

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2019

THESE 2019/TOU3/2033

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

Adrien GUERARD

Rôle des adipocytes dans la dissémination locale
et à distance du cancer de la prostate

Date de soutenance : mardi 2 juillet 2019

Directeur de thèse : Pr Catherine Muller

JURY

Président : Pr Catherine Muller
1er assesseur : Pr Etienne Chatelut
2ème assesseur : Dr Matthieu Roumigué

« La science, mon garçon, est faite d'erreurs, mais d'erreurs qu'il est bon de commettre car elles mènent peu à peu à la vérité »

- Jules Vernes

Je tenais à remercier mes rapporteurs de thèse d'exercice, le Pr Etienne Chatelut, président de ce jury de thèse, et le Dr Matthieu Roumigué, pour l'attention qu'ils ont portée à mon travail et les conseils qu'ils m'ont prodigués. Toutes leurs remarques ont été riches d'enseignements pour moi. Merci d'avoir partagé avec moi cette discussion scientifique ainsi que vos connaissances dans ce domaine.

Je remercie mon Directeur de thèse, le Pr. Catherine Muller. Au-delà de ma thèse d'université, Cathie me suit depuis près de huit ans et m'a accompagnée au cours de mes études en tant que pharmacien et en tant que scientifique. Bien plus qu'un simple directeur, je considère Cathie comme un de mes mentors qui m'a permis d'évoluer et de prendre mon autonomie scientifique et professionnelle au cours de mes années de travail avec elle.

Je remercie Philippe Valet pour l'aide et les conseils qu'il m'a apportés au cours de ces quatre dernières années. Je le remercie aussi pour le rôle qu'il m'a permis de tenir au sein de l'école doctorale. Cette activité a été riche d'enseignements et particulièrement importante pour moi.

Je remercie le Dr Victor Laurent qui a initié la thématique du cancer de la prostate dans l'équipe et m'a fait confiance pour prendre la suite de ce projet. Au cours de ces deux thèses consécutives nous avons été capable de décrypter un nouveau mécanisme de dissémination depuis la sortie de la prostate jusqu'à la métastase osseuse. Je suis particulièrement heureux d'avoir pu travailler avec lui et de pouvoir désormais le considérer non plus comme un simple collègue mais comme un ami.

Je remercie le Dr Camille Attané. Bien qu'elle ne soit arrivée que récemment et que nous n'ayons travaillé ensemble que quelques mois, je suis content d'avoir partagé ces moments avec elle et d'avoir appris à la connaître. Je suis heureux et confiant de lui transmettre le flambeau des adipocytes médullaires. Je lui souhaite bon courage dans ses recherches.

Je remercie les membres de l'équipe MICA avec qui j'ai pu travailler et partager au cours de ces nombreuses années. Je tiens à remercier aussi certains des « anciens » de l'équipe : le Dr Marielle Ousset, le Dr Béatrice Dirat, le Dr Yuan Yuan Wang et le Dr Ludivine Bochet. J'ai pu interagir avec elles depuis mon master 1 et elles m'ont toutes beaucoup appris et m'ont aidé dans mon choix de poursuivre dans la recherche. Je tenais à remercier tout particulièrement Ludivine Bochet, mon encadrante de M1, qui m'a fait découvrir les joies de la biologie et du microenvironnement tumoral et sans qui je ne me serais pas consacré au domaine de la cancérologie.

Je remercie les membres de l'IPBS avec qui j'ai pu travailler au cours de ces années de recherche. Merci à eux d'avoir partagé ces moments parfois difficiles avec moi en gardant toujours leur bonne humeur.

Merci aux différentes associations qui m'ont permis de garder une « vie » à côtés de la thèse : Le bright club, l'ancienne WIP, le TUC canne de combat et la fédération de savate, boxe française & disciplines associées... Elles m'ont toutes fait vivre des aventures humaines et personnelles parfois incroyables.

Je remercie mes amis qui m'ont soutenu depuis mes études de pharmacie jusqu'à la fin de ma thèse. Merci à eux d'avoir été là, de m'avoir écouté et de m'avoir redonné confiance en moi dans les moments difficiles.

Merci à ma famille pour leur soutien au cours de ces nombreuses années d'études et de travail, merci à eux d'avoir toujours été là pour moi dans les moments de joie et de déprime.

Enfin, merci à Jessica qui partage ma vie et qui a réussi à m'accompagner au cours de la rédaction de ma thèse (bien que ça n'ait pas toujours été facile). Merci à elle pour tout ce qu'elle m'apporte dans mon quotidien et dans ma vie.

Et surtout, merci à tous ! Hélas, je n'ai pas la place ici pour nommer tous les gens que j'aimerais remercier et j'en oublie sans doute certains. Néanmoins, ceux qui sont important pour moi se reconnaîtront et sauront que ces remerciements sont aussi pour eux.

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} janvier 2019

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitolo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERAEEVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. Olichon A.	Biochimie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitolo-Universitaires		Assistant Associé des Universités	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	Mme MARTINI H	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. METSU D.	Pharmacologie		
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S	Biophysique		

Sommaire

RESUME	5
ABSTRACT	6
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	9
INTRODUCTION GENERALE.....	9
PARTIE I : LA PROSTATE : SA PHYSIOLOGIE ET SES PATHOLOGIES CANCEREUSES	11
I. PHYSIOLOGIE DE LA PROSTATE SAINNE	11
A. Sa localisation.....	11
B. Son anatomie	11
C. Sa composition tissulaire et cellulaire.....	13
D. Ses fonctions.....	14
II. LES PATHOLOGIES CANCEREUSES DE LA PROSTATE	15
A. Généralités sur les néoplasies de la prostate	15
1. L'hypertrophie bénigne.....	15
2. Les lésions pré-cancéreuses.....	16
3. Les cancers de la prostate.....	16
B. L'évolution des adénocarcinomes prostatiques	18
1. L'extension locale	18
2. La dissémination métastatique	19
C. Le diagnostic des cancers de la prostate	23
1. Généralités	23
2. Le dosage du PSA	24
3. L'examen anatomopathologique	25
4. Les examens d'imagerie.....	25
D. La classification clinique des cancers de la prostate.....	27
1. La classification TNM.....	27
2. Le score de Gleason	28
3. La classification d'Amico	29
E. Le traitement des cancers de la prostate localisés.....	30
1. La surveillance active.....	31
2. La prostatectomie radicale.....	31
3. La radiothérapie externe.....	32
4. La curiethérapie.....	32
5. La cryothérapie.....	32
6. La thérapie par ultrasons focalisés.....	33
F. Le traitement des cancers de la prostate disséminés et métastatiques.....	33
1. La chimiothérapie anti-tumorale	33
2. L'hormonothérapie.....	34
3. Les traitements de la métastase osseuse	34
4. Les immunothérapies anti-tumorales.....	35
G. Les facteurs favorisant les cancers de la prostate	36
1. Les facteurs de risque connus.....	36
2. Deux facteurs d'importance majeure : l'obésité et le vieillissement	38
PARTIE II : LES TISSUS ADIPEUX : TYPES, FONCTIONS ET MODIFICATIONS.....	40
I. LES DIFFERENTS TYPES DE TISSUS ADIPEUX	40
A. Le tissu adipeux blanc	40
1. Sa localisation	40
2. Ses origines.....	40
3. Fonctions et sécrétions	41
B. Le tissu adipeux brun.....	42
1. Sa localisation	42
2. Ses origines.....	43
3. Ses fonctions	43

C. Le tissu adipeux beige	45
1. Sa localisation et son origine.....	45
2. Ses fonctions	46
D. Le tissu adipeux rose	46
II. DES CAS PARTICULIERS DE TISSUS ADIPEUX : LE TISSU ADIPEUX PERIPROSTATIQUE ET LE TISSU ADIPEUX MEDULLAIRE.....	47
A. Le tissu adipeux périprostatique	47
1. Sa localisation et ses origines	47
2. Ses fonctions	47
B. Le tissu adipeux médullaire	48
1. Sa localisation et sa répartition.....	48
2. Des origines complexes : une différenciation par étapes.....	49
3. Ses fonctions et son rôle dans l'homéostasie du corps humain.....	53
III. LES MODIFICATIONS PHYSIOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DU TISSU ADIPEUX	54
A. Les méthodes d'évaluations : IMC et autres techniques	54
B. L'obésité.....	55
1. Description et physiopathologie.....	55
2. Les effets sur les différents tissus adipeux.....	56
C. La restriction calorique	58
1. Description et physiopathologie.....	58
2. Les effets sur les différents tissus adipeux.....	59
D. Le vieillissement.....	60
1. Description et physiopathologie.....	60
2. Les effets sur les différents tissus adipeux.....	63
PARTIE III : MICROENVIRONNEMENT ET PROGRESSION TUMORALE	65
I. GENERALITES SUR LE MICROENVIRONNEMENT	65
II. LES ADIPOCYTES DANS LE MICROENVIRONNEMENT.....	67
A. Les adipocytes associés au cancer	68
B. Effet des adipocytes sur la progression locale : survie et prolifération cellulaire	70
1. Les facteurs solubles	70
2. Le transfert de lipides	73
C. Effet des adipocytes sur la dissémination locale et à distance	73
1. Les MMP et le remaniement de l'ECM.....	73
2. Le transfert de lipides dans la métastase.....	74
3. Les chimiokines	75
4. Les exosomes	76
PARTIE IV : CHIMIOKINES ET CANCER	78
I. GENERALITES	78
II. CHIMIOKINES ET PROGRESSION TUMORALE	78
A. Chimiokine et prolifération tumorale.....	79
B. Chimiokine et angiogenèse.....	80
C. Chimiokine, migration dirigée et dissémination métastatique	80
RESULTATS.....	85
I. EFFET DU TISSU ADIPEUX PERIPROSTATIQUE SUR LA DISSEMINATION LOCALE DU CANCER DE LA PROSTATE : ROLE DE L'AXE CCR3/CCL7	87
II. ROLE DES ADIPOCYTES MEDULLAIRES DANS LA DISSEMINATION OSSEUSE DU CANCER DE LA PROSTATE : REGULATION PAR L'OBESEITE ET LE VIEILLISSEMENT	105
III. DISSEMINATION DU CANCER DE LA PROSTATE : UN CHEMIN PAVE DE GRAS	137
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	143
I. DISSEMINATION LOCALE ET ROLE DU TISSU ADIPEUX PERIPROSTATIQUE	144
II. DISSEMINATION METASTATIQUE ET ROLE DES ADIPOCYTES MEDULLAIRES	148
III. L'AXE CCR3/CCL7 : UN NOUVEL AXE THERAPEUTIQUE DANS LE CANCER DE LA PROSTATE ?	152
CONCLUSION GENERALE.....	154

REFERENCES.....	156
------------------------	------------

Résumé :

La prostate est entourée de tissu adipeux périprostatique (TAPP), séparée de celui-ci uniquement par une fine barrière de collagène appelée la capsule prostatique. En clinique, l'infiltration du TAPP par des cellules tumorales est l'un des principaux critères histologiques de mauvais pronostic suggérant que le TAPP (en particulier les adipocytes) pourrait être un acteur clé de l'agressivité du cancer de la prostate. Dans un premier temps, nous avons identifié une chimiokine adipocytaire (CCL7) et un de ses récepteur (CCR3) qui contribuent à la dissémination des cellules cancéreuses à l'extérieur de la prostate. En effet, à travers des approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons montré que l'inhibition de l'axe CCR3/CCL7 diminue la dissémination locale du cancer de la prostate avec un effet plus prononcé en conditions d'obésité. De plus, l'expression de ce récepteur est associée à l'agressivité tumorale et à la rechute chez les patients. Au-delà de la dissémination locale, une des complications du cancer de la prostate les plus graves et les plus dures à traiter reste la dissémination métastatique osseuse. Fort des résultats obtenus dans la première partie de notre travail, nous avons voulu savoir si les adipocytes médullaires présents au niveau du site métastatique osseux étaient capable d'attirer les cellules tumorales par les mêmes mécanismes que le TAPP. En utilisant des échantillons d'adipocytes médullaires issus de patients lors d'approches *in vitro*, nous avons pu montrer que les adipocytes médullaires présentent un phénotype différent de ceux du TAPP et qu'ils sécrètent la chimiokine CCL7 en quantité bien plus élevée. Cette dernière va ainsi induire la migration des cellules tumorales prostatiques vers le site osseux suivant un axe CCR3/CCL7. En inhibant cet axe, nous avons pu montrer *in vivo* et *in vitro* le potentiel de cet axe comme cible thérapeutique, puisqu'il nous a permis d'empêcher spécifiquement la formation de métastases osseuses. Nous avons pu confirmer l'importance de l'axe CCR3/CCL7 dans le cancer de la prostate métastatique par des méta-analyses cliniques et des études sur des tumeurs de patients. Enfin, nous avons pu montrer que les modifications physiopathologiques des adipocytes comme l'obésité et le vieillissement tous deux considérés comme des facteurs de risque du cancer de la prostate, augmentent fortement la migration induite par les adipocytes médullaires. En conclusion, nos résultats montrent que les adipocytes périprostatiques et médullaires sont capables d'influencer la progression du cancer de la prostate en favorisant, via la sécrétion de chimiokines, le franchissement de la capsule prostatique puis la dissémination métastatique osseuse. L'ensemble de ces mécanismes est amplifié en conditions d'obésité ou de vieillissement ce qui permet de proposer de nouveaux mécanismes moléculaires à l'émergence de cancers plus agressifs chez ces patients. Ainsi notre travail a permis d'identifier l'axe CCR3/CCL7 comme un axe majeur dans la dissémination du cancer de la prostate induite par le tissu adipeux, intervenant aussi bien au niveau local qu'au niveau métastatique.

Abstract:

The prostate is surrounded by periprostatic adipose tissue (PPAT), separated from it only by a thin layer of collagen called the prostatic capsule. Clinically, PPAT infiltration by tumor cells is one of the main histological criteria for poor prognosis suggesting that PPAT (especially adipocytes) could play a key role in the aggressiveness of prostate cancer. Initially, we identified an adipocyte chemokine (CCL7) and one of its receptors (CCR3) that contribute to the local dissemination of prostate cancer cells, outside of the prostate. Indeed, through in vitro and in vivo approaches, we have shown that inhibition of the CCR3 / CCL7 axis decreases the local dissemination of prostate cancer with an enhanced effect in obesity. In addition, the expression of this receptor is associated with tumor aggressiveness and relapse in patients. Beyond local dissemination, one of the main and deadliest complication of prostate cancer remains bone metastasis. Regarding results obtained in the first part of our work, we investigated, whether the medullary adipocytes, present at the bone metastatic site, were able to attract the tumor cells by the same mechanisms as in the PPAT. Using medullary adipocyte samples from patients in in vitro approaches, we showed that the medullary adipocytes have a different phenotype from those of PPAT and that they secrete high amounts of CCL7 chemokines. Thus, secreted CCL7 will induce the migration of prostate cancer cells to the bone metastatic site, through the CCL7 / CCR3 axis. By inhibiting this axis, we were able to show in vivo and in vitro its potential as a therapeutic target, since it allowed us to specifically prevent the formation of bone metastases. We were able to confirm the importance of the CCL7 / CCR3 axis in metastatic prostate cancer by clinical meta-analysis and patient tumor studies. Finally, we have been able to show that the physiopathological modifications of adipocytes, such as obesity and aging, both considered as risk factors for prostate cancer, greatly increase the migration induced by the medullary adipocytes. In conclusion, our results show that periprostatic and medullary adipocytes are both able to influence prostate cancer progression, through the secretion of chemokines, by promoting prostatic barrier crossing, local dissemination and bone metastatic dissemination. All these mechanisms are amplified in conditions of obesity or aging which allows us to propose new molecular mechanisms leading to the emergence of more aggressive cancers in these patients. Thus, our work allowed us to identify the CCR3 / CCL7 axis as a major axis in the adipose tissue-induced dissemination of prostate cancer, both at local and metastatic level.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADF	Adipocytes-Derived Fibroblast
AMPK	AMP Activated Protein Kinase
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
C/EBP	CAAT/Enhancer Binding Proteins
CAAs	Cancer Associated Adipocytes
CAFs	Cancer Associated Fibroblasts
CLS	Crown Like Structure
COL6	Collagen VI
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
CZ	Central Zone
FABP	Fatty Acid-Binding Protein
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSP-1	Fibroblast-Specific Protein-1
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
GRKs	G Protein-Coupled Receptor Kinases
HBME	Human Bone Marrow Endothelial cell
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
JAK-/STAT3	Janus tyrosine Kinase-2/Signal Transducer and Activators of Transcription 3
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP	Monocytes Specific Protein
MMP	Matrix MetalloProteinase
MEC	Matrice extracellulaire
NOX	NADPH oxidase
PAI1	Plasminogen activator inhibitor 1
PAP	Prostatic Acid Phosphatase
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	PhosphoInositol-3-kinase
PIN	Prostatic Intraepithelial Neoplasia
PIP	Phosphatidylinositol

PKA	Protein kinase A
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PSA	Prostate Specific Antigen
PZ	Peripheral Zone
ROS	Reactive Oxygen Species
TAPP	Tissu adipeux Périprostatique
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNM	Tumor Node Metastasis
TRAMP	The Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate
TZ	Transition Zone
UCP-1	Uncoupling protein 1
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor
Wnt	Wingless-type MMTV integration site

Introduction

Introduction générale

Il est désormais établi que les cellules tumorales ne progressent pas seules mais en interaction étroite avec les cellules qui les entourent et composent le microenvironnement tumoral^{1,2}. Les adipocytes sont récemment apparus comme des acteurs majeurs de ce microenvironnement, bien loin des simples fonctions structurales et métaboliques qu'on leur prêtait³⁻⁶. Ces cellules ont longtemps été négligées mais il s'avère qu'elles sont aussi capables de sécréter un large panel de molécules et d'influencer le développement de certains cancers comme le cancer du sein^{3,5} ou le cancer de la prostate invasif^{7,8}. Ainsi, dans le cancer de la prostate, qui est le modèle que j'ai étudié au cours de ma thèse, l'infiltration locale du tissu adipeux entourant la prostate (tissu adipeux périprostatique) par les cellules tumorales est un critère anatomopathologique majeur de mauvais pronostic⁹. Par ailleurs, on retrouve aussi des adipocytes au niveau du site métastatique majeur du cancer de la prostate. Ces adipocytes, appelés adipocytes médullaires, sont encore très peu connus et étudiés mais semblent être capables d'interagir avec les cellules tumorales¹⁰⁻¹³. Enfin, l'obésité¹⁴ et le vieillissement¹⁵, qui sont deux facteurs connus pour modifier le tissu adipeux, sont capables d'influencer l'agressivité et les capacités de dissémination du cancer de la prostate. Les adipocytes sont donc présents tout au long du développement de certains cancers comme le cancer de la prostate. Il paraît donc essentiel de s'intéresser à leur place dans le microenvironnement tumoral et les interactions qu'ils peuvent avoir avec les cellules cancéreuses.

