Annual Review of Medicine* 66 (1): 111–28.
- Rizki, Aylin, Valerie M Weaver, Sun-Young Lee, Gabriela I Rozenberg, Koei Chin, Connie A

Bibliographie

- Myers, Jamie L Bascom, et al. 2008. "A Human Breast Cell Model of Preinvasive to Invasive Transition." *Cancer Research* 68 (5). NIH Public Access: 1378–87.
- Robinson, Dan, Eliezer M Van Allen, Yi-Mi Wu, Nikolaus Schultz, Robert J Lonigro, Juan-Miguel Mosquera, Bruce Montgomery, et al. 2015. "Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer." *Cell* 161 (5): 1215–28.
- Robles, A. I., and C. C. Harris. 2010. "Clinical Outcomes and Correlates of TP53 Mutations and Cancer." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (3): a001016–a001016.
- Rowley, Janet D. 2001. "Chromosome Translocations: Dangerous Liaisons Revisited." *Nature Reviews Cancer* 1 (3): 245–50.
- ROWLEY, JANET D. 1973. "A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia Identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining." *Nature* 243 (5405). Nature Publishing Group: 290–93.
- Rubin, Mark A., Christopher A. Maher, and Arul M. Chinnaiyan. 2011. "Common Gene Rearrangements in Prostate Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 29 (27): 3659–68.
- Rumpler, G, B Becker, C Hafner, M McClelland, W Stolz, M Landthaler, R Schmitt, A Bosserhoff, and T Vogt. 2003. "Identification of Differentially Expressed Genes in Models of Melanoma Progression by cDNA Array Analysis: SPARC, MIF and a Novel Cathepsin Protease Characterize Aggressive Phenotypes." *Experimental Dermatology* 12 (6): 761–71.
- Rydziel, S, S Varghese, and E Canalis. 1997. "Transforming Growth Factor beta1 Inhibits Collagenase 3 Expression by Transcriptional and Post-Transcriptional Mechanisms in Osteoblast Cultures." *Journal of Cellular Physiology* 170 (2): 145–52.
- Sakai, N, M Baba, Y Nagasima, Y Kato, K Hirai, K Kondo, K Kobayashi, et al. 2001. "SPARC Expression in Primary Human Renal Cell Carcinoma: Upregulation of SPARC in

Bibliographie

- Sarcomatoid Renal Carcinoma." *Human Pathology* 32 (10): 1064–70.
- Sakakura, T, I Kusano, M Kusakabe, Y Inaguma, and Y Nishizuka. 1987. "Biology of Mammary Fat Pad in Fetal Mouse: Capacity to Support Development of Various Fetal Epithelia in Vivo." *Development (Cambridge, England)* 100 (3): 421–30.
- Salinas, Sara, Anne Briançon-Marjollet, Guillaume Bossis, Marie-Aude Lopez, Marc Piechaczyk, Isabelle Jariel-Encontre, Anne Debant, and Robert A Hipskind. 2004. "SUMOylation Regulates Nucleo-Cytoplasmic Shuttling of Elk-1." *The Journal of Cell Biology* 165 (6): 767–73.
- Sansom, Owen J, Fiona C Mansergh, Martin J Evans, Julie A Wilkins, and Alan R Clarke. 2007. "Deficiency of SPARC Suppresses Intestinal Tumorigenesis in APCMin/+ Mice." *Gut* 56 (10): 1410–14.
- Schultz, Chad, Nancy Lemke, Shugang Ge, William A Golembieski, and Sandra A Rempel. 2002. "Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine Promotes Glioma Invasion and Delays Tumor Growth in Vivo." *Cancer Research* 62 (21): 6270–77.
- Sedý, J., S. Tseng, J. M. Walro, M. Grim, and J. Kucera. 2006. "ETS Transcription Factor ER81 Is Required for the Pacinian Corpuscle Development." *Developmental Dynamics* 235 (4): 1081–89.
- Seidel, Jeffrey J, and Barbara J Graves. 2002. "An {ERK}2 Docking Site in the {Pointed} Domain Distinguishes a Subset of {ETS} Transcription Factors." *Genes Dev.* 16 (1): 127–37.
- Selman, Steven H. 2011. "The McNeal Prostate: A Review." *Urology* 78 (6): 1224–28.
- Selvaggi, Giovanni, and Giorgio V Scagliotti. 2005. "Management of Bone Metastases in Cancer: A Review." *Critical Reviews in Oncology/hematology* 56 (3): 365–78.

Bibliographie

- Selvaraj, Nagarathinam, Justin A Budka, Mary W Ferris, Travis J Jerde, and Peter C Hollenhorst. 2014. "Prostate Cancer ETS Rearrangements Switch a Cell Migration Gene Expression Program from RAS/ERK to PI3K/AKT Regulation." *Molecular Cancer* 13 (1): 61.
- Sendon-Lago, Juan, Samuel Seoane, Noemi Eiro, Maria A Bermudez, Manuel Macia, Tomas Garcia-Caballero, Francisco J Vizoso, and Roman Perez-Fernandez. 2014. "Cancer Progression by Breast Tumors with Pit-1-Overexpression Is Blocked by Inhibition of Metalloproteinase (MMP)-13." *Breast Cancer Research: BCR* 16 (6): 505.
- Serini, Simona, Antonio Zinzi, Renata Ottes Vasconcelos, Elena Fasano, Maria Greca Riillo, Leonardo Celleno, Sonia Trombino, Roberta Cassano, and Gabriella Calviello. 2016. "Role of β -Catenin Signaling in the Anti-Invasive Effect of the Omega-3 Fatty Acid DHA in Human Melanoma Cells." *Journal of Dermatological Science* 84 (2): 149–59.
- SETH, ARUN, DAVID R. HODGE, DELORES M. THOMPSON, LOIS ROBINSON, ALEXANDRA PANAYIOTAKIS, DENNIS K. WATSON, and TAKIS S. PAPAS. 1993. "ETS Family Proteins Activate Transcription from HIV-1 Long Terminal Repeat." *AIDS Research and Human Retroviruses* 9 (10): 1017–23.
- Sgouras, D N, M A Athanasiou, G J Beal, R J Fisher, D G Blair, and G J Mavrothalassitis. 1995. "ERF: An ETS Domain Protein with Strong Transcriptional Repressor Activity, Can Suppress Ets-Associated Tumorigenesis and Is Regulated by Phosphorylation during Cell Cycle and Mitogenic Stimulation." *The EMBO Journal* 14 (19): 4781–93.
- Sharrocks, A D, A L Brown, Y Ling, and P R Yates. 1997. "The ETS-Domain Transcription Factor Family." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (12): 1371–87.
- Shepherd, T G, L Kockeritz, M R Szrajber, W J Muller, and J A Hassell. 2001. "The pea3

Bibliographie

- Subfamily Ets Genes Are Required for HER2/Neu-Mediated Mammary Oncogenesis." *Current Biology : CB* 11 (22): 1739–48.
- Shepherd, T, and J A Hassell. 2001. "Role of Ets Transcription Factors in Mammary Gland Development and Oncogenesis." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 6 (1): 129–40.
- Shiina, Marisa, Yutaka Hashimoto, Taku Kato, Soichiro Yamamura, Yuichiro Tanaka, Shahana Majid, Sharanjot Saini, et al. 2017. "Differential Expression of miR-34b and Androgen Receptor Pathway Regulate Prostate Cancer Aggressiveness between African-Americans and Caucasians." *Oncotarget* 8 (5): 8356–68.
- Shin, S., T.-D. Kim, F. Jin, J. M. van Deursen, S. M. Dehm, D. J. Tindall, J. P. Grande, J.-M. Munz, G. Vasmatazis, and R. Janknecht. 2009. "Induction of Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Modulation of Androgen Receptor by ETS Variant 1/ETS-Related Protein 81." *Cancer Research* 69 (20): 8102–10.
- Siegel, Rebecca, Deepa Naishadham, and Ahmedin Jemal. 2013. "Cancer Statistics, 2013." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 63 (1): 11–30.
- Sieweke, M. H., H Tekotte, U Jarosch, and T Graf. 1998. "Cooperative Interaction of Ets-1 with USF-1 Required for HIV-1 Enhancer Activity in T Cells." *The EMBO Journal* 17 (6): 1728–39.
- Sieweke, M H, H Tekotte, J Frampton, and T Graf. 1996. "MafB Is an Interaction Partner and Repressor of Ets-1 That Inhibits Erythroid Differentiation." *Cell* 85 (1): 49–60.
- Silberstein, G B, K Van Horn, G Shyamala, and C W Daniel. 1994. "Essential Role of Endogenous Estrogen in Directly Stimulating Mammary Growth Demonstrated by Implants Containing Pure Antiestrogens." *Endocrinology* 134 (1): 84–90.
- Singareddy, Rajareddy, Louie Semaan, M Katie Conley-Lacomb, Jason St John, Katelyn