Au cours de ma thèse, j'ai donc étudié l'effet des adipocytes périprostatiques sur la dissémination locale et des adipocytes médullaires sur la dissémination à distance du cancer de la prostate. J'ai aussi pu m'intéresser à l'effet de l'obésité sur les disséminations locale et à distance, ainsi que l'effet du vieillissement sur la dissémination métastatique osseuse. Avant de présenter mes résultats, je ferai un état de l'art sur les caractéristiques des différents tissus adipeux, sur le cancer de la prostate et sur le microenvironnement tumoral en y décrivant plus précisément le rôle qu'y jouent les adipocytes. Dans une dernière partie, je décrirai aussi les chimiokines, de petites molécules impliquées dans la migration dirigée et particulièrement importante pour la compréhension de mes travaux.

Je décrirai ensuite mon travail de thèse, qui a été divisé en deux parties. Le premier axe porte sur la dissémination locale. J'ai pu montrer que les adipocytes du tissu adipeux périprostatiques sécrètent la chimiokine CCL7, qui peut interagir avec le récepteur CCR3 des cellules tumorales prostatiques. Ces dernières sont alors guidées hors de la prostate et vont envahir le tissu adipeux périprostatique. Au cours de ces expériences, j'ai aussi pu montrer que ce mécanisme était amplifié par l'obésité (Article 1).

Dans le second axe, mes travaux se sont concentrés sur la métastase osseuse du cancer de la prostate et sur le lien avec les adipocytes de la moelle osseuse. J'y ai retrouvé une implication majeure du même axe CCR3/CCL7. Dans ce modèle, j'ai montré que la sécrétion de CCL7 était assurée par les adipocytes médullaires et était renforcée en cas d'obésité ou de vieillissement (Article 2).

Enfin, je conclurai la présentation de mes travaux par une discussion sur l'implication de ces découvertes, sur les nouveaux axes de recherches qu'ils ouvrent et surtout sur leurs potentielles implications et utilisations thérapeutiques

PARTIE I : La prostate : sa physiologie et ses pathologies cancéreuses

I. Physiologie de la prostate saine :

A. Sa localisation :

La prostate est une glande essentielle au bon fonctionnement de l'appareil uro-génital chez l'homme. Elle se situe sous la vessie, juste devant le rectum et entoure le canal de l'urètre qui la traverse depuis la base jusqu'au sommet (Figure 1). La base de la prostate comprend une partie ventrale délimitée par la vessie et les uretères (sus- et sous-montanales) et une partie dorsale délimitée par les canaux déférents et les vésicules séminales^{16,17} (Figure 1).

Son développement est fortement lié à l'imprégnation hormonale de l'individu. Sous l'effet des androgènes et tout particulièrement de la testostérone, la prostate va croître au cours de la puberté jusqu'à atteindre, vers l'âge de 20 ans, une masse moyenne de 15 à 20 grammes.¹⁶ Dans des conditions physiologiques normales, la taille de la glande prostatique va rester stable jusqu'à l'âge moyen de 60 ans, à partir duquel une seconde phase de croissance reprend. Cette seconde phase de croissance conduit à une hypertrophie bénigne de la prostate retrouvée chez 80% des hommes de plus de 80 ans¹⁸. Ce phénomène a été parfois associé au concept de déficit androgénique lié à l'âge aussi appelé andropause¹⁹. Bien que ce concept soit encore débattu, il semblerait que la diminution de testostérone liée au vieillissement soit en partie à l'origine de cette reprise de croissance de la glande prostatique. En effet, avec l'âge et la baisse de la testostérone, on assiste à une inversion du ratio testostérone/oestrogène qui modifierait la croissance de la glande prostatique et conduirait à l'hypertrophie bénigne de la prostate¹⁹.

B. Son anatomie :

Du point de vue anatomique, la prostate est un organe complexe composé de plusieurs types de tissus répartis au sein de différentes régions. Cette complexité a abouti à plusieurs descriptions de son anatomie. La première description, datant de 1912 et faite par Lowsley, répartissait la prostate en quatre lobes anatomiques : un médian, un antérieur, un postérieur et un latéral^{17,20,21}. Cette description, bien que très proche de l'observation anatomique générale de la prostate, présentait de nombreuses limites. Elle était ainsi assez inadaptée au repérage de zones précises au sein de la prostate et ne convenait donc pas à un usage chirurgical ou diagnostique. Par ailleurs, chaque lobe étant composé de plusieurs zones tissulaires, il n'existait pas de réalité radiologique¹⁷. Néanmoins, dans le cas de l'hypertrophie bénigne de la prostate, cette

description présente un certain intérêt car se référer aux lobes permet de mieux évaluer le développement de la maladie²⁰.

A cause des manquements du modèle en lobes, McNeal proposa dans les années 1960 un nouveau modèle de prostate basé sur des zones. Les travaux de McNeal se fondaient sur une grande analyse anatomique issue de l'observation de prostates de cadavres d'hommes adultes²¹⁻²³. Cette description sépare les zones suivant la composition tissulaire, l'origine de leurs tissus et leur localisation. On définit ainsi cinq tissus et donc cinq zones au sein de la prostate : le stroma fibromusculaire antérieur, le tissu péri-urétéral glandulaire, ainsi que les trois zones glandulaires principales : la zone de transition, la zone centrale et la zone périphérique. Tout autour de la prostate, on retrouve une mince couche de collagène et de fibres musculaires qui sépare la prostate des autres tissus environnants et que l'on appelle la capsule prostatique^{17,22,24}.

Cette description présente un intérêt majeur puisqu'elle est non seulement précise mais aussi en accord avec l'imagerie et les pratiques de chirurgie et de biopsie car elle repose sur une ségrégation d'origine à la fois anatomique et tissulaire. Un autre point important est le lien entre cette description et le développement des pathologies. En effet, chaque zone a un rapport particulier avec les pathologies prostatiques. L'hypertrophie bénigne de la prostate n'apparaît ainsi que dans les zones de transition alors que les prostatites se développent dans les zones périphériques. Les adénocarcinomes, quant à eux, apparaissent surtout dans la zone périphérique (70%), beaucoup moins dans les zones transitionnelles (20%) et sont quasiment absents de la zone centrale (10%)^{17,24,25}. La description zonale n'a finalement été adoptée couramment qu'à partir des années 1980, mais elle reste à ce jour le modèle le plus pertinent et le plus utilisé pour décrire l'anatomie prostatique^{22,23} (Figure 1).

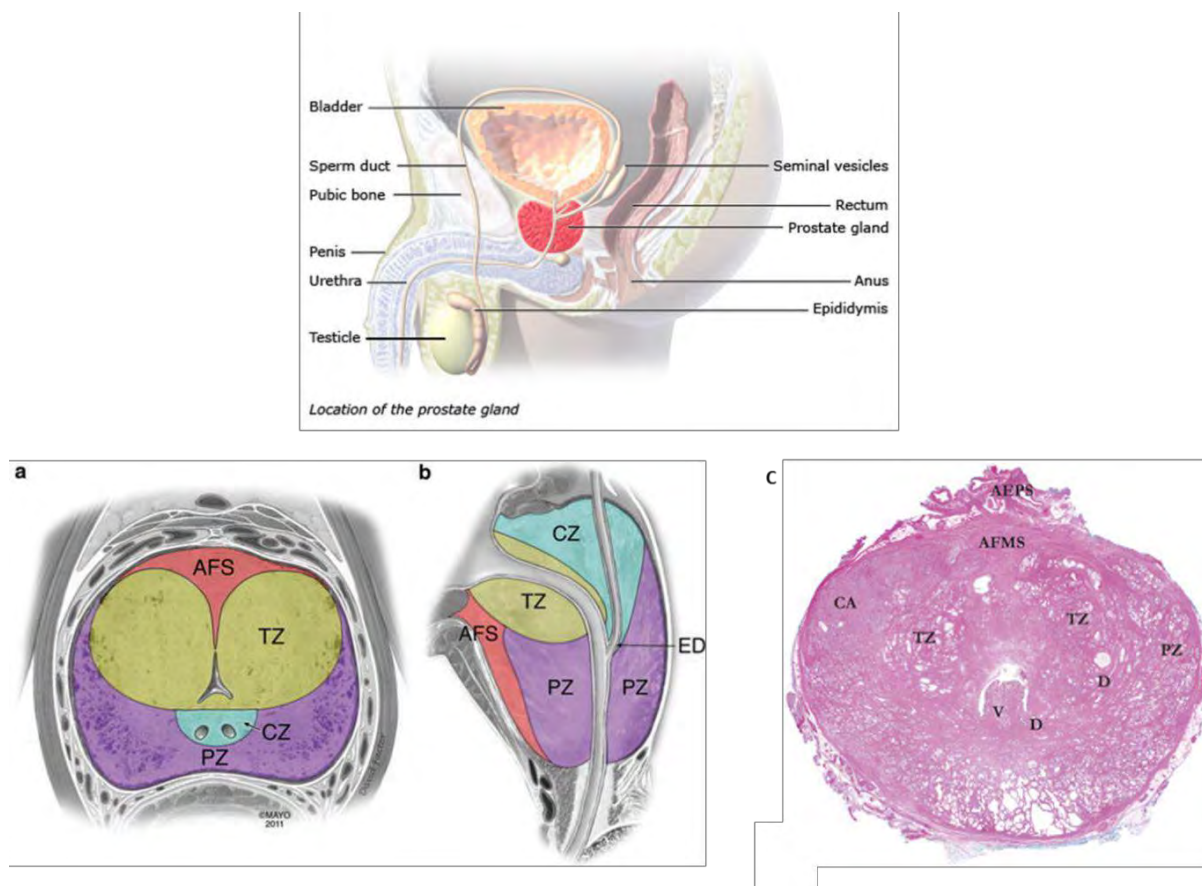


Figure 1 : Localisation et anatomie de la prostate. Localisation anatomique de la prostate au niveau de l'appareil urogénital d'un homme adulte (partie du haut) et anatomie zonale de la glande prostatique décrite par un schéma en coupe transversale (a), sagittale (b) et par coupe histologique transversale (c). La coupe histologique représentée en (c) est la même que celle représentée en (a). AFS : Antero-fibromuscular stroma, TZ : zone de transition, PZ : zone périphérique, CZ : zone centrale. D'après Coakley F.V. *et al*, Radiologic clinics of North America, 2000

C. Sa composition tissulaire et cellulaire :

Au niveau cellulaire, la prostate est composée majoritairement d'un épithélium glandulaire lui permettant d'exercer ses fonctions. On retrouve dans cet épithélium deux couches distinctes^{26,27} : une couche épithéliale luminale et une couche épithéliale basale. Une première couche épithéliale luminale composée de cellules différenciées assurant les fonctions de synthèse et de sécrétion de la prostate. Adossée à cette couche luminale, on trouve une couche basale composée par des cellules souches (CD133+)²⁸ et des cellules en cours de différenciation destinées à remplacer les cellules de la couche luminale. Au sein de l'épithélium, on retrouve aussi de façon sporadique des cellules neuroendocrines capables de synthétiser et sécréter des composés particuliers (sérotonine et peptides hormonaux)^{26,27}. Cet épithélium est soutenu et entouré par un stroma fibromusculaire contenant les autres cellules nécessaires au fonctionnement et au maintien de la structure de la prostate : cellules nerveuses, fibres

musculaires lisses, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules dendritiques et cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes)^{26,27}. De façon intéressante, en dehors de leur rôle dans le maintien et l'homéostasie de la prostate, les cellules stromales peuvent aussi influencer les sécrétions prostatiques en agissant de façon paracrine sur la différenciation des cellules épithéliales prostatiques²⁹ (Figure 2).

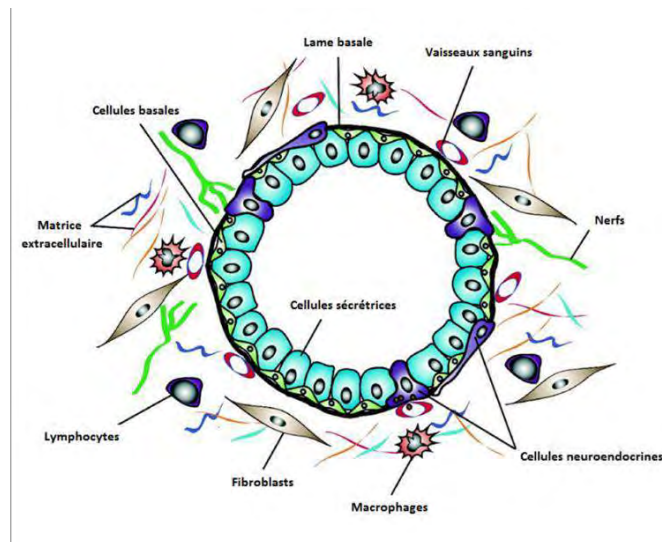


Figure 2 : composition cellulaire et tissulaire de la prostate. Schéma des différentes populations cellulaires et structures de la prostate (droite) D'après Van Der Green D.J. *et al*, Cancer Research, 2008

D. Ses fonctions :

La prostate possède deux fonctions majeures :

- Une fonction sécrétoire : elle stocke et sécrète le liquide séminal. Ce liquide est riche en métabolites (citrate, glucose ...), en polyamines (spermine ...) mais aussi en enzymes. Ces enzymes sont divisées majoritairement en deux types : les kalicréines (comme le Prostate Specific Antigen : PSA)³⁰ et les phosphatases (comme la Prostatic acid Phosphatase : PAP)^{30,31}. Ces cocktails d'enzymes permettent une bonne fluidité du sperme en favorisant sa liquéfaction.
- Une fonction purement anatomique : de par sa position autour de l'urètre, la prostate aide à la régulation de la miction. En effet, les ligaments et muscles situés autour de la prostate permettent de comprimer l'urètre et donc de bloquer la miction^{16,32}. Cependant avec l'apparition d'une hypertrophie bénigne de la prostate, l'augmentation en taille de la glande va parfois induire un blocage plus ou moins important de l'urètre. On aboutit ainsi à un syndrome associant impériosité de miction, pollakiurie et diminution des volumes de miction¹⁸. Par ailleurs, à cause de ce mécanisme, les atteintes musculaires ou nerveuses à la

suite d'une prostatectomie sont responsables d'une incontinence urinaire (plus ou moins temporaire suivant les patients)³³.

II. Les pathologies cancéreuses de la prostate :

A. Généralités sur les néoplasies de la prostate :

1. L'hypertrophie bénigne :

La prostate est un organe pouvant développer différents types de tumeurs. Tout d'abord on trouve l'hypertrophie bénigne de la prostate. Il s'agit d'une tumeur bénigne de la prostate extrêmement répandue puisqu'elle touche près de 80% des hommes de plus de 80 ans¹⁸. Elle est issue d'une croissance globale excessive de la prostate et de son augmentation en taille (Figure 3). Les raisons de cette croissance excessive sont peu connues mais semblent fortement liées aux hormones stéroïdiennes (testostérone et œstrogènes)¹⁸. Néanmoins, il est désormais clair que cette maladie est de cause multifactorielle et que l'étiologie peut varier suivant les individus. Il en va donc de même pour les réponses aux traitements, ces derniers devant être adaptés à chaque patient²⁰. L'hypertrophie bénigne a peu d'impact sur la santé et l'espérance de vie d'un patient, elle présente néanmoins une gêne fonctionnelle importante et détériore sa qualité de vie. Les symptômes et gênes sont surtout d'ordre urinaire avec par exemple une pollakiurie ainsi qu'une impériosité de mictions.

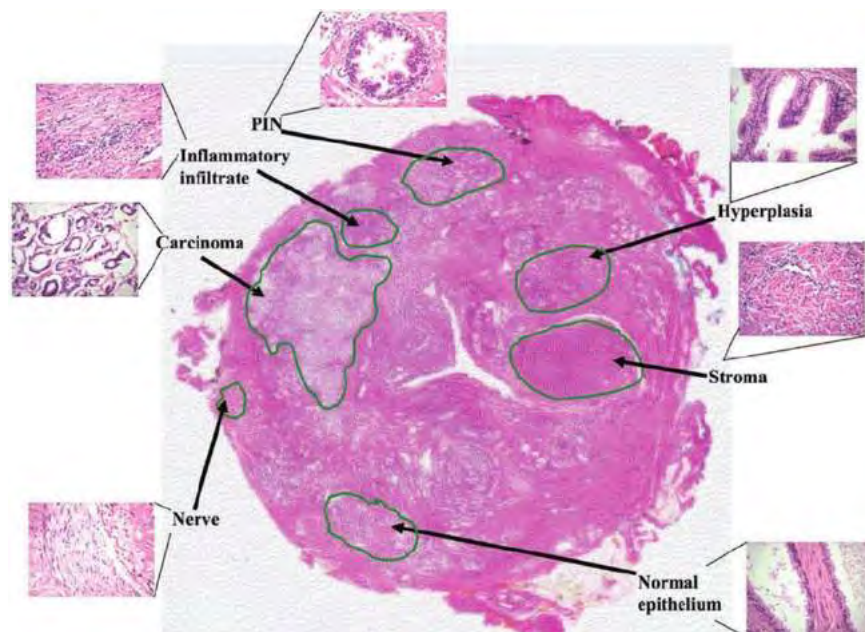


Figure 3 : les différentes lésions du cancer de la prostate. Coupe histologique des différentes structures et lésions bénignes et malignes de la prostate. D'après Gannot G. *et al*, Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2005

2. Les lésions pré-cancéreuses :

On trouve ensuite les lésions pré-cancéreuses représentées par les Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN)^{34,35}. Elles se caractérisent par une prolifération des cellules épithéliales bordant les canaux et les acini prostatiques. Ces lésions sont importantes à repérer en cas de biopsie car il s'agit des seules lésions réellement identifiées comme pré-cancéreuses et capables de se développer vers un carcinome prostatique. Au contraire, les atrophies adénomateuses atypiques, les dysplasies épithéliales de bas grade et les atrophies glandulaires sont souvent remises en cause et ne sont actuellement pas considérées comme de réelles lésions pré-cancéreuses. Du point de vue de la prise en charge clinique, les PIN n'entraînent cependant pas de changement de traitement et servent surtout à repérer et suivre les patients à risque^{34,35} (Figure 3).

3. Les cancers de la prostate :

Enfin, on retrouve les lésions néoplasiques malignes regroupées sous le terme de cancer de la prostate. Les cancers de la prostate sont un enjeu majeur de santé publique avec une incidence particulièrement forte puisqu'on estime qu'en 2012 l'incidence mondiale était de 1,1 million de nouveaux cas, les plaçant aussi à la seconde place des cancers chez l'homme. Sa mortalité lui accorde la cinquième place des cancers les plus mortels chez l'homme avec 307 000 décès en 2012^{36,37}. Bien qu'il soit présent majoritairement dans les pays développés (70% des cas), on le retrouve tout de même réparti dans le monde entier, ce qui en fait un enjeu majeur pour la santé publique mondiale^{36,37}. On peut aussi noter quelques points positifs dans l'évolution des données épidémiologiques avec une récente baisse de l'incidence et de la mortalité de ce cancer (en particulier en France). Cette amélioration provient de l'action combinée de meilleurs diagnostics, prise en charge, traitements et préventions contre ce cancer^{36,38,39} (Figure 4).

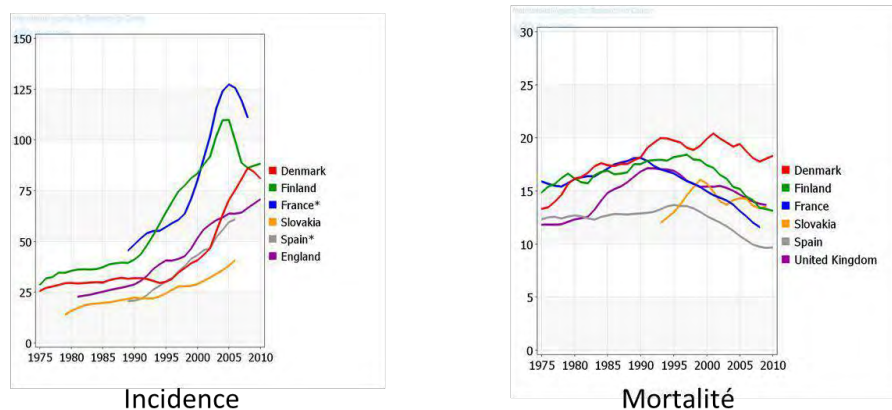
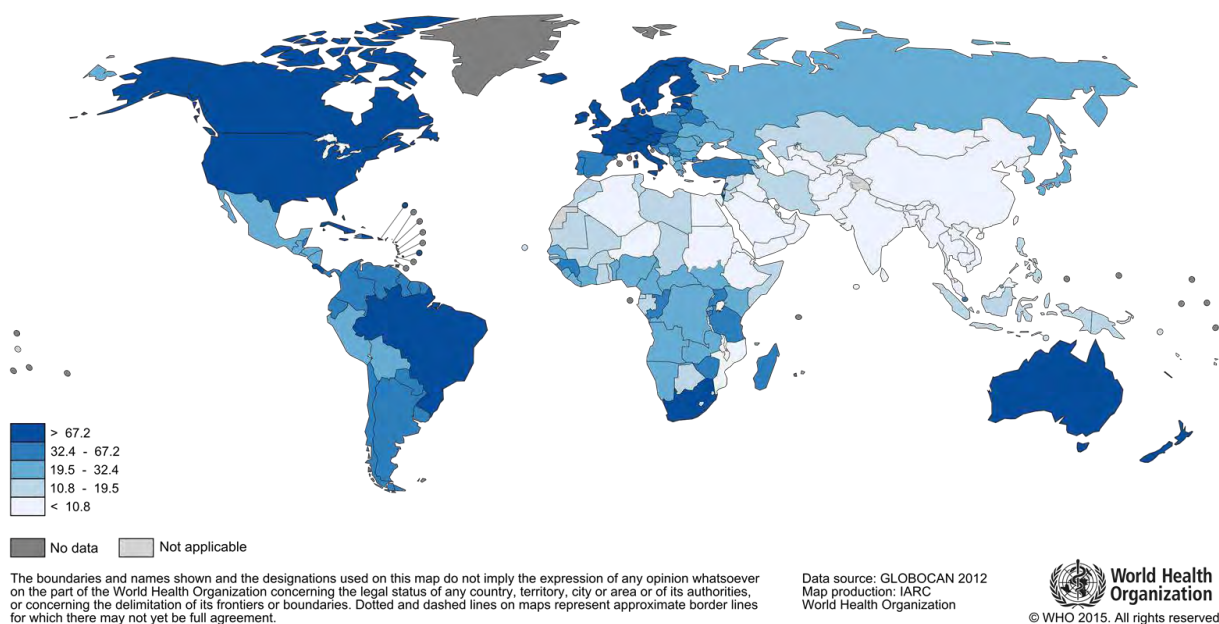


Figure 4 : Epidémiologie du cancer de la prostate. (a) Incidence mondiale du cancer de la prostate et (b) évolution des incidence et mortalité régionales du cancer de la prostate. D'après GLOBOCAN 2012, OMS

Les tumeurs malignes de la prostate peuvent être séparées en plusieurs familles. On retrouve majoritairement les adénocarcinomes prostatiques. Ils représentent 90 à 95% des tumeurs de la prostate et sont aussi désignés par le terme d'adénocarcinomes acineux (par opposition aux autres adénocarcinomes qui sont eux considérés comme non acineux)^{40,41}. Ces derniers se développent à partir des cellules épithéliales luminales des glandes prostatiques (Figure 3).

Les autres tumeurs prostatiques sont beaucoup plus rares puisqu'elles ne représentent que 10% des cancers et sont beaucoup plus variables en ce qui concerne leur origine. Parmi elles on retrouve (Figure 3) :

- Les carcinomes à petites cellules prostatiques^{42,43}: ce type de cancer très agressif est composé de petites cellules épithéliales rondes. Contrairement aux autres adénocarcinomes

prostatiques, ils ne sécrètent pas de PSA, ce qui les rend indétectables par les dosages sanguins de ce facteur.

- Les carcinomes épidermoïdes à cellules squameuses^{44,45}: ces carcinomes, eux aussi très agressifs, ne proviennent pas des cellules épithéliales glandulaires mais d'autres épithéliums prostatiques. Les cellules tumorales peuvent ainsi provenir des cellules basales des acini ou des épithéliums de transition de l'urètre et des canaux prostatiques. Tout comme les carcinomes à petites cellules, ils ne sécrètent pas de PSA et sont donc de diagnostic difficile.
- Les sarcomes prostatiques^{46,47} : il s'agit d'un des cancers de la prostate les plus rares (moins de 0,1% des cas). Contrairement aux adénocarcinomes, l'origine n'est pas épithéliale mais conjonctive. Dans le cas présent, les cellules tumorales dérivent des cellules musculaires lisses contenues dans la prostate. Contrairement aux autres cancers de la prostate, celui-ci apparaît chez des patients relativement jeunes (entre 35 et 60 ans). Ce cancer est particulièrement agressif et de très mauvais pronostic. Par ailleurs son évolution vers les sites métastatiques ne suit pas l'évolution d'un cancer de la prostate classique (carcinome) mais suit un spectre métastatique qui lui est propre.

A noter que l'on peut aussi trouver des tumeurs dans la prostate issue du développement de tumeurs de la vessie et de l'urètre. On parle alors de carcinomes transitionnels de la prostate⁴⁸. Il s'agit néanmoins de cas très particuliers.

A cause de leur importance en santé publique et de leur fréquence, le reste de nos démonstrations et de nos travaux porteront sur les adénocarcinomes prostatiques^{16,17}.

B. L'évolution des adénocarcinomes prostatiques :

1. L'extension locale :

La tumeur va tout d'abord rester localisée au sein de la prostate et y croître. Cette étape de croissance est plus ou moins lente et dure plus ou moins longtemps suivant le type de cancer de la prostate. Dans le cas des adénocarcinomes, cette évolution est relativement longue et peut passer inaperçue. Néanmoins, une dissémination locale n'est pas pour autant sans risque puisqu'elle est de plus en plus souvent classée dans les cancers avancés à prendre en charge rapidement et sérieusement⁴⁹. Au cours de ce processus, les cellules tumorales vont franchir la barrière prostatique et disséminer aux organes directement environnants. Le cancer va ainsi passer d'un stade local à un stade localement avancé. Ce franchissement se fait le plus souvent en suivant les espaces péri-nerveux situés en latéro-postérieur de la prostate⁵⁰. En suivant ce

chemin, les cellules tumorales vont d'abord entrer en contact avec les dépôts adipeux périprostatiques, situés tout autour de la prostate, et les envahir⁵⁰. Il est à noter que cette invasion du tissu adipeux prostatique est considérée comme un facteur de mauvais pronostic d'un point de vue clinique⁹. Par la suite, les cellules tumorales vont continuer de se propager à la loge prostatique et envahir d'autres structures de l'appareil uro-génital comme les vésicules séminales⁵¹.

2. La dissémination métastatique :

Au-delà de la dissémination locale, le cancer va continuer de se développer et se propager à d'autres organes, entraînant le développement de métastases. On désigne par métastase la dissémination à distance d'un cancer. Il s'agit de l'apparition de nouveaux foyers tumoraux, issus de la tumeur primaire, dans d'autres organes. Les cellules tumorales générant les métastases possèdent les caractéristiques de la tumeur et de l'organe dont elles sont originaires et non pas de leur nouvel organe de destination^{52,53}. Afin de métastaser, les cellules tumorales doivent franchir la membrane basale de la tumeur, envahir localement l'organe primaire puis disséminer à distance. Ainsi, la génération de métastases est un processus complexe divisé en quatre grandes étapes^{52,53}:

- L'intravasation au cours de laquelle les cellules tumorales vont quitter leur organe d'origine ou le site secondaire de dissémination (métastase) et passer dans la lumière des vaisseaux (sanguin ou lymphatique)
- La dissémination pendant laquelle les cellules tumorales vont disséminer à travers tout l'organisme en empruntant la circulation sanguine ou lymphatique.
- L'extravasation qui est un phénomène apparaissant au moment où les cellules tumorales entrent en contact avec un organe les attirant. Dans ce cas il s'opère un phénomène semblable à celui de diapédèse pour les cellules immunitaires. Les cellules tumorales vont ainsi se rapprocher de l'endothélium lors d'une phase de capture, puis adhérer de façon labile à l'aide de sélectines en effectuant un roulement à la surface de l'endothélium avant de se fixer par adhésion forte en utilisant des intégrines. Enfin, les cellules tumorales vont franchir la barrière endothéliale et passer dans l'organe cible par un phénomène de transmigration, achevant ainsi leur extravasation.
- Enfin les cellules tumorales vont s'installer au sein de l'organe par une étape de nidation. Cette étape est essentielle au développement de la métastase. En effet, une cellule tumorale ne pourra s'installer et se développer au sein d'un organe si et seulement si

son environnement est adapté et qu'il y a présence d'une niche métastatique adéquate. Une fois les cellules tumorales en place, elles formeront ainsi une micrométastase qui pourra évoluer lors d'une phase de colonisation pour augmenter en taille et former une macrométastase.

Cette dissémination peut se faire de deux manières : soit par voie lymphatique, soit par voie sanguine⁵⁴⁻⁵⁶. Dans le premier cas, les cellules tumorales vont effectuer leur extravasation dans les vaisseaux lymphatiques, rejoindre dans un premier temps le ganglion lymphatique le plus proche, que l'on appelle ganglion sentinelle, et l'envahir. Par la suite l'ensemble de la chaîne ganglionnaire sera affecté. Puis les cellules tumorales passeront dans la circulation sanguine en suivant les canaux lymphatiques (droits et thoraciques) qui se rejoignent au niveau de la veine cave supérieure. De là, les cellules tumorales dissémineront vers différents organes où elles développeront de nouvelles métastases⁵⁴⁻⁵⁶. Dans la dissémination par voie sanguine, les cellules tumorales effectuent leur extravasation directement vers le système sanguin en passant par les capillaires sanguins entourant les cellules tumorales. Lors de cette étape, le rôle de la néoangiogénèse tumorale est particulièrement important. La perméabilité des néovaisseaux péri-tumoraux favorise par ailleurs l'étape d'extravasation. Dans ce cas, les cellules tumorales vont ainsi rejoindre la circulation sanguine et disséminer vers les différents organes cibles directement^{52,55}. Une fois la métastase formée à distance dans un nouvel organe, des cellules issues de ce site métastatique vont disséminer à nouveau vers de nouveaux sites et générer de nouvelles métastases. Pour chaque cancer seuls certains organes vont pouvoir accueillir les cellules initiatrices de métastases. Selon ce concept, appelé «seed and soil», pour obtenir une métastase, il faut une cellule spécifique capable de générer une métastase *de novo* et une niche capable d'attirer et d'accueillir ces cellules dans un organe^{57,58}.

Dans le cas du cancer de la prostate, les sites métastatiques sont majoritairement l'os (présent dans 84% des cas), les ganglions lymphatiques (dans 10,6% des cas), le foie (dans 10,2% des cas) et enfin les poumons (dans 9,1% des cas)⁵⁹⁻⁶¹.

La formation de la métastase osseuse du cancer de la prostate présente quelques particularités. Au cours de ce processus, les cellules tumorales circulantes vont être recrutées au niveau des niches périvasculaires de la moelle osseuse et s'y installer⁶². Elles vont alors former une nouvelle métastase, envahissant ainsi la moelle osseuse. Au cours de ce processus les cellules tumorales vont aussi remanier la matrice osseuse. Dans le cas du cancer de la prostate, on décrit cette métastase comme mixte et ostéocondensante⁶³, elles vont ainsi agir à la fois sur les ostéoblastes et les ostéoclastes afin d'accélérer aussi bien la dégradation que la production de

l'os^{64,65}. On assiste alors à une accélération et une modification de l'équilibre dynamique osseux en faveur de l'activité ostéoblastique et donc de la production de matrice minérale osseuse. Cet effet aboutit à une ostéocondensation visible au niveau du site métastatique. De façon paradoxale, loin de renforcer la structure osseuse, cette ostéocondensation erratique va fragiliser l'os, d'autant plus que l'action ostéoclastique est elle aussi activée. Il en résulte de nombreuses fractures chez les patients métastatiques⁶⁴⁻⁶⁶. Il est intéressant de noter que la métastase osseuse du cancer de la prostate est une des seules métastases ostéo-condensante et mixte parmi les métastases osseuses des tumeurs solides. Les autres cancers métastatiques à fort tropisme osseux comme le poumon ou le sein génèrent des métastases ostéolytiques qui activent les ostéoclastes et favorise la dégradation de la matrice osseuse au niveau du site métastatique⁶³.

Les théories sur la dissémination métastatique ont changé au cours de ces dernières années. En effet jusqu'à récemment, on considérait que les cellules capables de générer des métastases étaient toutes issues de la tumeur primaire et pouvaient disséminer vers les différents organes cibles. Mais plusieurs études innovantes se sont intéressées aux variations géniques des différentes cellules métastatiques. Il est désormais clair que de nouvelles métastases peuvent être générées à partir de métastases déjà existantes. Suivant les mêmes mécanismes qu'une dissémination à distance classique, des cellules génératrices de métastases peuvent être issues d'une métastase et ainsi former des métastases dans de nouveaux organes spécifiques⁶⁷⁻⁶⁹. Dans le cas du cancer de la prostate, il a été montré que le site métastatique osseux est souvent un des sites initiaux de métastases et est capable de disséminer de cette manière vers les autres organes (foie, poumons et sites plus rares)^{69,70}.

La métastase osseuse est donc la complication métastatique la plus fréquente mais aussi probablement la plus importante et la plus grave du cancer de la prostate. Si l'on s'intéresse plus précisément à la répartition de ces métastases dans les différents os, de grandes études cliniques ont pu montrer que les deux sites les plus fréquents sont le fémur et l'axe vertébral. Il existe cependant un débat pour définir lequel de ces deux sites est le plus fréquent. Bien que certaines études donnent des résultats opposés, il semblerait que la dissémination vers ces sites dépend en réalité du contexte métastatique du patient (multi-sites ou mono-sites). Les patients avec un nombre limité de sites métastatiques seraient donc plus enclins à présenter des sites fémoraux alors que les patients avec de nombreux sites métastatiques aient une majorité de dissémination vertébrale^{61,71,72}. En dehors de ces deux sites principaux, on retrouve ensuite les côtes (qui dérivent souvent d'une dissémination depuis les sites vertébraux) et le crâne^{61,71}.

Concernant la métastase fémorale, il est intéressant de regarder plus précisément la répartition au sein de cet os. En effet la moelle osseuse d'un fémur n'est pas homogène puisqu'elle accueille différents types de moelle et donc un environnement différent, suivant la partie de l'os touchée. Ainsi, le col du fémur (partie contenant à la fois de la moelle jaune et de la moelle rouge) est la zone accueillant individuellement la plus grande part des métastases (plus d'un tiers)^{73,73}. Néanmoins, si l'on considère l'ensemble des parties contenant majoritairement de la moelle jaune, à savoir l'os trochantère, sub-trochantère et la diaphyse osseuse, elles regroupent toutes ensemble les deux tiers restants des métastases osseuses^{73,74}. Il existe un lien clair et important entre moelle osseuse et dissémination métastatique osseuse que nous décrirons plus loin dans cette introduction et tout au long de notre étude⁷⁵.

D'un point de vue clinique, les principaux symptômes d'une tumeur localisée sont liés à l'augmentation de la taille de la prostate et aux problèmes urinaires que cela entraîne. On retrouve un tableau clinique assez proche de l'HBP avec une impériosité mictionnelle, une pollakiurie et une diminution des volumes de miction¹⁸. Ces symptômes restant peu spécifiques, on comprend que le diagnostic du cancer de la prostate repose en grande partie sur la biologie, l'imagerie et l'anatomopathologie plus que sur la clinique. Il n'est pas rare que l'on diagnostique un cancer de la prostate par une métastase inaugurale^{38,76,77}. Il s'agit alors du premier élément par lequel on identifie le cancer. Ceci vient du fait que la dissémination métastatique s'accompagne souvent de symptômes cliniques beaucoup plus visibles, à évolution rapide et ressentis par le patient, contrairement aux tumeurs localisées. Dans le cas du cancer de la prostate, les deux métastases les plus fréquentes restent la métastase ganglionnaire et la métastase osseuse. D'un point de vue clinique les symptômes sont très spécifiques de l'organe touché⁷⁶⁻⁷⁹ :

- En cas de métastase ganglionnaire, on observe l'apparition de lymphœdème ainsi que des douleurs périganglionnaires venant de la compression des organes environnants.
- En cas de métastase osseuse, on observe des douleurs osseuses profondes, des troubles hématopoïétiques liés à l'envahissement de la cavité médullaire (anémie, agranulocytose ...), ainsi que des fractures à répétition sans raisons traumatiques apparentes.
- En cas de métastase touchant un autre organe on retrouve la plupart du temps des symptômes cliniques en accord avec les fonctions de l'organe touché (vertiges et céphalées pour les métastases cérébrales, hépatomégalie et ictère pour le foie ou encore dyspnée et hémoptysie pour les poumons).

Mais même dans le cas des métastases, la clinique à elle seule ne suffit pas pour valider la présence de métastases. Leur diagnostic vient souvent de la corrélation de tableaux cliniques spécifiques, de données biologiques ainsi que de données d'imagerie.