Bibliographie

- Powell, Matthew Iyer, Daryn Smith, et al. 2013. "Transcriptional Regulation of CXCR4 in Prostate Cancer: Significance of TMPRSS2-ERG Fusions." *Molecular Cancer Research : MCR* 11 (11): 1349–61.
- Singh, Dinesh, Phillip G Febbo, Kenneth Ross, Donald G Jackson, Judith Manola, Christine Ladd, Pablo Tamayo, et al. 2002. "Gene Expression Correlates of Clinical Prostate Cancer Behavior." *Cancer Cell* 1 (2): 203–9.
- Singh, Rajesh, Neeraj Kapur, Hina Mir, Nalinaksha Singh, James W Lillard, and Shailesh Singh. 2016. "CXCR6-CXCL16 Axis Promotes Prostate Cancer by Mediating Cytoskeleton Rearrangement via Ezrin Activation and $\alpha\beta 3$ Integrin Clustering." *Oncotarget* 7 (6): 7343–53.
- Slupsky, C M, L N Gentile, L W Donaldson, C D Mackereth, J J Seidel, B J Graves, and L P McIntosh. 1998. "Structure of the {Ets}-1 Pointed Domain and Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Site." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (21): 12129–34.
- Smit, Darren J, Brooke B Gardiner, and Richard A Sturm. 2007. "Osteonectin Downregulates E-Cadherin, Induces Osteopontin and Focal Adhesion Kinase Activity Stimulating an Invasive Melanoma Phenotype." *International Journal of Cancer* 121 (12): 2653–60.
- Smit, Frank P., Maciej Salagierski, Sander Jannink, and Jack A. Schalken. 2013. "High-Resolution *ERG* -Expression Profiling on GeneChip Exon 1.0 ST Arrays in Primary and Castration-Resistant Prostate Cancer." *BJU International* 111 (5): 836–42.
- Soderling, J A, M J Reed, A Corsa, and E H Sage. 1997. "Cloning and Expression of Murine SC1, a Gene Product Homologous to SPARC." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 45 (6): 823–35.
- Sorlie, Therese, Robert Tibshirani, Joel Parker, Trevor Hastie, J S Marron, Andrew Nobel, Shibing Deng, et al. 2003. "Repeated Observation of Breast Tumor Subtypes in

Bibliographie

- Independent Gene Expression Data Sets." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8418–23.
- Sosa, María Soledad, María Romina Girotti, Edgardo Salvatierra, Federico Prada, Juan Antonio López de Olmo, Silvia Juárez Gallango, Juan Pablo Albar, Osvaldo Luis Podhajcer, and Andrea Sabina Llera. 2007. "Proteomic Analysis Identified N-Cadherin, Clusterin, and HSP27 as Mediators of SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteines) Activity in Melanoma Cells." *Proteomics* 7 (22): 4123–34.
- Sottrup-Jensen, L, and H Birkedal-Hansen. 1989. "Human Fibroblast Collagenase-Alpha-Macroglobulin Interactions. Localization of Cleavage Sites in the Bait Regions of Five Mammalian Alpha-Macroglobulins." *The Journal of Biological Chemistry* 264 (1): 393–401.
- Ståhle-Bäckdahl, M, B Sandstedt, K Bruce, A Lindahl, M G Jiménez, J A Vega, and C López-Otín. 1997. "Collagenase-3 (MMP-13) Is Expressed during Human Fetal Ossification and Re-Expressed in Postnatal Bone Remodeling and in Rheumatoid Arthritis." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 76 (5): 717–28.
- Suh, Ja Hee, Jeong-Whan Park, Cheol Lee, and Kyung Chul Moon. 2012. "ERG Immunohistochemistry and Clinicopathologic Characteristics in Korean Prostate Adenocarcinoma Patients." *Korean Journal of Pathology* 46 (5): 423–28.
- Sun, Shihua, Cynthia C T Sprenger, Robert L Vessella, Kathleen Haugk, Kathryn Soriano, Elahe A Mostaghel, Stephanie T Page, et al. 2010. "Castration Resistance in Human Prostate Cancer Is Conferred by a Frequently Occurring Androgen Receptor Splice Variant." *The Journal of Clinical Investigation* 120 (8): 2715–30.
- Svensson, Maria a, Christopher J LaFargue, Theresa Y MacDonald, Dorothee Pflueger, Naoki Kitabayashi, Ashley M Santa-Cruz, Karl E Garsha, et al. 2011. "Testing Mutual Exclusivity of ETS Rearranged Prostate Cancer." *Laboratory Investigation; a Journal*

Bibliographie

of Technical Methods and Pathology 91 (3). Nature Publishing Group: 404–12.

Swamydas, Muthulekha, Krista Ricci, Stephen L. Rego, and Didier Dréau. 2013. “Mesenchymal Stem Cell-Derived CCL-9 and CCL-5 Promote Mammary Tumor Cell Invasion and the Activation of Matrix Metalloproteinases.” *Cell Adhesion & Migration* 7 (3): 315–24.

Sympson, C J, R S Talhouk, C M Alexander, J R Chin, S M Clift, M J Bissell, and Z Werb. 1994. “Targeted Expression of Stromelysin-1 in Mammary Gland Provides Evidence for a Role of Proteinases in Branching Morphogenesis and the Requirement for an Intact Basement Membrane for Tissue-Specific Gene Expression.” *The Journal of Cell Biology* 125 (3): 681–93.

Ta, La, Chengrui Xuan, Nianzeng Xing, and Xiaojun Zhu. 2016. “COP1 Is Downregulated in Renal Cell Carcinoma (RCC) and Inhibits the Migration of RCC ACHN Cells in Vitro.” *Molecular Medicine Reports* 14 (2): 1371–78.

Taichman, Russell S, Carlton Cooper, Evan T Keller, Kenneth J Pienta, Norton S Taichman, and Laurie K McCauley. 2002. “Use of the Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCR4 Pathway in Prostate Cancer Metastasis to Bone.” *Cancer Research* 62 (6): 1832–37.