C. Le diagnostic des cancers de la prostate :

1. Généralités :

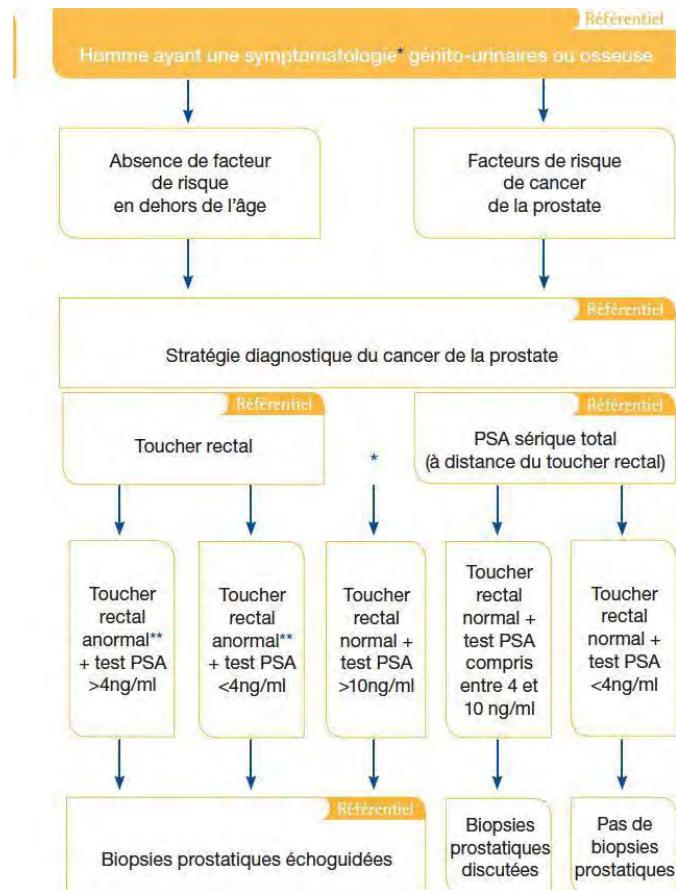


Figure 5 : Arbre décisionnel dans le diagnostic du cancer de la prostate. D'après Collège Français d'urologie, 2014

En cas de suspicion de cancer, un bilan initial est établi par le médecin qui procède à une consultation du patient (état de santé et antécédents médicaux). Cet entretien va être suivi d'un examen clinique consistant en un toucher rectal visant à détecter une éventuelle anomalie et d'un dosage du PSA. Enfin, si cela est nécessaire, une biopsie prostatique est réalisée. L'examen anatomopathologique va ainsi permettre de s'assurer de la présence réelle d'une formation tumorale ou non. Des examens d'imagerie peuvent y être associés pour évaluer le volume de la tumeur. En cas de présence réelle de cellules tumorales, on effectuera également un bilan d'extension afin de s'assurer que le cancer n'a pas disséminé^{76,77} (Figure 5).

2. Le dosage du PSA :

Comme il a été dit précédemment, la prostate est une glande qui synthétise de nombreuses protéines dont le PSA. Celui-ci est détectable dans le sang chez l'homme et reste à l'heure actuelle le marqueur biologique le plus utilisé dans le diagnostic du cancer de la prostate^{76,77,80}. Il agit comme un indicateur de l'état d'activité physiologique de la prostate et de son niveau d'inflammation. Très souvent, le cancer de la prostate est découvert suite à une augmentation du taux de PSA sérique ou par une anomalie de consistance de la prostate détectée au toucher rectal. La valeur seuil de normalité du PSA la plus souvent retenue est 4 ng/ml (dépendant du test utilisé)⁷⁷. Néanmoins une valeur élevée du PSA ne veut pas nécessairement dire qu'un homme est atteint d'un cancer de la prostate. Certains facteurs tels que la taille ou encore l'état d'inflammation latent de la prostate par exemple, peuvent faire varier la valeur de base de ce marqueur entre les individus^{81,82}. On pourrait ainsi prendre l'exemple des coureurs cyclistes qui semblent présenter des élévations temporaires de leurs taux de PSA à cause du « massage prostatique » exercé par la selle qui induirait une inflammation de la prostate et élèverait ponctuellement leur taux de PSA^{83,84}. Afin de limiter les faux positifs dans le diagnostic du cancer de la prostate, on réalise souvent le ratio du taux PSA libre divisé par le taux de PSA total (PSA libre et lié à des protéines). En cas de cancer, il y a une diminution du taux de PSA libre sécrété et une augmentation du taux global PSA. Une diminution de ce ratio est donc un argument en faveur d'une cause tumorale et permet un meilleur diagnostic dans les cancers avec un faible taux de PSA sérique (entre 4 et 10 ng/mL)^{85,85}. Dans le cas de la dissémination à distance, la plupart des métastases se caractérisent par une très forte augmentation du taux de PSA (>100 ng/mL pour les métastases multiples)⁸⁶⁻⁸⁸. Ce pic de PSA semble venir du fait que les cellules tumorales prostatiques se retrouvent dans un environnement inadéquat et sans structure glandulaire. De ce fait, le PSA produit par les cellules tumorales se retrouve libéré en totalité dans la circulation sanguine.

Actuellement, le dépistage systématique du cancer de la prostate (en particulier par dosage de PSA) est débattu et n'est pas appliqué dans la plupart des pays. Les études ne montrent pas d'intérêt particulier du dépistage systématique. Au contraire, le dépistage systématique semblerait même avoir un effet négatif avec un surdiagnostic et un surtraitement excessif de certaines tumeurs normalement sans danger pour le patient^{38,76,77,89,90}. Les recommandations les plus récentes conseillent néanmoins d'encourager les patients, en particulier ceux à risques, à se faire dépister. Le but ici n'est pas de mettre en place un dépistage systématique mais un dépistage basé sur le volontariat de chaque patient^{91,92}. En France, par exemple, le diagnostic

systématique entre 50 et 69 ans n'est pas recommandé et le choix d'un dépistage du cancer de la prostate devra se faire en accord avec les suspicions du médecins et l'avis éclairé du patient^{38,76,77,80}. Pour toutes ces raisons, le dosage sanguin de PSA n'est pas le seul examen utilisé pour diagnostiquer un cancer de la prostate. On préfère alors utiliser un ensemble de techniques de diagnostic pour confirmer la présence ou non d'un cancer. On pourra donc associer l'examen clinique et biologique classique à des techniques d'imageries et d'analyses anatomopathologiques de biopsies de la prostate.

3. L'examen anatomopathologique :

L'examen anatomopathologique dans le diagnostic initial consiste en une analyse des biopsies de la prostate et de la tumeur primaire afin d'évaluer l'étendue du cancer. Le nombre de biopsies effectuées va varier en fonction des examens précédents du patient. Ainsi une anomalie clinique ou d'imagerie pourra déboucher sur un nombre et un schéma de biopsie plus étendus pour améliorer la qualité du diagnostic⁷⁶. En temps normal, on effectue un total de 12 prélèvements. Leur répartition est dite « en sextant » et permet de toucher l'ensemble des lobes dans différentes zones représentatives : à la base, au milieu et à l'apex. On évalue alors sur chaque carotte prélevée le pourcentage de tissu tumoral présent ainsi que l'aspect de ce tissu. Cet examen permettra d'évaluer l'évolution de la tumeur primaire au sein de la prostate ainsi que les caractéristiques histologiques de ce cancer. On peut, si nécessaire, effectuer une deuxième biopsie en cas de doute. Dans certains cas, la biopsie peut aussi être guidée et ciblée par des zones précises suite à un examen d'imagerie préalable comme une IRM⁷⁶. Dans le cas précis du cancer de la prostate, l'évaluation de la biopsie permet en plus de donner un score histologique à la tumeur appelé score de Gleason⁹³. Nous décrirons ce score dans la partie dédiée aux techniques de classification clinique des tumeurs prostatiques.

4. Les examens d'imagerie :

L'imagerie joue un rôle majeur dans le diagnostic et le bilan d'extension du cancer. On retrouve une utilisation aussi bien des techniques d'imagerie fonctionnelle qu'anatomique. On différencie les techniques utilisées pour étudier les tumeurs localisées et les techniques pour les bilans d'extensions. L'IRM et la tomodensitométrie par scanner sont les deux imageries anatomiques les plus utilisées pour l'évaluation des tumeurs localisées. Elles vont permettre de repérer des anomalies tissulaires au sein de la prostate et donc les zones potentiellement cancéreuses.

L'échographie n'est pas recommandée dans l'étude du cancer de la prostate disséminé car elle est peu spécifique et peu sensible. Elle peut néanmoins avoir une certaine utilité dans la mesure des volumes des tumeurs localisées et pour guider les opérations de biopsie de la prostate^{94,95}. Du point de vue du diagnostic, elle ne présente que peu d'intérêt par rapport aux autres techniques d'imageries.

Actuellement, l'utilisation du scanner dans le diagnostic des tumeurs prostatiques localisées est supplantée par l'IRM qui présente des performances équivalentes, voire supérieures⁷⁶. Concernant les bilans d'extensions et de métastases, là encore, le scanner n'est pas indiqué si une IRM corps entier est possible. Cette dernière est particulièrement importante dans le bilan d'extension et permet de suivre de façon précise et efficace les métastases qu'elles soient ganglionnaires ou viscérales^{96,97}. Elle est à l'heure actuelle la meilleure technique pour réaliser un bilan d'extension. Il existe par ailleurs des techniques d'IRM fonctionnelle du cancer de la prostate encore expérimentales basées sur le suivi de l'évolution des ratios de citrate, de zinc, de créatinine et de choline^{98,99}.

L'imagerie fonctionnelle a principalement une utilité dans les bilans d'extension. On retrouve surtout la scintigraphie et le PET scan (une technique d'imagerie associant imagerie PET fonctionnelle et scanner anatomique pour optimiser l'évaluation et la localisation des métastases). En utilisant certains traceurs précis fortement intégrés par la tumeur, il est possible de suivre l'évolution de la tumeur et des métastases au niveau du corps du patient dans sa globalité. Dans le cas du PET-Scan, contrairement aux autres tumeurs solides, les traceurs à base de glucose radiomarké avec un Fluor 18 ne sont pas utilisés car assez peu intégrés par le cancer de la prostate⁷⁶. On préférera utiliser des traceurs captés en grande quantité par les cellules tumorales comme la choline radiomarkée (au Fluor18 ou au Carbone 11)⁷⁶. Il existe aussi d'autres marqueurs encore en cours d'évaluation comme le ¹¹C-Acetate, le ¹⁸F-Fluciclovine (un acide aminé radiomarké très fortement intégré par les tumeurs prostatiques)¹⁰⁰ ou encore le PSMA-Ga68 (un ligand du PSMA (prostate specific membrane antigen) qui semble particulièrement indiqué dans le diagnostic des métastases ganglionnaires)¹⁰¹.

La scintigraphie, quant à elle permet surtout de marquer les métastases osseuses de manière spécifique et intervient peu dans les autres métastases. Pour cela, on va suivre la fixation des phosphonates radiomarkés (au Technecium 99 métastable) au niveau des sites avec un fort remaniement osseux. Ainsi, plus le remaniement est actif et plus le marquage sera fort. Du fait de l'activité des métastases osseuses du cancer de la prostate sur le métabolisme de la matrice

osseuse minérale, on comprend bien que plus la métastase osseuse est importante, plus elle sera visible par cette technique^{76,102}.

D. La classification clinique des cancers de la prostate :

Tous ces examens cliniques, biologiques, d'imagerie et d'anatomopathologie vont pouvoir être analysés afin de réaliser des scores et des classifications, qui vont permettre de standardiser et d'améliorer la prise en charge des patients. Il existe à l'heure actuelle trois scores et classifications majeurs dans le cancer de la prostate.

1. La classification TNM :

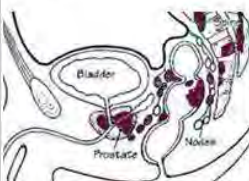
T1  T1 Clinically inapparent; tumor not palpable or visible by imaging T1a Incidental finding during transurethral resection of prostate; < 5% of tissue resected T1b Incidental finding during transurethral resection of prostate; > 5% of tissue resected T1c Tumor identified by needle biopsy (e.g. because of elevated PSA)	T2  T2 Tumor confined within prostate (palpable or visible on TRUS) T2a Involves half of a lobe or less T2b Involves more than half of a lobe one lobe but not both lobes T2c Tumor involves both lobes	T3  T3 Tumor extends through prostatic capsule, bladder neck or seminal vesicle T3a Unilateral extracapsular extension T3b Bilateral extracapsular extension T3c Tumor invades seminal vesicle(s)	T4  T4 The tumor has spread or attached to tissues next to the prostate (other than the seminal vesicles). T4a The tumor has spread to the neck of the bladder, the external sphincter (muscles that help control urination), or the rectum. T4b The tumor has spread to the floor and/or the wall of the pelvis.
N0-3 	M0-1 	N0 Cancer has not spread to any lymph nodes. N1 Cancer has spread to a single regional lymph node (inside the pelvis) and is not larger than 2 centimeters N2 Cancer has spread to one or more regional lymph nodes and is larger than 2 centimeters (¾ inch), but not larger than 5 centimeters N3 Cancer has spread to a lymph node and is larger than 5 centimeters M0 The cancer has not metastasized (spread) beyond the regional lymph nodes M1 The cancer has metastasized to distant lymph nodes (outside of the pelvis), bones, or other distant organs such as lungs, liver, or brain	

Figure 6 : La classification TNM du cancer de la prostate (pTNM). D'après Association des urologues du Québec, 2014

Afin d'évaluer la dissémination locale et à distance du cancer pour pouvoir la prendre en compte dans le pronostic du patient, on utilise la classification TNM. Cette classification, créée par l'OMS, est utilisée pour toutes les tumeurs solides. Elle consiste à évaluer la taille et l'invasivité de la tumeur primaire (score T noté de 1 à 4), la dissémination au niveau des ganglions lymphatiques (score N noté de 1 à 3) et la dissémination métastatique viscérale (score T noté 0 ou 1). On parle de TNM lorsque l'examen est réalisé grâce à des données d'imagerie médicale. Lorsque celui-ci est réalisé grâce aux analyses sur une pièce de prostatectomie, on parle de

pTNM. Il est alors beaucoup plus pertinent et riche en information. L'ensemble de cette classification est décrit dans la figure 6.^{103,104} Cette classification permet de prendre en compte aussi bien la tumeur locale qu'une dissémination locale ou métastatique.

2. Le score de Gleason :

Dans le cas du cancer de la prostate il existe un score histologique spécifique permettant de classer les cancers les uns par rapport aux autres. Au cours de cette évaluation, on étudie les tumeurs prostatiques de manière plus complexe en les répertoriant selon la classification de Gleason. Il s'agit d'une approche histologique permettant d'évaluer l'état de différenciation de la tumeur primaire de la prostate. Ce score créé en 1966 par Donald Floyd Gleason se base sur une évaluation de l'état de différenciation de la tumeur à partir d'une biopsie prostatique^{93,105,106}. L'état de différenciation est ainsi scorable de 1 (très différenciée) à 5 (très peu différenciée). Cet état reflète l'agressivité puisque plus une tumeur est peu différenciée, plus elle est agressive. Le score de Gleason consiste en l'addition du score des deux contingents majoritaires au sein de la tumeur. On obtient ainsi un score de Gleason compris entre 2 et 10. Avec un score de 2 à 4, la tumeur est bien différenciée et plutôt peu agressive. La différenciation devient moyenne sur un score entre 5 et 6^{93,107}. Le score de 7 est considéré comme charnière et doit-être interprété avec précaution. Une tumeur ou le contingent majoritaire est de score 3 (noté 3+4) sera en réalité plus proche d'un score de 6 et la tumeur sera moins agressive et de meilleur pronostic qu'une tumeur avec un contingent majoritaire de 4 (noté 4+3), qui sera plus proche d'un score réel de 8¹⁰⁸. Les scores de 8 à 10 représentent les tumeurs indifférenciées, les plus agressives et de plus mauvais pronostic⁹³ (Figure 7).

Ce score est particulièrement important à prendre en compte dans la prise en charge du patient puisqu'il est directement relié au pronostic et à son espérance de vie. Il est encore utilisé en clinique actuellement mais des mises à jours apparaissent régulièrement, modifiant le score de tumeurs contenant certaines structures très particulières du cancer de la prostate¹⁰⁸. Bien que ce score soit particulièrement important, il ne s'intéresse qu'à l'état de la tumeur primaire et n'est pas utilisable sur les biopsies de site métastatique. Ces dernières sont étudiées à part lors du bilan d'extension.

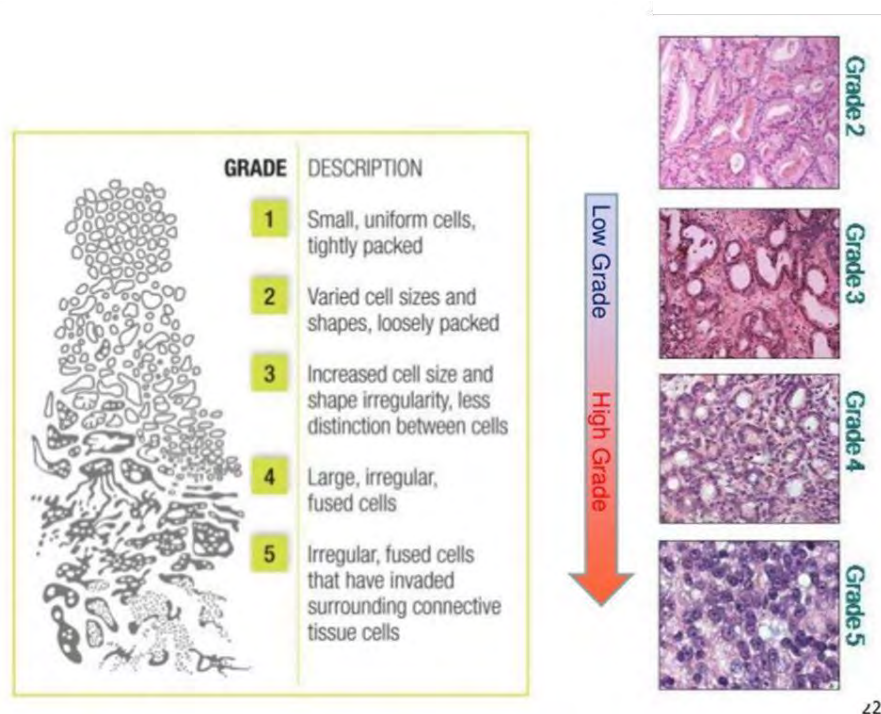


Figure 7 : Le score de Gleason. D'après James Cook's university department of pathology, 2014

3. La classification d'Amico :

Afin d'intégrer l'ensemble des données cliniques et des classifications dans la prise de décision thérapeutique, la classification d'Amico a été créée. Cette super-classification permet d'évaluer le pronostic et le risque évolutif d'un cancer en prenant en compte le dosage du PSA sérique, le score de Gleason et le grade TNM d'un patient.^{109,110}

On trouve ainsi trois sous-groupes de pronostics différents regroupés dans la figure 8.