Tan, J, E Buache, F Alpy, E Daguene, C-L Tomasetto, G-S Ren, and M-C Rio. 2014. “Stromal Matrix Metalloproteinase-11 Is Involved in the Mammary Gland Postnatal Development.” *Oncogene* 33 (31): 4050–59.

Tardif, G, J P Pelletier, M Dupuis, J E Hambor, and J Martel-Pelletier. 1997. “Cloning, Sequencing and Characterization of the 5'-flanking Region of the Human Collagenase-3 Gene.” *The Biochemical Journal* 323 (Pt 1) (April): 13–16.

Taylor, Barry S., Nikolaus Schultz, Haley Hieronymus, Anuradha Gopalan, Yonghong Xiao, Brett S. Carver, Vivek K. Arora, et al. 2010. “Integrative Genomic Profiling of

Bibliographie

- Human Prostate Cancer." *Cancer Cell* 18 (1): 11–22.
- Templeton, N S, P D Brown, A T Levy, I M Margulies, L A Liotta, and W G Stetler-Stevenson. 1990. "Cloning and Characterization of Human Tumor Cell Interstitial Collagenase." *Cancer Research* 50 (17): 5431–37.
- Termine, J D, H K Kleinman, S W Whitson, K M Conn, M L McGarvey, and G R Martin. 1981. "Osteonectin, a Bone-Specific Protein Linking Mineral to Collagen." *Cell* 26 (1 Pt 1): 99–105.
- Thiery, Jean Paul. 2002. "Epithelial–mesenchymal Transitions in Tumour Progression." *Nature Reviews Cancer* 2 (6): 442–54.
- Thomas, R, L D True, J A Bassuk, P H Lange, and R L Vessella. 2000. "Differential Expression of osteonectin/SPARC during Human Prostate Cancer Progression." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6 (3): 1140–49.
- Tian, Ling, Yu-xiang Fang, Jing-lun Xue, and Jin-zhong Chen. 2013. "Four microRNAs Promote Prostate Cell Proliferation with Regulation of PTEN and Its Downstream Signals in Vitro." Edited by Sebastien Pfeffer. *PloS One* 8 (9): e75885.
- Tomlins, S. A., Daniel R Rhodes, Sven Perner, Saravana M Dhanasekaran, Rohit Mehra, Xiao-Wei Sun, Sooryanarayana Varambally, et al. 2005. "Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer." *Science* 310 (5748): 644–48.
- Tomlins, Scott A., Bharathi Laxman, Saravana M. Dhanasekaran, Beth E. Helgeson, Xuhong Cao, David S. Morris, Anjana Menon, et al. 2007. "Distinct Classes of Chromosomal Rearrangements Create Oncogenic ETS Gene Fusions in Prostate Cancer." *Nature* 448 (7153): 595–99.

Bibliographie

Tomlins, Scott a., Rohit Mehra, Daniel R. Rhodes, Lisa R. Smith, Diane Roulston, Beth E. Helgeson, Xuhong Cao, et al. 2006. "TMPRSS2:ETV4 Gene Fusions Define a Third Molecular Subtype of Prostate Cancer." *Cancer Research* 66 (7): 3396–3400.

Tomlins, Scott A., Daniel R. Rhodes, Jianjun Yu, Sooryanarayana Varambally, Rohit Mehra, Sven Perner, Francesca Demichelis, et al. 2008. "The Role of SPINK1 in ETS Rearrangement-Negative Prostate Cancers." *Cancer Cell* 13 (6): 519–28.

Tomlins, Scott A, Bharathi Laxman, Sooryanarayana Varambally, Xuhong Cao, Jindan Yu, Beth E Helgeson, Qi Cao, et al. 2008. "Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 10 (2): 177–88.

Tomlins, Scott a, Daniel R Rhodes, Sven Perner, Saravana M Dhanasekaran, Rohit Mehra, Xiao-Wei Sun, Sooryanarayana Varambally, et al. 2005. "Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer." *Science (New York, N.Y.)* 310 (5748): 644–48.

Torres, Alba, Mohammed Alshalalfa, Scott A Tomlins, Nicholas Erho, Ewan A Gibb, Jijumon Chelliserry, Lony Lim, et al. 2017. "Comprehensive Determination of Prostate Tumor ETS Gene Status in Clinical Samples Using the CLIA Decipher Assay." *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD* 19 (3): 475–84.

Trimble, M S, J H Xin, C T Guy, W J Muller, and J A Hassell. 1993. "PEA3 Is Overexpressed in Mouse Metastatic Mammary Adenocarcinomas." *Oncogene* 8 (11): 3037–42.

Tsubaki, Masanobu, Makiko Komai, Shin-ichiro Fujimoto, Tatsuki Itoh, Motohiro Imano, Kotaro Sakamoto, Hirotaka Shimaoka, et al. 2013. "Activation of NF- κ B by the RANKL/RANK System up-Regulates Snail and Twist Expressions and Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Mammary Tumor Cell Lines." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 32 (1): 62.