Groupe	Définition	Pronostic: rechute biologique à 5 ans	Modification
Faible risque	PSA $\leq$ 10ng/ml ET score Gleason $\leq$ 6 ET Stade clinique T1c ou T2a	< 25%	
Risque intermédiaire	PSA [11 et 20ng/ml], OU score gleason = 7 OU Stade clinique T2b	25-50%	% biopsies positives : < 33 % % biopsies positives: (33 et 55 %) % biopsies positives: > 55 % Gleason 3 + 4 Gleason 4 + 3
Risque élevé	PSA > 20ng/ml OU score de Gleason > 7 OU Stade clinique T2c	> 50%	

* Le groupe intermédiaire est très hétérogène regroupant des tumeurs de risque relativement faible (ex T1C et PSA < 10 et Gleason 3 + 4) et des tumeurs véritablement à haut risque (T2b et PSA > 10 et gleason 4+3). Afin d'affiner cette classification deux nouveaux paramètres ont été rajoutés: % de biopsies positives et combinaison des sous scores de Gleason biopsique (3 + 4 vs 4 + 3).

Figure 8 : La classification d'Amico. D'après Collège Français d'urologie 2014

Le sous-groupe d'appartenance du patient permettra de choisir la meilleure prise en charge parmi les traitements existants pour les tumeurs localisées. Les patients avec une tumeur

invasive et métastatique ne sont pas intégrés ici car le traitement sera variable en fonction des sites touchés par l'invasion tumorale et font donc l'objet d'une prise en charge à part.

E. Le traitement des cancers de la prostate localisés :

Le cancer de la prostate présente un grand nombre d'options thérapeutiques dont le choix dépendra de la classification et de l'extension de la tumeur (Figure 9).

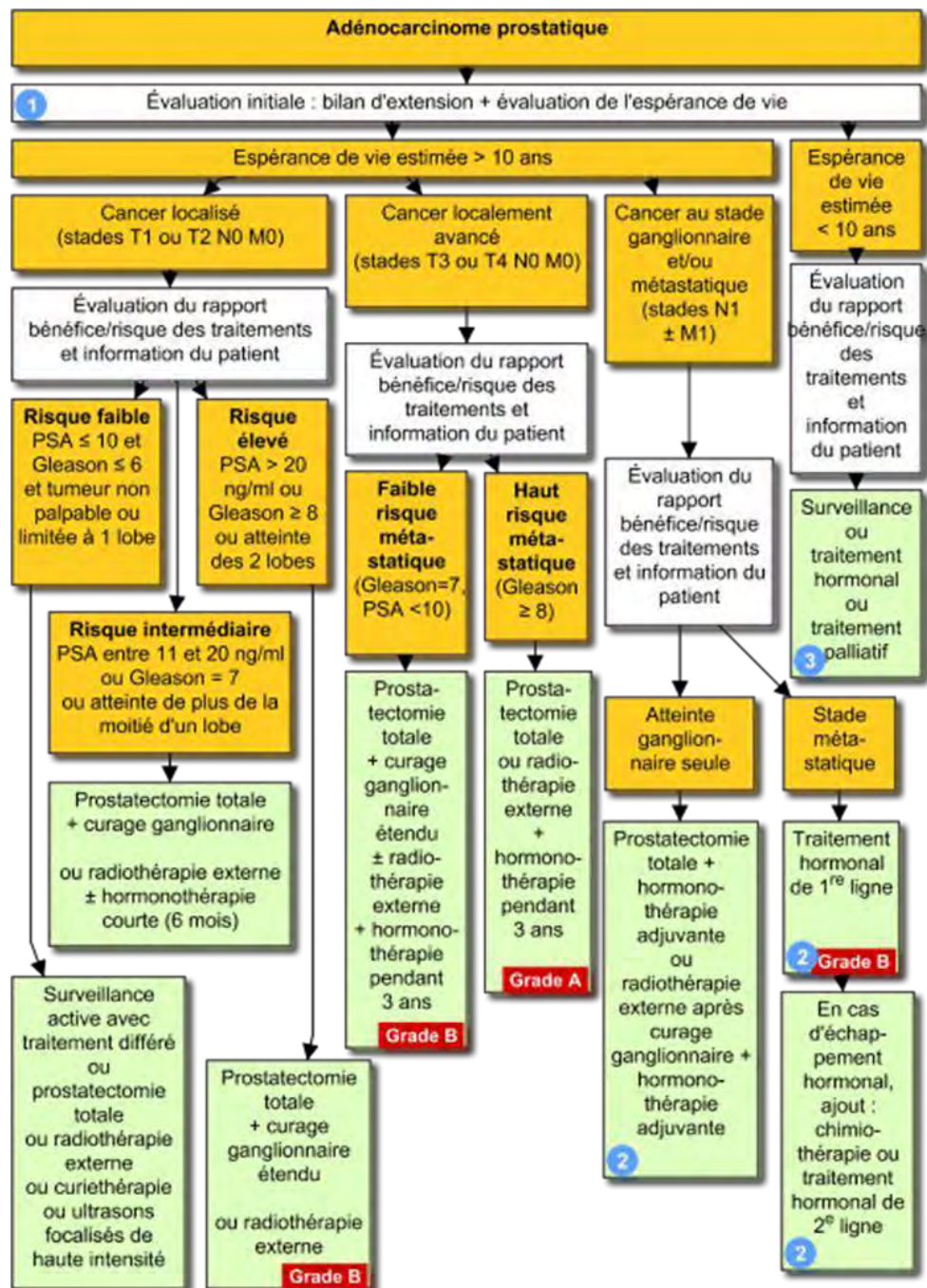


Figure 9 : Arbre décisionnel dans le traitement des cancers de la prostate locaux et métastatiques. D'après Vidal recos, édition 2016

1. La surveillance active :

La surveillance active est actuellement utilisée comme un traitement à part entière dans la prise en charge du cancer de la prostate. Elle représente une alternative à la thérapie radicale mais ne concerne que les patients à faible risque de développer un cancer de la prostate agressif (risque faible selon la classification d'Amico avec une biopsie faiblement positive). Cependant, il ne s'agit pas d'une attente passive et sans action. Le patient est suivi de façon très régulière afin de guetter l'apparition des premiers symptômes avec un toucher rectal tous les 3 mois la première année (puis tous les 6 mois), un dosage de PSA tous les mois la première année (puis tous les 3 mois la seconde année, puis tous les 6 mois) ainsi qu'une biopsie l'année qui suit la prise en charge (elle sera refaite tous les deux ans). Le but de cette approche est d'éviter le traitement des patients à faible risque et asymptomatiques sans impacter leur espérance de vie. Cela permet aussi d'éviter un traitement inutile et donc de limiter les co-morbidités et effets indésirables d'un traitement anti-cancer qui seraient inutilement négatifs pour le patient.¹¹¹⁻¹¹³

2. La prostatectomie radicale :

La prostatectomie totale reste un des traitements de référence des tumeurs localisées. Cette opération consiste en l'ablation chirurgicale de la prostate soit par laparotomie, soit par coelioscopie. Cette opération ne peut être menée que lorsque la tumeur est localisée et qu'elle ne présente pas de risque d'extension locale (risque faible ou intermédiaire selon la classification d'Amico)^{33,76,114}. Elle est souvent associée à un curage ganglionnaire consistant en une ablation des ganglions régionaux autour de la prostate afin de prévenir et évaluer une éventuelle dissémination ganglionnaire¹¹⁵⁻¹¹⁷. Un autre intérêt de la prostatectomie est de pouvoir réaliser un ensemble d'examens histologiques et d'invasivité sur la pièce opératoire (score de Gleason et pTNM) ainsi que sur les ganglions prélevés. Cette thérapie permet donc d'associer au traitement une confirmation importante du diagnostic. Elle présente cependant de nombreux effets indésirables liés à une atteinte des nerfs et des ligaments autour de la prostate. Le patient présente donc un risque important d'impuissance, de dysfonctionnement urinaire et tout particulièrement d'incontinence plus ou moins réversible. Malgré tout, l'évolution des techniques opératoires assure une meilleure conservation de ces nerfs et ligaments et donc une limitation de ces effets¹¹⁸. On peut associer à ce traitement une thérapie adjuvante ou de rattrapage par radiothérapie^{76,119}. Bien que cette association permette de limiter les risques de récurrences, des études récentes montrent que le rapport bénéfice risque est défavorable à cause des risques de développer des cancers radio-induits du colon ou de la vessie^{76,120,121}.

L'hormonothérapie n'a pas montré d'amélioration de l'état ou du pronostic des patients lorsqu'elle est utilisée en adjuvant de la chirurgie⁷⁶.

3. La radiothérapie externe :

La radiothérapie externe à visée curative a beaucoup évolué au cours des dernières années. Les nouvelles techniques et nouveaux irradiateurs permettent de délivrer de plus grandes doses au niveau de la prostate tout en limitant l'irradiation des organes voisins et en particulier des tissus de l'appareil digestif. Ceci permet de limiter les effets secondaires de ce traitement tels que les nausées, les vomissements ou les mucites. Tout comme lorsqu'elle est utilisée en traitement adjuvant, la radiothérapie en thérapie principale présente aussi le risque d'induire des cancers secondaires et nécessite donc un suivi post-traitement. Ce risque est d'autant plus discuté dans le cancer de la prostate que les patients ont un bon pronostic et vivent longtemps après leur guérison. Ils présentent donc le risque de développer une tumeur secondaire sur le long terme^{120,121}. Tout comme la prostatectomie, elle est indiquée dans les cancers de risque faible ou intermédiaires selon la classification d'Amico^{76,122}. Suite à une rechute après une radiothérapie, on peut tenter une prostatectomie de rattrapage.^{123,124} Il est fréquent et conseillé d'utiliser une hormonothérapie à court terme comme traitement adjuvant de la radiothérapie. Cette combinaison permet d'améliorer significativement les chances de guérison des patients^{125,126}.

4. La curiethérapie :

La curiethérapie est une forme de radiothérapie dans laquelle on injecte des grains d'iodes radioactifs directement dans la prostate. Cette radiothérapie présente beaucoup moins d'effets secondaires que la prostatectomie ou la radiothérapie externe mais elle ne peut être utilisée que pour des tumeurs peu agressives et à faible risque selon la classification d'Amico. Cette thérapie n'est en général pas associée à des traitements adjuvants, l'hormonothérapie n'ayant pas montré d'avantage dans cette association.^{76,127}

5. La cryothérapie :

La cryothérapie est une technique innovante de traitement des tumeurs localisées. Elle fait encore actuellement l'objet de plusieurs évaluations pour estimer sa place par rapport aux autres traitements classiques. Elle ne concerne que les tumeurs de faible agressivité et risque. Elle est pour le moment majoritairement utilisée comme traitement de rattrapage de radiothérapie externe ou de curiethérapie. Concrètement, la technique consiste en l'insertion d'aiguilles de

cryothérapie dans la prostate qui vont refroidir les tissus tumoraux à -40°C . Cette congélation des tissus va permettre de faire éclater les cellules par formation de cristaux d'eau.^{76,128}

6. La thérapie par ultrasons focalisés :

La thérapie par ultrasons à haute fréquence est le plus récent des traitements des tumeurs localisées. Il fait actuellement l'objet d'une autorisation temporaire d'utilisation pour des tumeurs de faible risque. Cette technique nécessite encore d'être évaluée et son efficacité reste controversée. Ce traitement consiste en une opération non-chirurgicale par laquelle des ultrasons à haute fréquence vont être dirigés sur la prostate. Il est nécessaire d'avoir un suivi soit par échographie soit par IRM tout au long de l'opération. Les cellules tumorales vont être détruites sous l'effet des ultrasons à cause de la génération de chaleur mais aussi de la cavitation qu'ils induisent.^{76,129,130}

F. Le traitement des cancers de la prostate disséminés et métastatiques :

Lorsque le cancer de la prostate dissémine à distance, il devient alors nécessaire d'utiliser des chimiothérapies au sens large du terme : chimiothérapie anti-tumorale conventionnelle, hormonothérapie ou thérapie ciblée. Seuls ces traitements administrés par voie systémique peuvent permettre une atteinte des différents sites métastatiques.

1. La chimiothérapie anti-tumorale :

La chimiothérapie est le traitement de référence dans le cancer de la prostate métastatique hormono- et chimio-naïf^{76,131}. Ce traitement est la plupart du temps associé à l'hormonothérapie lorsque le cancer n'est pas résistant à la castration^{131,132}. A l'heure actuelle l'utilisation de cette chimiothérapie est couramment acceptée dans les protocoles de traitements mais la question reste néanmoins posée sur le moment du début du traitement. Il n'existe actuellement pas de consensus pour savoir si le traitement doit être commencé dès la découverte des métastases même si le patient reste asymptomatique⁷⁶. Les chimiothérapies les plus couramment utilisées sont des dérivés des taxanes (principalement le docetaxel¹³³ et en seconde ligne le cabazitaxel¹³⁴) et la mitoxantrone^{133,134} qui ont fait leurs preuves lors de plusieurs essais cliniques. Les chimiothérapies conventionnelles ayant une action systémique elles présentent de nombreux effets indésirables qui nécessitent aussi l'administration de médicaments et des soins associés afin de les limiter.

2. L'hormonothérapie :

L'hormonothérapie est un autre traitement essentiel du cancer de la prostate. En effet, le cancer de la prostate fait partie des cancers dont la croissance est hormonodépendante (dépendante de la testostérone)^{76,135,136}. On peut donc traiter ce cancer en diminuant la production de testostérone d'un patient. Lorsque ce traitement n'est pas utilisé comme adjuvant de la radiothérapie, il est surtout utilisé de façon systémique pour traiter la maladie métastatique en association avec la chimiothérapie classique⁷⁶. Il existe deux classes majeures de médicaments : les antagonistes et agonistes de LH-RH et les anti-androgènes¹³⁶. Les antagonistes et agonistes de LH-RH vont agir en amont en mimant ou en bloquant l'action de la LH-RH, une hormone hypothalamique. Ils vont ainsi diminuer la production de testostérone et sont capables d'induire une castration chimique rapide par diminution du taux de testostérone. Les anti-androgènes vont bloquer l'action des androgènes en diminuant leur métabolisme (comme le finastéride un inhibiteur de la 5 α -réductase) ou en bloquant les récepteurs à la testostérone, que ces inhibiteurs soient stéroïdiens (comme la spironolactone) ou non stéroïdiens (comme l'enzalutamide). Beaucoup plus récemment, on a aussi vu apparaître l'abiratéron, un nouvel inhibiteur du métabolisme des androgènes mais agissant sur le CYP17 et non pas sur la 5 α -réductase comme les autres molécules^{137,138}. Ce médicament présente des résultats très prometteurs et encourageants en association avec une chimiothérapie anti-tumorale conventionnelle. Sa grande efficacité a en particulier été montrée récemment par les résultats des essais STAMPED et LATITUDE montrés cette année à l'ASCO 2017^{137,138}. Les effets indésirables de l'hormonothérapie restent limités par rapport à une chimiothérapie classique. Les effets sont directement liés à la perte hormonale et s'apparentent aux symptômes d'une andropause. On peut observer des bouffées de chaleurs, des troubles de l'érection, une baisse de la libido, une prise de poids, de l'ostéoporose et une gynécomastie¹³⁹. Par ailleurs, tous ces effets indésirables peuvent faire l'objet de traitements symptomatiques efficaces. Dans de très rares cas, l'hormonothérapie peut être une castration chirurgicale au lieu d'une castration chimique.

3. Les traitements de la métastase osseuse :

Parmi le traitement des maladies métastatiques, le traitement de la métastase osseuse du cancer de la prostate fait l'objet d'une approche thérapeutique qui lui est propre. En effet, cette métastase est particulièrement douloureuse et handicapante pour le patient. Ces symptômes font donc l'objet d'un traitement à part entière.

Les bisphosphonates représentent la première ligne de traitement contre les symptômes de la métastase osseuse. Ils agissent en inhibant l'activité des ostéoclastes, diminuant ainsi la résorption osseuse nécessaire au remaniement dû à la métastase. La molécule principalement utilisée est l'acide zolendronique. Il s'agit d'un traitement avec une très bonne tolérance mais une légère toxicité rénale chez les patients prédisposés. Il présente aussi très peu d'effets indésirables en dehors d'un risque peu fréquent d'ostéonécrose de la mâchoire mais qui peut être facilement prévenu par un suivi clinique et une évaluation préalable des facteurs de risque.^{76,140}

Le denosumab est un anticorps bloquant dirigé contre RANK-L, un puissant ligand activateur des ostéoclastes. Il présente donc la même activité que les bisphosphonates mais avec une efficacité plus grande. On peut aussi noter un abord plus facile (injection sous-cutanée au lieu d'intraveineuse), une absence de toxicité rénale et un risque équivalent d'ostéonécrose. Il peut par contre induire une hypocalcémie à cause de son inhibition forte des ostéoclastes et nécessite donc un suivi. Il est aussi plus récent que les bisphosphonates et il n'y a donc pas autant de recul sur l'utilisation pratique de ce médicament en clinique.^{76,140}

Le chlorure de radium-223 est un composé radioactif donc la structure atomique est très proche de celle du calcium. Il est donc intégré dans la matrice osseuse à la place du calcium et est capable d'émettre des particules alpha (hautement énergétiques mais de faible pénétration) pendant une courte période. Ces particules vont ainsi endommager l'ADN des cellules tumorales métastatiques sans pour autant avoir un effet délétère sur la moelle osseuse. Ce composé est bien toléré avec peu d'effets indésirables en dehors de diarrhées et d'une faible toxicité médullaire (en particulier thrombopénie). Il n'est utilisé que depuis peu de temps en France où il n'a obtenu son AMM qu'en novembre 2013. Il existe encore à l'heure actuelle une discussion concernant la place et le moment d'utilisation de ce traitement par rapport à la chimiothérapie et/ou l'hormonothérapie.^{76,141,142}

Au cours des dernières années, de plus en plus de traitements tentent d'agir sur le système immunitaire afin de favoriser l'immunité anti-tumorale. Plusieurs médicaments ont été créés ou utilisés dans ce sens dans le traitement du cancer de la prostate.

4. Les immunothérapies anti-tumorales :

L'ipilimumab est un anticorps inhibiteur de CTLA-4 et une des immunothérapies anti-tumorales les plus connues. CTLA-4 est une molécule d'adhérence qui induit un co-signal

inhibiteur de l'activité des lymphocytes T lors de l'activation du TCR. L'inhibition de CTLA-4 permet donc d'empêcher l'inhibition de la réponse lymphocytaire T et l'échappement immunitaire^{143,144}. Ce médicament est indiqué à l'heure actuelle en première ligne de traitement dans le mélanome avancé avec une efficacité modérée. Concernant le cancer de la prostate, il ne semble cependant pas présenter d'effet thérapeutique notable et n'a donc pas été utilisé^{76,145}.