Tsukamoto, Ann S, Rudolf Grosschedl, Raphael C Guzman, Tristram Parslow, and Harold

Bibliographie

- E Varmus '. 1988. "Expression of the In&l Gene in Transgenic Mice Is Associated with Mammary Gland Hyperplasia and Adenocarcinomas in Male and Female Mice." *Cell* 55 (0). Cell Press:
- Tyan, Shiaw-Wei, Wen-Hung Kuo, Chun-Kai Huang, Chi-Chun Pan, Jin-Yuh Shew, King-Jen Chang, Eva Y.-H. P. Lee, and Wen-Hwa Lee. 2011. "Breast Cancer Cells Induce Cancer-Associated Fibroblasts to Secrete Hepatocyte Growth Factor to Enhance Breast Tumorigenesis." Edited by Xin-yuan Guan. *PLoS ONE* 6 (1): e15313.
- Upadhyay, Sunil, Chunyan Liu, Aditi Chatterjee, Mohammad O Hoque, Myoung Sook Kim, James Engles, William Westra, Barry Trink, Edward Ratovitski, and David Sidransky. 2006. "LKB1/STK11 Suppresses Cyclooxygenase-2 Induction and Cellular Invasion through PEA3 in Lung Cancer." *Cancer Research* 66 (16): 7870–79.
- Uría, J A, M Stähle-Bäckdahl, M Seiki, A Fueyo, and C López-Otín. 1997. "Regulation of Collagenase-3 Expression in Human Breast Carcinomas Is Mediated by Stromal-Epithelial Cell Interactions." *Cancer Research* 57 (21): 4882–88.
- Valkenburg, Kenneth C, Xiuping Yu, Angelo M De Marzo, Tyler J Spiering, Robert J Matusik, and Bart O Williams. 2014. "Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling in a Subpopulation of Murine Prostate Luminal Epithelial Cells Induces High Grade Prostate Intraepithelial Neoplasia." *The Prostate* 74 (15): 1506–20.
- Varani, J., Y Hattori, Y Chi, T Schmidt, P Perone, M E Zeigler, D J Fader, and T M Johnson. 2000. "Collagenolytic and Gelatinolytic Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Basal Cell Carcinoma of Skin: Comparison with Normal Skin." *British Journal of Cancer* 82 (3): 657–65.
- Vargas, Ana Cristina, Amy E McCart Reed, Nic Waddell, Annette Lane, Lynne E Reid, Chanel E Smart, Sibylle Cocciardi, et al. 2012. "Gene Expression Profiling of Tumour Epithelial and Stromal Compartments during Breast Cancer Progression." *Breast Cancer Research and Treatment* 135 (1): 153–65.

Bibliographie

- Vaz, Juan, Daniel Ansari, Agata Sasor, and Roland Andersson. 2015. "SPARC: A Potential Prognostic and Therapeutic Target in Pancreatic Cancer." *Pancreas* 44 (7): 1024–35.
- Verze, Paolo, Tommaso Cai, and Stefano Lorenzetti. 2016. "The Role of the Prostate in Male Fertility, Health and Disease." *Nature Reviews Urology* 13 (7): 379–86.
- Vesuna, Farhad, Paul van Diest, Ji Hshiong Chen, and Venu Raman. 2008. "Twist Is a Transcriptional Repressor of E-Cadherin Gene Expression in Breast Cancer." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367 (2): 235–41.
- Visakorpi, Tapio, Eija Hyytinen, Pasi Koivisto, Minna Tanner, Riitta Keinänen, Christian Palmberg, Aarno Palotie, Teuvo Tammela, Jorma Isola, and Olli-P. Kallioniemi. 1995. "In Vivo Amplification of the Androgen Receptor Gene and Progression of Human Prostate Cancer." *Nature Genetics* 9 (4): 401–6.
- Vitari, Alberto C., Kevin G. Leong, Kim Newton, Cindy Yee, Karen O'Rourke, Jinfeng Liu, Lilian Phu, et al. 2011. "COP1 Is a Tumour Suppressor That Causes Degradation of ETS Transcription Factors." *Nature* 474 (7351): 403–6.
- Wang, C Y, B Petryniak, I C Ho, C B Thompson, and J M Leiden. 1992. "Evolutionarily Conserved Ets Family Members Display Distinct DNA Binding Specificities." *The Journal of Experimental Medicine* 175 (5): 1391–99.
- Wang, C Y, B Petryniak, C B Thompson, W G Kaelin, and J M Leiden. 1993. "Regulation of the Ets-Related Transcription Factor Elf-1 by Binding to the Retinoblastoma Protein." *Science (New York, N.Y.)* 260 (5112): 1330–35.
- Wang, J., Y. Cai, W. Yu, C. Ren, D. M. Spencer, and M. Ittmann. 2008. "Pleiotropic Biological Activities of Alternatively Spliced TMPRSS2/ERG Fusion Gene Transcripts." *Cancer Research* 68 (20): 8516–24.
- Wang, Jian-Jiang, Yue-Xin Liu, Wei Wang, Wei Yan, Yu-Peng Zheng, Lu-Dong Qiao, Dan

Bibliographie

- Liu, and Shan Chen. 2012. "Fusion between TMPRSS2 and ETS Family Members (ERG, ETV1, ETV4) in Prostate Cancers from Northern China." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 13 (10): 4935–38.
- Wang, Jianhua, Yusuke Shiozawa, Jincheng Wang, Yu Wang, Younghun Jung, Kenneth J Pienta, Rohit Mehra, Robert Loberg, and Russell S Taichman. 2008. "The Role of CXCR7/RDC1 as a Chemokine Receptor for CXCL12/SDF-1 in Prostate Cancer." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (7): 4283–94.
- Wang, Lin, Xingang Wang, Yu Liang, Xinying Diao, and Qingfeng Chen. 2012a. "S100A4 Promotes Invasion and Angiogenesis in Breast Cancer MDA-MB-231 Cells by Upregulating Matrix Metalloproteinase-13." *Acta Biochimica Polonica* 59 (4): 593–98.
- Wang, Qianben, Wei Li, Yong Zhang, Xin Yuan, Kexin Xu, Jindan Yu, Zhong Chen, et al. 2009. "Androgen Receptor Regulates a Distinct Transcription Program in Androgen-Independent Prostate Cancer." *Cell* 138 (2): 245–56.
- Wang, Y, S Hayward, M Cao, K Thayer, and G Cunha. 2001. "Cell Differentiation Lineage in the Prostate." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 68 (4–5): 270–79.
- Wang, Zhong, Yuan-ting Yao, Huan Xu, Yan-bo Chen, Meng Gu, Zhi-kang Cai, and Qi Chen. 2016. "SPOCK1 Promotes Tumor Growth and Metastasis in Human Prostate Cancer." *Drug Design, Development and Therapy* Volume 10 (July): 2311–21.
- WARBURG, O. 1956. "On the Origin of Cancer Cells." *Science (New York, N.Y.)* 123 (3191): 309–14.
- Wasylyk, B., C. Wasylyk, P. Flores, A. Begue, D. Leprince, and D. Stehelin. 1990. "The c-Ets Proto-Oncogenes Encode Transcription Factors That Cooperate with c-Fos and c-Jun for Transcriptional Activation." *Nature* 346 (6280): 191–93.

Bibliographie

- Wasylyk, B, J Hagman, and A Gutierrez-Hartmann. 1998. "Ets Transcription Factors: Nuclear Effectors of the Ras-MAP-Kinase Signaling Pathway." *Trends in Biochemical Sciences* 23 (6): 213–16.
- Wasylyk, C., J. P. Kerckaert, and B. Wasylyk. 1992a. "A Novel Modulator Domain of Ets Transcription Factors." *Genes & Development* 6 (6): 965–74.
- Wasylyk, C, J P Kerckaert, and B Wasylyk. 1992b. "A Novel Modulator Domain of {Ets} Transcription Factors." *Genes Dev.* 6 (6): 965–74.
- Watkins, Gareth, Anthony Douglas-Jones, Richard Bryce, Robert E Mansel, and Wen G Jiang. 2005. "Increased Levels of SPARC (Osteonectin) in Human Breast Cancer Tissues and Its Association with Clinical Outcomes." *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 72 (4): 267–72.
- Watkins Bruner, Deborah, Dirk Moore, Alicia Parlanti, Joanne Dorgan, and Paul Engstrom. 2003. "Relative Risk of Prostate Cancer for Men with Affected Relatives: Systematic Review and Meta-Analysis." *International Journal of Cancer* 107 (5): 797–803.
- Webber, Jason, Robert Steadman, Malcolm D Mason, Zsuzsanna Tabi, and Aled Clayton. 2010. "Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation." *Cancer Research* 70 (23): 9621–30.
- Weber, Cynthia E., and Paul C. Kuo. 2012. "The Tumor Microenvironment." *Surgical Oncology* 21 (3): 172–77.
- Wei, John T, Ziding Feng, Alan W Partin, Elissa Brown, Ian Thompson, Lori Sokoll, Daniel W Chan, et al. 2014. "Can Urinary PCA3 Supplement PSA in the Early Detection of Prostate Cancer?" *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (36): 4066–72.