Les inhibiteurs de PD-1 suivent un mécanisme semblable aux inhibiteurs de CTLA-4. La molécule PD-1 induit en temps normal l'apoptose dans les lymphocytes T. En inhibant cette molécule, on peut donc restaurer là-aussi l'activité des lymphocytes T¹⁴⁶. Jusqu'à présent, la plupart des études n'ont cependant trouvé aucun effet bénéfique significatif sur le cancer de la prostate. Très récemment, une étude clinique est allée contre cette idée, montrant un effet probant de ces traitements en association. Il s'agit cependant d'un unique essai de phase II portant sur 10 patients et les résultats doivent être encore confirmés. Néanmoins, à la vue de ces résultats, il apparaît clairement que ce médicament reste encore à étudier^{76,147}. Certains inhibiteurs de PD-1 utilisés dans le cadre du cancer du poumon, comme le durvalumab, commencent aussi à obtenir des extensions d'AMM afin de pouvoir être utilisés dans le traitement des cancers de la prostate métastatiques.

Le cancer de la prostate est aussi un des cancers solides à avoir obtenu l'AMM pour un vaccin anti-cancer. Le Sipuleucel-T est utilisé pour traiter des cellules présentatrices d'antigènes isolées du patient. Ces cellules chargées par le vaccin lui sont ensuite réinjectées pour induire une activation des lymphocytes T et une réponse antitumorale. Pour le moment ce médicament s'est révélé efficace mais uniquement sur des formes de plutôt bon pronostic (Gleason <7). Il est donc encore nécessaire d'étudier l'efficacité et d'affiner ses conditions d'utilisation afin de mieux évaluer l'indication et la spécificité de ce traitement.^{76,148}

G. Les facteurs favorisant les cancers de la prostate :

1. Les facteurs de risque connus :

Plusieurs facteurs de risque semblent jouer un rôle dans la carcinogenèse prostatique et peuvent être séparés en deux groupes :

– **Les facteurs de risque extrinsèques :** il s'agit des facteurs de risque indépendants du patient et liés à son environnement (exposition, profession, habitudes de vie). Parmi ces facteurs on trouve :

- **Les facteurs alimentaires :** Le rôle exact de l'alimentation dans le cancer de la prostate

n'est pas clairement établi. Cependant, un certain nombre d'études soulignent qu'une alimentation riche en graisses semblent favoriser la survenue du cancer de la prostate¹⁴⁹. D'autres études ont suggéré qu'une consommation excessive de calcium peut favoriser l'apparition de ce cancer¹⁵⁰ mais d'autres travaux s'opposent à ce résultat¹⁵¹.

- **L'exposition à certains éléments chimiques :** plusieurs études ont ainsi montré que certaines professions, comme l'agriculture, développent plus de cancers de la prostate que les autres. Ce phénomène est dû à l'exposition à des éléments chimiques tels que les pesticides hydrocarbonés aromatiques polycycliques et les biphenyls polychlorés. On trouve parmi eux, par exemple, le chlordécone, un pesticide hautement rémanent utilisé en particulier dans la culture de la banane. On peut aussi citer le carbofuran, les coumaphos, les fonofos, et la perméthrine¹⁵²⁻¹⁵⁶. En dehors des pesticides, on peut noter aussi une prédisposition suite à l'exposition à d'autres facteurs chimiques tels que les perturbateurs endocriniens comme le Bisphénol A ou encore à des métaux lourds comme le mercure, le nickel et le cadmium (exposition liée au travail dans certaines industries)^{155,157,158}.

- Les facteurs de risques intrinsèques : il s'agit des facteurs de risques inhérents aux patients et liés à son hérédité et son historique médical. Parmi ces facteurs on trouve :

- **L'âge :** Le cancer de la prostate est, comme la majorité des cancers, lié au vieillissement puisque 95 % des patients diagnostiqués sont âgés de 57 à 88 ans et l'âge moyen de survenue du cancer prostatique est de 71 ans. ¹⁵⁹ Par ailleurs, bien que ces résultats soient encore débattus, de nombreuses études montrent la présence de tumeurs plus agressives et de moins bons pronostics dans le cas du cancer de la prostate chez des patients de 75 ans et plus^{15,160,161}.
- **L'obésité :** l'obésité apparaît comme un facteur important dans le développement du cancer de la prostate. Cet état ne semble pas influencer l'incidence mais l'agressivité, puisque les patients obèses présentent des cancers de significativement plus haut risque et de moins bon pronostic^{14,162,163}.
- **Les facteurs ethniques :** il apparaît clairement que les origines ethniques jouent un rôle dans le cancer de la prostate. En effet, des études ont montré que les populations

asiatiques développent moins de cancer de la prostate que les individus caucasiens alors que les populations africaines et afro-américaines en développent bien plus (odds ratio de 1,6 comparé aux populations caucasiennes)¹⁶⁴. Les raisons de ces différences inter-ethniques restent peu connues à ce jour, mais il semblerait qu'il existe un lien avec les variations génétiques de certaines hormones ainsi qu'une sensibilité variable à des agents carcinogènes.

- **Les facteurs familiaux et la prédisposition génétique** : Les formes héréditaires ne sont pas négligeables puisqu'elles représenteraient 5 à 25 % des cas de cancers de la prostate. Le risque relatif des formes familiales est variable et dépend du nombre de parents au premier degrés atteints ou ayant été atteint d'un cancer de la prostate. Les patients à risque peuvent ainsi avoir de 2 à 5 fois plus de risques de développer un cancer de la prostate qu'un patient classique.¹⁶⁴
- **Les translocations géniques** : l'identification d'une translocation génique dans les cancers de la prostate n'est connue que depuis 2005. La translocation la plus fréquemment observée est la fusion du gène TMPRSS2 (une sérine protéase impliquée dans la vascularisation et l'homéostasie du sodium dans l'épithélium prostatique¹⁶⁵) avec le gène de la famille des facteurs de transcription ERG (pour ETS-Related Gene)¹⁶⁶. Cette translocation pourrait être un événement majeur dans le développement des cancers de la prostate puisque certaines études montrent une corrélation entre cette translocation et les cancers de haut grade et l'agressivité de la tumeur. Ces résultats nécessitent d'être confirmés car d'autres études indiqueraient, elles, une corrélation inverse. Néanmoins, toutes s'accordent à donner une place majeure à cette translocation dans le cancer de la prostate.

On peut noter que l'ensemble de ces facteurs extrinsèques et intrinsèques peuvent s'additionner chez un même patient et augmenter les risques de façon cumulative. Par exemple, la population des Antilles Françaises présente un des taux de cancer de la prostate les plus élevés au monde du fait de leur longue exposition au chlordécone (lié à leur activité agricole) et de leur origine ethnique africaine¹⁵⁴.

2. Deux facteurs d'importance majeure : l'obésité et le vieillissement

L'obésité est définie comme une accumulation pathologique de tissu adipeux au niveau du corps entier d'un individu¹⁶⁷. Le lien entre obésité et cancer de la prostate n'est désormais plus

à prouver. D'un point de vue de clinique, l'obésité associe de nombreuses comorbidités et difficultés de prise en charge clinique qui retardent le diagnostic et empêchent un accès optimal au soins^{14,168,169}. D'un point de vue épidémiologique, les patients obèses ne développent pas plus de cancers que les patients classiques mais les cancers qu'ils présentent sont plus enclins à la dissémination aussi bien locale que métastatique^{14,162,163}. Ces observations sont d'autant plus inquiétantes que l'obésité est une pathologie épidémique qui ne cesse de se développer dans les pays modernes^{167,170}. Il est donc important de comprendre et d'appréhender le lien entre cancer de la prostate et obésité afin d'améliorer la prise en charge spécifique de ces patients dans un avenir proche.

On définit le vieillissement comme l'ensemble des effets de l'âge du patient sur son organisme¹⁷¹. Tout comme l'obésité, le vieillissement est associé à une prise en charge clinique complexe et à de nombreuses comorbidités^{171,172}. Par ailleurs, l'âge du patient est un élément essentiel dans le développement du cancer de la prostate. Il est ainsi fortement lié à l'incidence puisque le cancer de la prostate est une maladie se développant majoritairement au-delà de 60 ans. Mais on peut aussi noter que plus le patient vieillit, moins son cancer est de bon pronostic avec un risque beaucoup plus élevé de métastase au-delà de 70 ans^{15,18,37,160}. Tout comme l'obésité, le vieillissement est un enjeu majeur de santé publique puisqu'on assiste à un vieillissement global de la population mondiale avec une inversion de la pyramide des âges et une augmentation de l'espérance de vie¹⁷¹. Il paraît donc essentiel de décrypter les mécanismes liant cancer de la prostate et vieillissement puisqu'à l'avenir nous serons confrontés à de nouveaux patients de plus en plus âgés présentant des cancers de la prostate plus dangereux.

Les projections futures nous montrent donc l'importance de l'obésité et du vieillissement dans le développement et surtout dans l'agressivité du cancer de la prostate et les enjeux majeurs qu'ils représentent. Au cours de notre travail, nous nous intéresserons donc au lien entre ces différents facteurs. Par ailleurs, l'obésité et le vieillissement touchent tous deux fortement la physiologie du tissu adipeux¹⁷²⁻¹⁷⁵. Certains cancers, dont le cancer de la prostate, interagissent fortement avec ce tissu adipeux^{3,4,163}. Il nous paraît important de nous y intéresser et de décrire les modifications induites par ces deux facteurs sur le tissu adipeux, mais aussi l'effet de ces modifications sur l'interaction entre le tissu adipeux et la tumeur. Afin d'approcher cette question, nous décrirons les différents tissus adipeux dans le prochain chapitre. Cette partie nous permettra de comprendre la complexité et les nombreuses fonctions de ces tissus.

PARTIE II : LES TISSUS ADIPEUX : TYPES, FONCTIONS ET MODIFICATIONS

Le terme de tissu adipeux (TA) regroupe de fait différents tissus blancs, bruns, beiges et roses que nous allons décrire successivement (Figure 10). Ces tissus se distinguent à la fois par leur localisation et par leur fonction.

I. Les différents types de tissus adipeux :

A. Le tissu adipeux blanc :

1. Sa localisation :

Le TA blanc représente à lui seul plus de 85% de la masse adipeuse chez l'homme. On le retrouve dans l'ensemble de l'organisme mais il peut être séparé en deux sous-familles, le TA viscéral et le TA sous-cutané^{176,177}. Comme leur nom l'indique, le TA viscéral se retrouve autour de différents organes alors que le sous-cutané se retrouve dans l'hypoderme, le compartiment le plus profond de la peau (Figure 10). Ces deux sous-types différents majoritairement au niveau de fonctions sur lesquelles nous reviendrons plus loin.

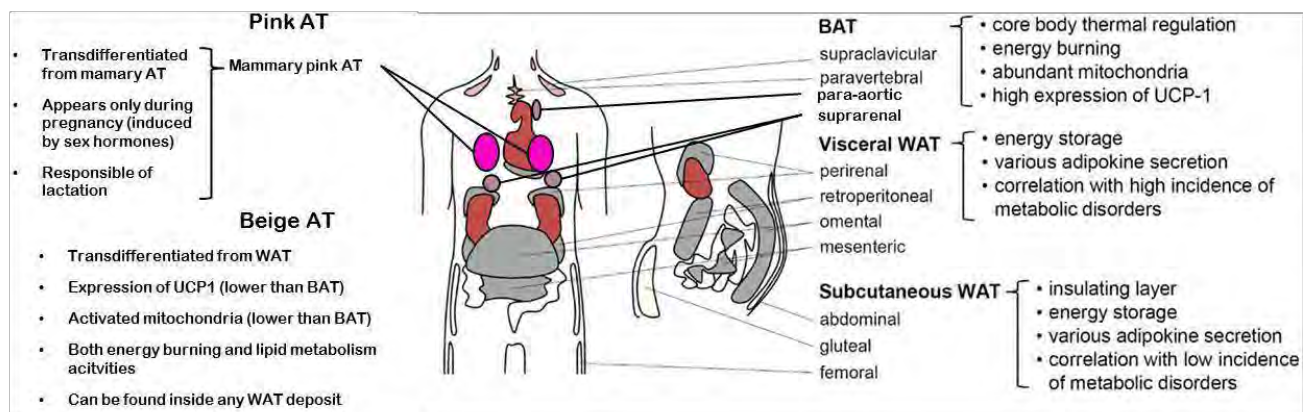


Figure 10 : Localisation et caractéristiques générales des différents tissus adipeux. D'après Sun *et al*, 2016, *frontiers in endocrinology*.

2. Ses origines :

Les adipocytes blancs matures proviennent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM)¹⁷⁸. Ces cellules souches peuvent être de deux origines : soit d'origine médullaire (dans ce cas elles sont recrutées depuis la moelle osseuse), soit d'origine tissulaire (dans ce cas, elles proviennent du tissu adipeux, une source riche en CSM)¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Néanmoins, les CSM sont aussi capables de se différencier en chondrocytes, en ostéoblastes ou en myocytes¹⁸². La première étape de la différenciation consiste donc en une étape dite de détermination^{183,184}. Suite à cette étape, les CSM se transforment en adipoblastes, des cellules déjà engagées dans la voie adipocytaire. Sous l'action des BMP2 et 3 les adipoblastes vont passer au stade de préadipocytes¹⁸⁵. Par la suite, grâce à l'activation de PPAR γ et C/EBPs¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ ces préadipocytes blancs vont changer de morphologie et se différencier en se chargeant progressivement en lipides, jusqu'à l'apparition d'une gouttelette lipidique monoculaire et ainsi devenir des adipocytes blancs matures (Figure 11).

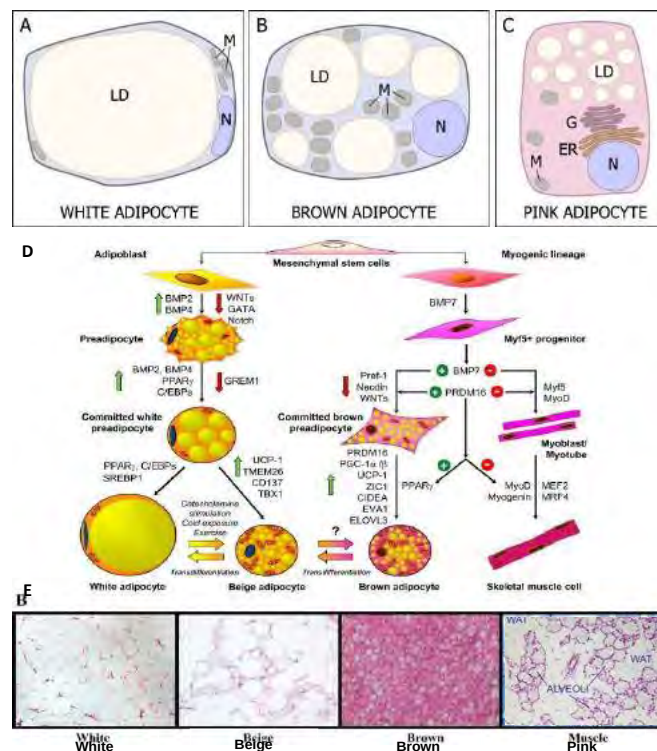


Figure 11 : Les différents tissus adipeux : blancs, bruns, beiges et roses. A, B et C) schéma des adipocytes blancs, bruns et roses ; D) différenciation et transdifférenciation des adipocytes blancs, bruns et beiges ; E) coupe histologique des tissus adipeux blancs, beige et brun. D'après de Lee *et al*, 2004, American Journal of Physiology et de Valecak *et al*, 2017, Redox Biology

3. Fonctions et sécrétions :

Concernant leurs fonctions, les adipocytes blancs sont des cellules particulièrement actives métaboliquement. Ils agissent comme un important réservoir de lipides, stockés au sein de leur gouttelette sous forme de triglycérides. Ces triglycérides peuvent provenir soit de la circulation sanguine, soit de l'estérification entre du glycérol et des acides gras obtenus par lipogénèse *de novo*¹⁸⁹. Inversement, les adipocytes sont capables de libérer ces lipides au besoin par lipolyse. Les triglycérides sont alors hydrolysés par étapes successives afin de libérer des acides gras et

du glycérol¹⁹⁰. Les acides gras libres peuvent ensuite être relargués dans la circulation sanguine afin d'être redirigés vers les tissus à forts besoins énergétiques tels que les muscles où ils pourront être métabolisés à travers la β -oxydation par exemple.

En plus de leur fonction de tissu de stockage et de leur activité métabolique, il est désormais clairement établi que le TA blanc est un des tissus endocriniens les plus importants du corps humain. L'ensemble des molécules sécrétées par les adipocytes sont regroupées sous le terme d'adipokines. On retrouve différents types d'adipokines : les adipokines régulant le métabolisme glucidique et lipidique ainsi que les fonctions associées (comme la sensation de satiété), avec par exemple l'adiponectine, la leptine, l'apeline ou la resistine¹⁹¹⁻¹⁹³, les adipokines agissant sur l'inflammation et le système immunitaire comme les protéines du complément, les cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF α et l'IL6, ou encore les chimiokines (qui feront l'objet d'une description précise dans une prochaine partie)¹⁹⁴. Il ne s'agit ici que de quelques exemples et de nombreuses autres molécules peuvent être sécrétées par les adipocytes blancs. On y trouve ainsi de nombreux médiateurs lipidiques comme les prostaglandines ou certains stéroïdes.

B. Le tissu adipeux brun :

1. Sa localisation :

Le deuxième type principal de tissu adipeux est le TA brun. Sa description chez l'homme date de 1969, en particulier avec les travaux de Horowitz qui ont permis de décrire ses fonctions et de cartographier les différents dépôts¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Contrairement au TA blanc, sa localisation et sa répartition sont majoritairement influencées par l'espèce, l'âge et le développement de l'individu. Ainsi, chez les rongeurs et les animaux hibernants, on retrouve de très grandes quantités de ce tissu adipeux, alors que chez l'homme et les mammifères il est très présent chez le nouveau-né mais va petit à petit disparaître au fur et à mesure de son développement.^{198,199} A l'âge adulte, il ne reste que quelques dépôts très précis et limités (Figure 10). Le dépôt principal chez l'adulte reste le dépôt sous-cutané situé en inter-scapulaire. En dehors de ce dernier, on trouve aussi quelques autres dépôts sous-cutanés, des dépôts péri-organiques (en particulier péri-cardiaques et péri-rénaux), péri-vertébraux et péri-vasculaires. Tout comme le TA blanc, le TA brun est majoritairement composé d'adipocytes associés à une fraction stromale vasculaire (Figure 10). Néanmoins, les adipocytes bruns sont différents des blancs, avec une gouttelette lipidique multiloculaire et un contenu élevé en mitochondries activées.

D'un point de vue phénotypique, on note aussi une forte expression de la Uncoupling protein 1 (UCP1) de façon constitutive, ce qui est une caractéristique spécifique de ce tissu²⁰⁰.