Bibliographie

- Wernicke, D, C Seyfert, B Hinzmann, and E Gromnica-Ihle. 1996. "Cloning of Collagenase 3 from the Synovial Membrane and Its Expression in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis." *The Journal of Rheumatology* 23 (4): 590–95.
- Whitman, Gary J., Constance T. Albarracin, and Ana Maria Gonzalez-Angulo. 2011. "Triple-Negative Breast Cancer: What the Radiologist Needs to Know." *Seminars in Roentgenology* 46 (1): 26–39.
- Wilson, J D. 1978. "Sexual Differentiation." *Annual Review of Physiology* 40 (1): 279–306.
- Winchester, S K, N Selvamurugan, R C D'Alonzo, and N C Partridge. 2000. "Developmental Regulation of Collagenase-3 mRNA in Normal, Differentiating Osteoblasts through the Activator Protein-1 and the Runt Domain Binding Sites." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (30): 23310–18.
- Winnes, Marta, Erik Lissbrant, Jan Erik Damber, and Göran Stenman. 2007. "Molecular Genetic Analyses of the TMPRSS2-ERG and TMPRSS2-ETV1 Gene Fusions in 50 Cases of Prostate Cancer." *Oncology Reports* 17 (5): 1033–36.
- Witty, J P, S A Foster, G P Stricklin, L M Matrisian, and P H Stern. 1996. "Parathyroid Hormone-Induced Resorption in Fetal Rat Limb Bones Is Associated with Production of the Metalloproteinases Collagenase and Gelatinase B." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11 (1): 72–78.
- Wolf, Irene M., Marjet D. Heitzer, Melanie Grubisha, and Donald B. DeFranco. 2008. "Coactivators and Nuclear Receptor Transactivation." *Journal of Cellular Biochemistry* 104 (5): 1580–86.
- Xing, X, S C Wang, W Xia, Y Zou, R Shao, K Y Kwong, Z Yu, et al. 2000. "The Ets Protein PEA3 Suppresses HER-2/neu Overexpression and Inhibits Tumorigenesis." *Nature Medicine* 6 (2): 189–95.

Bibliographie

- Xu, Jianming, Ray-Chang Wu, and Bert W O'Malley. 2009. "Normal and Cancer-Related Functions of the p160 Steroid Receptor Co-Activator (SRC) Family." *Nature Reviews. Cancer* 9 (9): 615–30.
- Yamamoto, Hiroyuki, Shina Horiuchi, Yasushi Adachi, Hiroaki Taniguchi, Katsuhiko Noshio, Yongfen Min, and Kohzoh Imai. 2004. "Expression of Ets-Related Transcriptional Factor E1AF Is Associated with Tumor Progression and over-Expression of Matrilysin in Human Gastric Cancer." *Carcinogenesis* 25 (3): 325–32.
- Yang, C, L H Shapiro, M Rivera, A Kumar, and P K Brindle. 1998. "A Role for CREB Binding Protein and p300 Transcriptional Coactivators in Ets-1 Transactivation Functions." *Molecular and Cellular Biology* 18 (4): 2218–29.
- Yang, J, K Fizazi, S Peleg, C R Sikes, A K Raymond, N Jamal, M Hu, et al. 2001. "Prostate Cancer Cells Induce Osteoblast Differentiation through a Cbfa1-Dependent Pathway." *Cancer Research* 61 (14): 5652–59.
- Yang, Jing, Sendurai A Mani, Joana Liu Donaher, Sridhar Ramaswamy, Raphael A Itzykson, Christophe Come, Pierre Savagner, Inna Gitelman, Andrea Richardson, and Robert A Weinberg. 2004. "Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis." *Cell* 117 (7): 927–39.
- Yang, Jing, and Robert A. Weinberg. 2008. "Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis." *Developmental Cell* 14 (6): 818–29.
- Yang, S.-H., P Shore, N Willingham, J H Lakey, and A D Sharrocks. 1999. "The Mechanism of Phosphorylation-Inducible Activation of the ETS-Domain Transcription Factor Elk-1." *The EMBO Journal* 18 (20): 5666–74.
- Yang, Shen-Hsi, Ellis Jaffray, Ron T Hay, and Andrew D Sharrocks. 2003. "Dynamic Interplay of the SUMO and ERK Pathways in Regulating Elk-1 Transcriptional

Bibliographie

Activity." *Molecular Cell* 12 (1): 63–74.

Yu, Jindan, Jianjun Yu, Ram-Shankar Mani, Qi Cao, Chad J Brenner, Xuhong Cao, Xiaoju Wang, et al. 2010. "An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression." *Cancer Cell* 17 (5): 443–54.

Yu, Y, C-H Xiao, L-D Tan, Q-S Wang, X-Q Li, and Y-M Feng. 2014. "Cancer-Associated Fibroblasts Induce Epithelial-mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells through Paracrine TGF- β Signalling." *British Journal of Cancer* 110 (3): 724–32.

Yuan, Zhong-Yu, Ting Dai, Shu-Sen Wang, Rou-Jun Peng, Xing-Hua Li, Tao Qin, Li-Bing Song, and Xi Wang. 2014. "Overexpression of ETV4 Protein in Triple-Negative Breast Cancer Is Associated with a Higher Risk of Distant Metastasis." *OncoTargets and Therapy* 7 (September): 1733–42.

Yuen, Hiu-Fung, Yuen-Kwong Chan, Claire Grills, Cian M McCrudden, Vignesh Gunasekharan, Zhanzhong Shi, Ashley San-Yu Wong, et al. 2011. "Polyomavirus Enhancer Activator 3 Protein Promotes Breast Cancer Metastatic Progression through Snail-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition." *The Journal of Pathology* 224 (1): 78–89.