2. Ses origines :

Concernant leurs origines, les adipocytes bruns sont, tout comme les adipocytes blancs, issus des CSM. Les signaux principalement connus dans l'induction de la différenciation et de l'activation du TA brun sont les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) et l'insuline pancréatique. Sous leur effet, les CSM vont premièrement se différencier en myoblastes. En effet, les adipocytes bruns partagent leur lignée avec celle des cellules musculaires. Tout comme la différenciation des CSM vers les adipoblastes, la différenciation des CSM en myoblastes est issue de mécanismes encore assez peu connus à l'heure actuelle. A partir des myoblastes, l'expression de BMP7 va permettre la différenciation en précurseurs Myf5+ (par opposition au préadipocytes blancs qui sont eux Myf5-)²⁰¹. La séparation entre les lignées adipogéniques brunes et myoblastiques se fait à partir de ce point. Le maintien de l'expression de BMP7 et l'expression PRDM16 vont ainsi induire la différenciation en préadipocytes bruns^{201,202}. La suite devient alors majoritairement dépendante de l'expression de PPAR γ ²⁰². Celle-ci va permettre de poursuivre la différenciation et d'induire l'expression de facteurs nécessaires au bon fonctionnement du tissu adipeux tels que UCP1 et PGC1- α ^{202,203} (Figure 11).

3. Ses fonctions

Une fois les adipocytes bruns devenus matures, ils vont pouvoir exercer leurs fonctions métaboliques, sous l'effet de signaux activateurs comme les hormones thyroïdiennes T3 et T4 ou l'insuline²⁰⁴⁻²⁰⁶. L'activité des adipocytes bruns porte majoritairement sur la thermogénèse indépendante du frisson. Chez les mammifères adultes et non-hibernants, la majorité de la thermogénèse corporelle et de la régulation de la température dépend du frisson musculaire²⁰⁷. Néanmoins, le TA brun peut dans certains cas y jouer une part importante puisqu'il présente un bilan énergétique maximal de 300 watts/kg contre 1 watts/kg pour les autres tissus^{208,209}. Ainsi, selon l'équation définie par les travaux de Rothwell et Stock, il faudrait seulement entre 40 et 50 grammes de TA brun pour effectuer 20% de la thermogénèse quotidienne du corps humain^{210,211}. Le rôle du TA brun et son importance sont d'ailleurs modulables suivant les conditions de vie et l'environnement. Ainsi, un individu exposé régulièrement au froid développera des dépôts de TA brun interscapulaire plus importants^{212,213}. Il a même été récemment montré que l'exposition au froid à plus court terme comme lors des variations de températures liées aux saisons induit une activation de ce tissu adipeux mais dans une moindre

mesure^{214,215}. Ce mécanisme de thermogénèse est dépendant de la protéine UCP1 et de l'activité mitochondriale. UCP1 est une protéine de découplage de la respiration présente sur la membrane interne des crêtes mitochondriales. Elle va alors agir comme un transporteur d'H⁺ dépendant de nucléotides et d'acides gras à longues chaînes²¹⁶. La fuite de protons depuis l'espace intermembranaire ainsi produite par UCP1 va ramener à la normale la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce phénomène empêche l'activité de l'ATP synthase et la production d'énergie par le biais de la respiration sous forme chimique (ATP). Cette énergie va à la place être dissipée sous forme d'énergie thermique et ainsi générer de la chaleur. Cette génération de chaleur peut avoir plusieurs effets et fonctions suivant la position du tissu adipeux^{197,200,216}. Ainsi, la thermogénèse dans le TA brun interscapulaire, sous-cutané et situé autour des organes semblerait servir majoritairement à réguler la température de l'individu, alors que le TA brun péricardiaque et périvasculaire semble jouer un rôle dans la régulation de la température sanguine et l'activité vasomotrice¹⁹⁸. Il est à noter que cette activité de thermogénèse dissipe une grande quantité d'énergie métabolique et consomme donc beaucoup de lipides et/ou de glucides. Ce constat pousse certaines personnes à s'interroger sur l'intérêt clinique de l'activation ou de la greffe de TA brun dans le traitement de l'obésité ou d'autres pathologies métaboliques^{217,218}. Certaines personnes pensent aussi que cette importante dissipation d'énergie pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de la cachexie induite par le cancer^{219,220}.

En dehors de ses fonctions métaboliques, il est apparu récemment que le TA brun, tout comme le TA blanc, est un organe endocrine à part entière avec ses propres particularités. A ce jour peu de facteurs sécrétés par le tissu adipeux brun sont encore réellement connus et aucun facteur spécifique des adipocytes bruns n'a été identifié. On peut néanmoins noter quelques facteurs sécrétés de façon importante avec quatre facteurs de croissance : le FGF21, le Nrg4, le VEGF A et B, dont les liens respectifs avec les fonctions du TA brun ne sont pas connus^{221,222}. On trouve aussi des Bone Morphogenic Proteins (BMP) et des adipokines classiques (IL-6 et adiponectines par exemple)²²². Néanmoins, très peu d'études portent sur le sécrétome des adipocytes bruns et aucune donnée spécifique n'existe sur les rôles de ces adipokines dans les fonctions du TA brun.

C. Le tissu adipeux beige

1. Sa localisation et son origine :

On désigne par ce nom un phénotype de TA nouvellement identifié qui s'agence en petit dépôt retrouvé au sein même du TA blanc. Ce tissu peut ainsi être présent dans n'importe quel TA blanc (Figure 10). Il est appelé beige ou « brite » (pour BRrown In whITE) car il présente un phénotype intermédiaire entre le tissu blanc et le tissu brun. Les adipocytes sont ainsi pluriloculaires mais avec des vacuoles lipidiques plus larges que celle du TA brun. Les mitochondries présentent un aspect semblable à celles du TA brun. Elles sont large avec des crêtes épaisses, ce qui témoigne d'une activité mitochondriale importante associée à un découplage de la chaîne respiratoire (assurée par l'expression d'UCP1). Néanmoins, leur nombre et leur activité restent plus faibles que dans un adipocyte brun mais plus importants que dans un adipocyte blanc (Figure 11)²²³⁻²²⁶.

Concernant la différenciation de ce TA, elle est encore actuellement très discutée. Certaines études montrent que les adipocytes beiges peuvent se différencier directement à partir des préadipocytes Myf5- du TA blanc et se distinguent des adipocytes blancs par l'activation d'UCP-1, TMEM26, CD137 et Tbx1^{225,227-229}. La plupart des études décrivent néanmoins une transdifférenciation à partir du TA blanc sous l'action des prostaglandines, de stimuli thermiques ou de signaux β 3 adrénergiques^{223,228,229}. Certaines études suggèrent que cette transdifférenciation peut aussi s'effectuer à partir de précurseurs d'adipocytes bruns matures et que ces adipocytes beiges seraient alors Myf5+ avec un phénotype légèrement différent. Néanmoins, ces résultats nécessitent encore d'être approfondis et confirmés²³⁰.

Le phénotype des adipocytes beiges reste encore actuellement soumis à discussion. Les marqueurs admis par consensus comme présents dans le TA beige sont UCP-1, PRDM16, TMEM26, CD137 et TBX1 (considérés comme des marqueurs spécifiques du beige)^{223,225}. Néanmoins, ces marqueurs restent non-spécifiques et certains sont aussi présents dans les adipocytes blancs et bruns. Ainsi, c'est une signature présentant plusieurs marqueurs à la fois d'adipocytes blancs et d'adipocytes bruns qui va permettre d'affirmer le caractère beige de ces cellules. A l'heure actuelle, il n'existe aucune signature admise de façon consensuelle par la communauté scientifique au travers des différents travaux.

2. Ses fonctions :

Les activités de ce TA sont elle aussi intermédiaires puisqu'il présente à la fois une activité métabolique et sécrétoire importante comme le TA blanc mais aussi une activité de thermogenèse par découplage de la chaîne respiratoire avec UCP-1 comme le TA brun^{224,229}. Comme expliqué précédemment, ces dépôts de TA beige se retrouvent chez tous les individus de façon physiologique mais sont présents en plus grande quantité chez les personnes exposées au froid.

Il existe actuellement très peu d'études portant sur les sécrétions de ce TA beige, la plupart s'intéressant aux mécanismes d'apparition et au fonctionnement métabolique de ce tissu. Certaines études semblent toutefois montrer qu'il est, sur ce point, très proches du TA brun avec la sécrétion de FGF21, de Nrg4, de VEGF A et B, de certaines BMP ou d'AGPT-1²³¹. On retrouve aussi les sécrétions communes à de nombreux tissus adipeux comme l'adiponectine ou la leptine par exemple²²⁵.

D. Le tissu adipeux rose :

Contrairement au TA blanc et brun, le TA rose, bien qu'étant un type de tissu adipeux à part entière, ne provient pas d'une différenciation directe des CSM mais d'une transdifférenciation du TA blanc mammaire. Le TA blanc mammaire est le composant principal de la glande mammaire, il contient des cellules endothéliales, des fibroblastes et des adipocytes agencés autour des glandes épithéliales mammaires (Figure 10). Les glandes épithéliales s'arrangent en une arborescence connectée à un unique et même canal, débouchant sur la papille mammaire. Le concept de TA rose est très récent et émergent. Il s'agirait d'une modification du TA mammaire apparaissant au cours de la gestation^{232,233}. Ce tissu porte ce nom de rose à cause de sa couleur rosée lors des observations macroscopiques. Au cours de la gestation, les adipocytes mammaires vont changer de phénotypes, former des glandes mammaires et s'associer aux glandes épithéliales mammaires, développées précédemment dans le microenvironnement mammaire. Sous l'action de certaines hormones oestro-progestatives, les adipocytes vont ainsi acquérir des caractéristiques épithéliales et leur gouttelette lipidique va se subdiviser afin de former des alvéoles chargées en lipides. L'apparition de cette structure lobulo-avéolaire et glandulaire va ainsi permettre de modifier le métabolisme de ces cellules pour qu'elles puissent utiliser les lipides stockés afin de produire du lait²³³. La présence de ce tissu est donc temporaire et a pour seul but d'assurer la production de lait qui suivra l'accouchement (Figure 11).

II. Des cas particuliers de tissus adipeux : le tissu adipeux périprostatique et le tissu adipeux médullaire.

Comme nous avons pu le voir il existe différents types de tissus adipeux avec des particularités qui sont propre à chacun. Cependant, il peut aussi exister des particularités au sein d'un même type de tissu adipeux. Par exemple, au sein du tissu adipeux blanc viscéral on va trouver des variations de phénotype suivant la localisation et l'organe qu'entoure ces dépôts. Nous nous intéresserons ici à deux de ces cas particuliers, le tissu adipeux périprostatique et le tissu adipeux médullaire.

A. Le tissu adipeux périprostatique :

1. Sa localisation et ses origines :

Nous nous intéressons ici au tissu adipeux périprostatique (TAPP) car il s'agit d'un TA blanc présentant un lien particulier avec la prostate et le cancer de la prostate. En effet le TAPP entoure la prostate sous la forme de différents dépôts. Le TAPP n'est alors séparé de la prostate que par une mince barrière de collagène appelée la capsule prostatique^{234,235} (Figure 12). De façon intéressante, bien que ce tissu soit un TA blanc viscéral, il présente des particularités qui lui sont propres, comme un contenu plus élevé en CSM que les autres tissus adipeux. Par exemple, il semble aussi subir des modifications originales en cas d'obésité ou de cancer de la prostate. Ces deux particularités seront décrites dans les parties correspondantes^{235,236}. Peu de données sont connues sur la différenciation de ce TAPP mais il est probable qu'elle s'effectue à partir de CSM de façon relativement semblable à la différenciation du TA blanc. Toutefois, une étude récente a montré que les inhibiteurs de la 5 alpha-réductase sont capables de limiter le développement et la croissance du TAPP. Il semblerait donc que la différenciation du TAPP soit influencée par la 5 alpha réductase et donc *in extenso* par la dihydrotestostérone²³⁶.

2. Ses fonctions :

Les fonctions métaboliques du TAPP sont semblables à celles du TA blanc avec des capacités à stocker des lipides sous formes de triglycérides^{8,163,237}. Cependant, on observe quelques particularités en termes de qualité et de variabilité de contenu en acides gras comparé à celui d'un TA blanc classique avec un contenu très riche en acide gras mono-insaturés et peu de d'acide gras polyinsaturés^{238,239}. Pour autant que les effets de telles modifications lipidiques ne sont actuellement pas connus.

On retrouve des sécrétions communes au TA blanc comme la leptine, l'adiponectine ou l'angiotensine 1, mais aussi une forte expression de certaines protéines impliquées dans le remaniement de la matrice extracellulaire avec MMP 2 et 9^{163,240}.

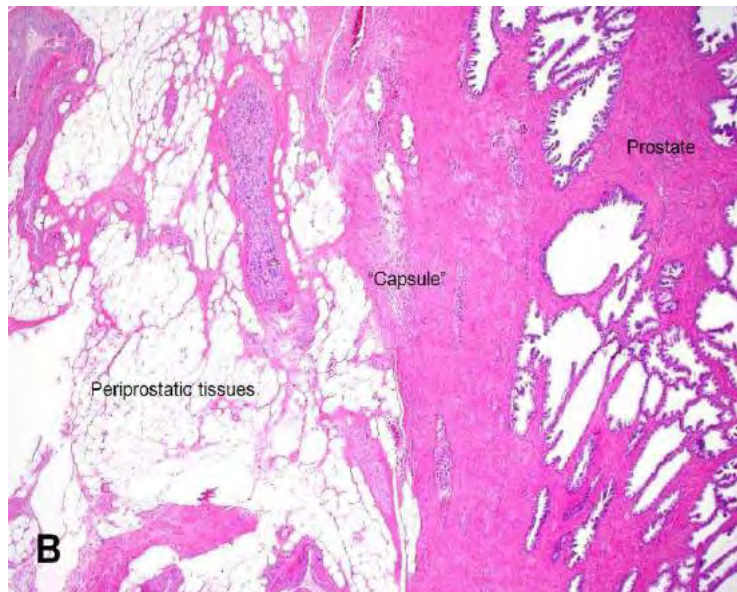


Figure 12 : Histologie du tissu adipeux périprostatique. D'après *American Urological Association collection*

B. Le tissu adipeux médullaire :

1. Sa localisation et sa répartition :

Ce TA médullaire est un des composants majoritaires de la moelle osseuse. Néanmoins, il ne se trouve pas dans tous les os. On le retrouve majoritairement dans la moelle osseuse des os longs (fémur, tibia, humérus, radius ...) et des os plats (os du crâne, côtes ...). De façon comparable aux tissus adipeux viscéraux et sous-cutanés composés d'adipocytes et de cellules stromales contenues dans une matrice composée en grande partie de collagènes de types variés (types I, III, IV et V)²⁴¹, le « tissu adipeux médullaire » se compose majoritairement d'adipocytes mais aussi de cellules myéloïdes et stromales contenues dans une matrice vascularisée²⁴². Il existe une seconde subdivision de ce tissu adipeux au sein d'un même os. On identifie ainsi le tissu adipeux médullaire constitutif, contenu dans ce qui était autrefois appelé la moelle jaune, et le tissu adipeux médullaire régulé, contenu dans ce qui était autrefois appelé la moelle rouge²⁴³ (Figure 13). La moelle jaune et le tissu adipeux médullaire constitutif se situent au niveau de l'os cortical, au centre de la cavité médullaire chez l'Homme. Il présente des fonctions majoritairement métaboliques et peu hématopoïétiques. A l'opposé, le tissu adipeux médullaire régulé et la moelle rouge se situent aux extrémités des os dans la partie trabéculaire. Ils contiennent moins d'adipocytes et présentent une activité majoritairement

hématopoïétique²⁴³. Nous reviendrons sur les fonctions de ce tissu adipeux médullaire dans une prochaine partie. Il est important de noter pour les études expérimentales que la souris et les autres rongeurs présentent un agencement spatial inversé de ces dépôts. La moelle rouge se situe alors au centre de l'os et la moelle jaune en périphérie²⁴⁴. De même, concernant la croissance de la masse adipeuse médullaire, elle évolue de manière centrifuge (du centre vers les extrémités) chez l'Homme, alors qu'elle évolue de manière centripète (des extrémités vers le centre) chez la souris²⁴³. Enfin, si les adipocytes médullaires représentent la population principale de la moelle osseuse humaine chez les rongeurs et en particulier chez la souris, elle est largement supplantée par les polynucléaires (en particulier les polynucléaires neutrophiles)²⁴⁵. Ces résultats soulignent donc que la transposition des résultats obtenus chez la souris à l'homme doit être interprétée avec la plus grande précaution.

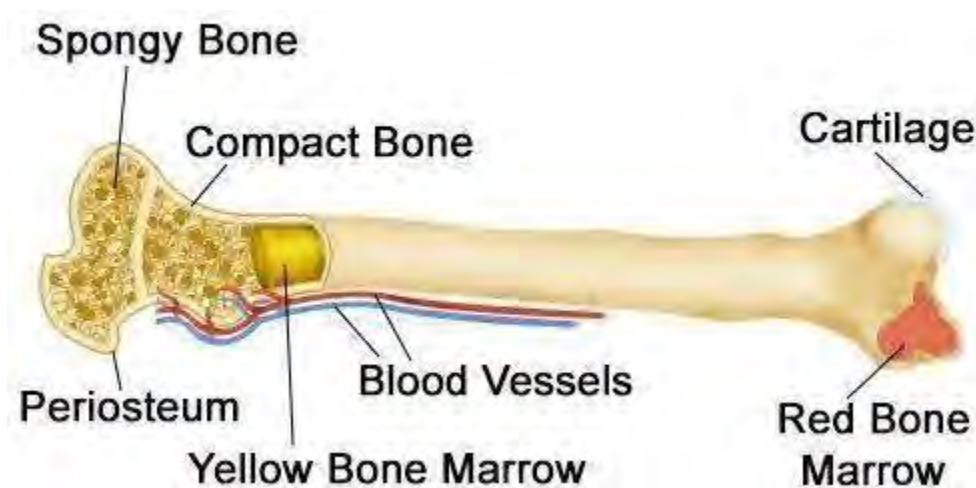


Figure 13 : Anatomie des os long et de la moelle osseuse. D'après *Major Differences' Medical picture database*

2. Des origines complexes : une différenciation par étapes

Les adipocytes médullaires sont tous issus des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSM). Ils partagent d'ailleurs leur origine avec celle des ostéoblastes, qui sont les cellules à l'origine du remaniement osseux et en particulier de la production de la matrice osseuse¹¹. Au cours de la différenciation ces CSM médullaires sont recrutées au niveau de niches médullaires qui peuvent à la fois accueillir les cellules souches hématopoïétiques et les CSM^{11,246,247}. On assiste donc dès la maturation des adipocytes médullaires à une compétition

avec l'hématopoïèse (Figure 14). Cette compétition est d'ailleurs à l'origine de la dichotomie entre le tissu adipeux médullaire régulé et le tissu adipeux constitutif²⁴³ :

- Au niveau du tissu adipeux médullaire constitutif les niches médullaires vont majoritairement accueillir des CSM qui se différencieront en adipocytes médullaires ou en ostéoblastes.
- Au niveau du tissu adipeux médullaire régulé les **niches** médullaires vont majoritairement accueillir des cellules souches hématopoïétiques et devenir des niches hématopoïétiques.