Zhang, Bin, Xuchen Cao, Yanxue Liu, Wenfeng Cao, Fei Zhang, Shiwu Zhang, Hongtao Li, et al. 2008a. "Tumor-Derived Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13) Correlates with Poor Prognoses of Invasive Breast Cancer." *BMC Cancer* 8 (March). BioMed Central: 83.

Zhang, Long, Fangfang Zhou, and Peter ten Dijke. 2013. "Signaling Interplay between Transforming Growth Factor- β Receptor and PI3K/AKT Pathways in Cancer." *Trends in Biochemical Sciences* 38 (12): 612–20.

Zinck, R, R A Hipskind, V Pingoud, and A Nordheim. 1993. "C-Fos Transcriptional

Bibliographie

Activation and Repression Correlate Temporally with the Phosphorylation Status of TCF." *The EMBO Journal* 12 (6): 2377–87.

Zong, Yang, Li Xin, Andrew S Goldstein, Devon A Lawson, Michael A Teitell, and Owen N Witte. 2009. "ETS Family Transcription Factors Collaborate with Alternative Signaling Pathways to Induce Carcinoma from Adult Murine Prostate Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (30): 12465–70.

RÉSUMÉ

ETV1, 4, 5 sont des facteurs de transcription appartenant au groupe PEA3 de la famille ETS. Ces facteurs sont exprimés lors du développement embryonnaire dans les organes se mettant en place par morphogenèse de branchement puis chez l'adulte au niveau physiologique comme pathologique ; ainsi leur surexpression est souvent associée au développement de nombreux cancers. Le projet de thèse a porté sur deux approches orientées autour de cancers homono-dépendants ; le cancer du sein et le cancer de la prostate:

① La première approche concerne l'étude de l'implication d'ETV4 dans la tumorigénèse mammaire et la caractérisation de MMP13 en tant que gène cible et relais potentiel de l'effet pro-tumorigène induit par ETV4. Nous avons ainsi montré, dans des cellules mammaires cancéreuses, la régulation de l'expression de *MMP13* par ETV4 *via* l'étude de son promoteur, au niveau transcriptionnel et protéique. Nous avons ensuite montré par des tests phénotypiques *in vitro* que ETV4 promeut la tumorigénèse mammaire et que MMP13 en est un relais. En effet, la surexpression de MMP13 contribue aux effets pro-tumorigène *in vitro* et l'inhibition de MMP13 dans un contexte de surexpression d'ETV4 les diminue. Cette approche a été complétée *in vivo* et a permis de révéler que MMP13 est un médiateur de l'activité pro-tumorigène d'ETV4. Enfin, l'analyse de l'expression de *MMP13* et *ETV4* dans une cohorte de 456 échantillons de cancer du sein, montre que la surexpression concomitante d'ETV4 et de MMP13 est associée à un mauvais pronostic en termes de survie. **Ainsi, ce premier projet a permis de définir que MMP13 agit en tant que relais du facteur ETV4 dans la tumorigénèse mammaire.**

② La seconde approche que nous avons développée porte sur le rôle du facteur ETV1, du groupe PEA3, dans la progression métastatique du cancer de la prostate (CaP) et la recherche de gènes cibles impliqués. Les fusions de gènes impliquant les facteurs ERG et ETV1 de la famille ETS et leur surexpression sont fréquentes dans les cancers de la prostate et représentent environ 50% et 10% des cas respectivement. Afin de décrypter le rôle du facteur ETV1, en comparaison avec les données déjà bien caractérisées sur ERG, différents modèles de cellules de CaP surexprimant/réprimant ETV1 ont été mis en place. Leur phénotype a été étudié *in vitro* grâce à différents tests phénotypiques mais aussi *in vivo via* l'injection des cellules en intracardiaque. Nous avons ainsi montré que le facteur ETV1 augmente les capacités tumorigènes de cellules cancéreuses prostatiques et qu'une forme tronquée (retrouvée de façon récurrente dans les fusions associées au CaP) a des effets opposés ; et qu'*in vivo* le facteur ETV1 induit une capacité de formation de métastases osseuses plus importante que la forme tronquée. Cette étude a aussi été complétée par la définition de *SPARC* (codant l'Ostéonectine, une glycoprotéine matricielle) comme gène cible potentiel du facteur ETV1 et étudié le statut d'expression d'ETV1, de sa forme tronquée et de *SPARC* dans une cohorte de 88 échantillons de cancers de la prostate et 10 échantillons de prostate « saine ». **Ainsi les résultats obtenus ont permis de confirmer le statut pro-tumorigène du facteur ETV1 dans le CaP, de définir une différence entre la forme pleine longueur et la version tronquée et de préciser l'implication d'ETV1 dans la formation des métastases osseuses du CaP. Ces résultats ouvrent la voie vers la recherche plus approfondie de la mécanistique liée à ces propriétés métastatiques et aux différences potentielles d'action par rapport aux fusions ERG, avec pour but final la recherche d'outils de diagnostic, de pronostic ou de thérapie du CaP, outils manquants actuellement.**