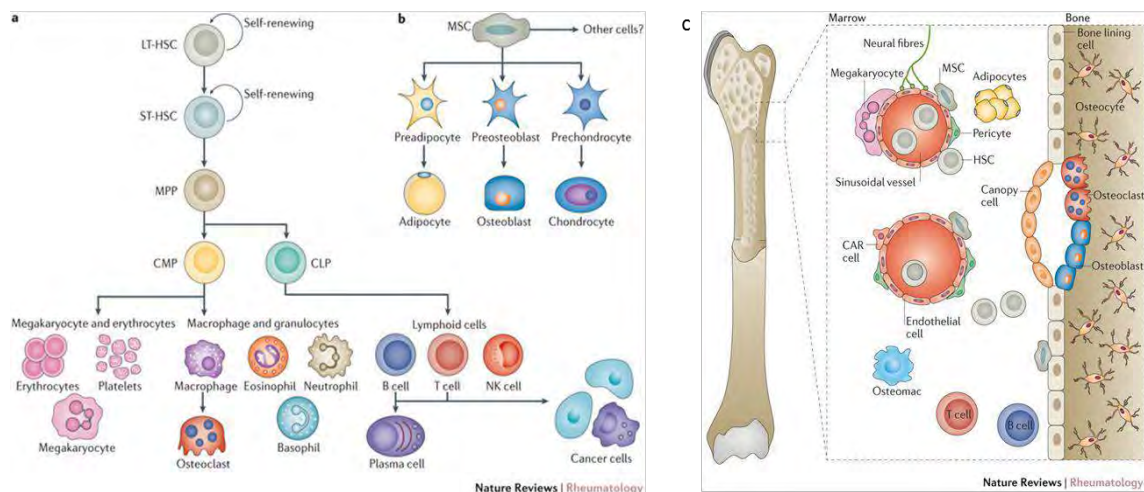


Figure 14 : Devenir des CSH et CSM. Différentes différenciations possibles des CSH (a) et des CSM (b). (c) Schéma de la niche médullaire périvasculaire permettant la différenciation des CSM et des CSH. D'après Reagan M. *et al*, 2016, Nature Review of Rheumatology

Cette différence de recrutement au sein des niches dépend des cellules qui les compose, de leurs sécrétions et de leur activité. La niche hématopoïétique/mésenchymale médullaire est une niche très riche et variée contenant des cellules réticulaires, des ostéoblastes, des adipocytes médullaires, des cellules endothéliales périvasculaires et certaines cellules immunitaires. Le recrutement des CSH s'effectue par chimioattraction grâce aux cellules réticulaires sécrétrices de CXCL12, aux cellules endothéliales périvasculaires activées sécrétant de la sphingosine-1-phosphate et aux CSM exprimant la nestine^{246,248-250}. A l'opposé, pour obtenir une niche mésenchymale médullaire recrutant les CSM et les différenciant en ostéoblastes ou en adipocytes médullaires, il est nécessaire d'avoir la présence d'adipocytes médullaires actifs sécrétant de la leptine et de l'adiponectine, ainsi que des ostéoblastes activés. Il est intéressant de voir que les ostéoblastes et les adipocytes médullaires sont eux-mêmes des acteurs de leur propre différenciation : leur propre activation va conduire les CSH à entrer dans un mécanisme

de dormance et favoriser le recrutement de CSM au niveau des niches^{11,247,250}. Ainsi, une activation des ostéoblastes par l'hormone parathyroïdienne empêche l'activation des CSH les maintenant dans un état de dormance et diminuant l'hématopoïèse²⁵¹. Les adipocytes médullaires matures quant à eux empêchent la chimioattraction des CSH au profit des CSM mais ont aussi une action inhibitrice sur la différenciation des CSH, provoquant un effet délétère sur l'hématopoïèse. Il existe donc un phénomène d'auto-induction des adipocytes et des ostéoblastes conduisant à la chute de l'hématopoïèse et favorisant un remaniement osseux et un développement du TA médullaire^{11,243}. Ce phénomène est d'ailleurs présent dans de nombreuses pathologies ou modifications des fonctions du tissu adipeux, comme le vieillissement et l'obésité^{252,253}. Nous décrirons ces phénomènes au cours d'une prochaine partie portant sur les modifications du tissu adipeux.

Au-delà de cette différence entre les niches pro-CSH et pro-CSM, il existe un second degré de différenciation. En effet, les CSM peuvent se différencier aussi bien en ostéoblastes qu'en adipocytes médullaires^{254,255}. Cet engagement dans l'une ou l'autre des voies de différenciation est contrôlé par les adipocytes médullaires de la niche qui induisent une différenciation des CSM en adipocytes médullaires par une sécrétion importante de leptine²⁵⁶⁻²⁵⁸. L'interaction entre la matrice extracellulaire de la niche et les intégrines de la CSM vont aussi jouer un rôle important en activant la voie Akt qui va inhiber la différenciation ostéogénique et favoriser l'adipogenèse par l'activation de PPAR γ et des protéines C/EBP, acteurs essentiels dans la différenciation adipogénique^{244,254}. A l'opposé, une sécrétion basse de leptine mais élevée d'adiponectine, associée à la présence de PTH, va plutôt entraîner les CSM vers une différenciation en ostéoblaste. Dans les CSM, on observe alors une activation des voies Wnt/ β cat, Notch, BMP et Hedgehog qui vont toutes inhiber la différenciation adipogénique et favoriser l'ostéogénique par activation de RunX2 et de l'Osterix^{254,259}. On comprend donc que la différenciation d'une CSM obéit à deux degrés de sélection. Le premier prend en compte la sélection de l'origine de la cellule souche recrutée par la niche, à savoir CSH ou CSM. Dans un second temps, la CSM doit s'engager dans la voie de différenciation adipocytaire plutôt que dans la voie ostéoblastique. Les adipocytes médullaires matures semblent donc être des acteurs de ce phénomène et semblent impliqués dans l'obtention de nouveaux adipocytes médullaires matures (Figure 15).

Une fois matures, les adipocytes médullaires sont d'aspect assez semblable à un adipocyte blanc mais néanmoins de taille plus petite. Il s'agit de cellules rondes avec une gouttelette monoloculaire lipidique repoussant le noyau vers la périphérie. Concernant leur phénotype, il

reste à ce jour très discuté. La plupart des signatures les placent phénotypiquement très proches du TA blanc avec l'expression de PPAR- γ et des protéines qu'il régule tels que GPDH, LPL, l'adiponectine et la leptine^{260,260}. Malgré cela, certaines études leur prêteraient des propriétés communes avec les tissus adipeux beige et brun, notamment par l'expression de marqueurs spécifiques tels que PGC1- α , CIDEA, PRDM16, TBX1 ou TMEM26^{254,261-263}. Néanmoins, l'aspect monoculaire de la gouttelette lipidique, ainsi qu'une absence d'expression basale d'UCP1 sans induction semble indiquer un phénotype plus proche du TA blanc que du beige. Toutefois, au vu de leurs caractéristiques, ils semblent que les adipocytes médullaires présentent un phénotype qui leur est propre avec des caractéristiques du TA blanc, du beige, du brun mais aussi d'autres facteurs spécifiques²⁶¹⁻²⁶³.

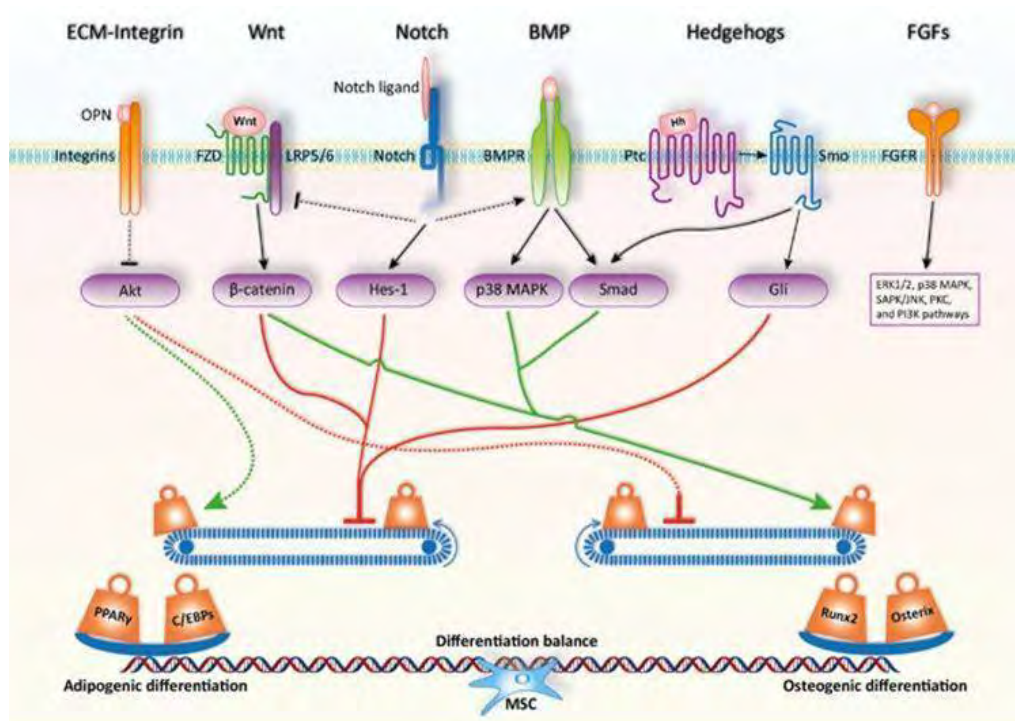


Figure 15 : Voie de différenciation contrôlant le devenir des CSM en adipocytes ou en ostéoblastes. D'après Chen Q *et al*, 2016, Cell death and differentiation.

Ces résultats restent toutefois à prendre avec précaution et esprit critique. La plupart de ces études sont contradictoires et réalisées à l'aide de modèles *in vitro* ou *ex vivo* issus de la différenciation de CSM murine ou humaine. Or, des résultats obtenus au sein de notre laboratoire semblent indiquer de grandes différences entre les adipocytes médullaires matures humains et ceux obtenus par différenciation *in vitro* ou *ex vivo* de CSM²⁴². Il se pourrait donc qu'il existe un biais dans l'analyse phénotypique de ces adipocytes à cause de l'utilisation de modèles trop éloignés de la réalité biologique. Néanmoins, on peut espérer que le regain d'intérêt sur l'étude du rôle des adipocytes médullaires ainsi que de nouvelles techniques

expérimentales aboutiront à des études plus précises et plus proches de la réalité biologique.

3. Ses fonctions et son rôle dans l'homéostasie du corps humain :

D'un point de vue fonctionnel, le TA médullaire présente aussi des fonctions qui lui sont propres. Il joue un grand rôle dans l'homéostasie de la moelle osseuse et intervient dans la différenciation des cellules hématopoïétiques et des cellules ostéoblastiques, par des actions et des mécanismes décrits dans la partie précédente^{247,264}. Les adipocytes médullaires jouent aussi un rôle important dans le renouvellement de la matrice osseuse. En effet, ils partagent leurs précurseurs avec ceux des ostéoblastes et il existe donc un équilibre entre la production d'adipocytes et d'ostéoblastes. Si cette dernière penche trop vers le côté adipocytaire, on observe une diminution des ostéoblastes et du renouvellement osseux^{254,255}. Dans ce cas, il y a alors un envahissement de la cavité médullaire par le TA médullaire ainsi qu'une destruction de la matrice osseuse minérale, aboutissant à l'ostéoporose. Ce phénomène est d'autant plus amplifié que certains adipocytes médullaires expriment RANK-L, un ligand activateur des ostéoclastes (cellules responsables de la destruction de la matrice osseuse)^{265,266}. Ce mécanisme apparaît dans certaines pathologies du tissu adipeux comme l'obésité ou même physiologiquement au cours du vieillissement.

Les progéniteurs adipocytaires du TA médullaire sont aussi capables de migrer vers des sites précis afin de renouveler à distance les tissus adipeux. Les cellules médullaires remplaçant ainsi les adipocytes viscéraux ou sous-cutanés se différencient au niveau du dépôt adipeux et acquièrent le phénotype et les fonctions d'un adipocyte blanc du tissu d'accueil²⁶². Cette fonction fait du TA médullaire un formidable réservoir nécessaire à la régénération des différents tissus adipeux blancs du corps humain.

Concernant le métabolisme de ces adipocytes médullaires, il reste actuellement de nombreuses zones d'ombres. Certains articles semblent indiquer la présence des mêmes fonctions de lipogenèse et de lipolyse qu'un adipocyte blanc classique^{258,267}. Cependant, la même question se pose que pour le phénotype, ces études ayant été menées sur modèles *in vitro* ou *ex vivo* issus de la différenciation de CSM murine ou humaine^{242,257,268}. Le comportement métabolique de ces adipocytes semble d'autant plus particulier qu'en cas de restriction calorique, on observe une accumulation d'adipocytes hypertrophiés au sein de la moelle osseuse²⁶⁹, alors que dans le cas des adipocytes blancs viscéraux, les adipocytes et les dépôts de tissus adipeux diminuent en taille²⁷⁰. Il se pourrait donc que les fonctions métaboliques de ces adipocytes soient assez différentes des adipocytes blancs. Très peu d'études s'y étant intéressées, on ne sait encore que peu de choses au sujet du métabolisme des adipocytes médullaires.

Cependant, on peut citer l'exemple d'une étude récente semblant suggérer une fonction lipolytique voire de β -oxydation au sein de ces cellules, mais ces résultats nécessitent d'être confirmés²⁶⁷

Par ailleurs, une étude menée très récemment par notre équipe semble indiquer que les adipocytes médullaires présentent un profil lipidique qui leur est propre, avec un contenu enrichi en certains lipides et tout particulièrement en cholestérol et en monoacylglycérols²⁴². Ces modifications sont associées à un profil enzymatique particulier en ce qui concerne le métabolisme lipidique, avec une augmentation des enzymes du métabolisme du cholestérol et une diminution des enzymes de la lipolyse, en particulier des monoacylglycérols lipases²⁴².

Au vu des spécificités métaboliques que nous avons pu observer jusqu'à maintenant dans ces adipocytes médullaires, nous avons suggéré qu'ils appartaient à une classe distincte d'adipocytes que nous avons proposé d'appeler les « adipocytes jaunes »²⁴².

III. Les modifications physiologiques et physiopathologiques du tissu adipeux :

A. Les méthodes d'évaluations : IMC et autres techniques

La plupart des modifications physiopathologiques du tissu adipeux vont passer par une modification de la masse de ce tissu et des fonctions des différents dépôts. Afin de mieux comprendre leur classification clinique, il est important d'étudier la notion d'indice de masse corporelle. Cet indice s'obtient en divisant le poids (kg) du patient par le carré de sa taille (cm). Il est un outil essentiel en clinique car suivant la valeur obtenue, le patient va pouvoir être classé dans différentes catégories²⁷¹ :

- Dénutrition : IMC < 16
- Maigreur : IMC [16-19]
- Poids normal : IMC [19-24,9]
- Surpoids : IMC [25-29,9]
- Obésité modérée : IMC [30-34,9]
- Obésité moyenne : IMC [35-39,9]
- Obésité sévère (morbide) : IMC $\geq$ 40

Il est à noter que bien que l'IMC soit un indice couramment utilisé et validé en clinique, il possède néanmoins des limites importantes. Il ne peut par exemple pas être utilisé chez les sportifs de haut niveau, pour lesquels une masse musculaire particulièrement élevée perturbe

cette échelle. Il en va de même pour les nourrissons ou les personnes très âgées, pour lesquels les changements physiologiques de masses graisseuses et musculaires ne permettent pas une mesure adéquate²⁷¹.

Du fait de l'importance de l'obésité du point de vue de la santé publique et des limites de l'utilisation de l'IMC, de nombreuses autres méthodes sont pratiquées ou expérimentées pour diagnostiquer cette pathologie. Celles-ci peuvent être simples comme les mesures de tour de bras, taille ou hanches mais aussi plus complexes comme la mesure de l'impédance bioélectrique ou encore la densitométrie par immersion du corps du patient. D'une manière générale, ce sont les méthodes les plus complexes qui sont les plus efficaces et les plus pertinentes¹⁶⁷. A l'heure actuelle, les trois méthodes les plus efficaces pour évaluer l'obésité sont :

- La dilution isotopique qui permet d'obtenir par calcul la masse graisseuse du patient suite à la dilution d'un isotope radioactif dans son organisme.
- L'absorptiométrie de rayon X bi-photon qui utilise des rayons X de basse énergie pour définir la proportion de masse non-grasse, grasse et osseuse au sein du patient.
- La tomодensitométrie et l'IRM qui permettent de définir avec précision la masse grasse du patient.

Ces trois méthodes, bien que les plus efficaces, sont à ce jour encore coûteuses en termes financier et logistique et ne peuvent donc pas être utilisées pour une pratique régulière et quotidienne.

B. L'obésité

1. Description et physiopathologie :

Selon l'OMS, en 2014 11% des hommes et 15% des femmes étaient obèses, soit 600 millions de personnes dans le monde. Des chiffres d'autant plus impressionnants si on y ajoute les 1,9 milliards de personnes en surpoids. Cette évolution de l'obésité et du surpoids dans la population est d'ailleurs d'autant plus impressionnante qu'elle est particulièrement rapide avec un doublement des chiffres depuis 1980. Au vu de ces données et des nombreuses comorbidités associées à cette pathologie, l'obésité apparaît clairement comme un enjeu de santé majeur du monde moderne^{167,170}.

L'obésité correspond à une accumulation excessive et anormale de masse graisseuse. Il peut y avoir plusieurs étiologies. Néanmoins, la raison la plus commune est la cause nutritionnelle et métabolique. Dans ce cas, les apports caloriques sont supérieurs aux dépenses énergétiques de

l'individu. Le stockage des lipides et des glucides devient alors plus élevé que leur dépense sous forme d'énergie^{173,272,273} (Figure 16). Cet excédent de lipide va donc venir s'accumuler au niveau du tissu adipeux. Il existe aussi des formes familiales d'obésité, beaucoup plus complexes, ajoutant à cela des causes d'origine génétique²⁷⁴. Certains facteurs environnementaux ou traitements peuvent aussi favoriser l'obésité en ayant par exemple une action orexigène. L'obésité est par ailleurs souvent associée au diabète de type 2 et à d'autres syndromes métaboliques¹⁶⁸. On aurait cependant tort de réduire simplement l'obésité et ses complications à leur définition comme une accumulation de tissu adipeux. En effet, des études montrent que le type de tissu adipeux accumulé joue aussi un rôle important. Ainsi, une accumulation de tissu adipeux dans les parties basses du corps (majoritairement composé de tissu adipeux sous-cutané) va augmenter la masse adipeuse mais ne va pas induire les modifications métaboliques classiques de l'obésité (résistance à l'insuline, hyperglycémie et dyslipidémie) et va même avoir un effet protecteur contre ces problèmes. Au contraire, l'accumulation de tissu adipeux dans les parties hautes du corps (tissu adipeux viscéral) va fortement augmenter la masse adipeuse viscérale et induire toutes les complications métaboliques de l'obésité clinique²⁷⁵.

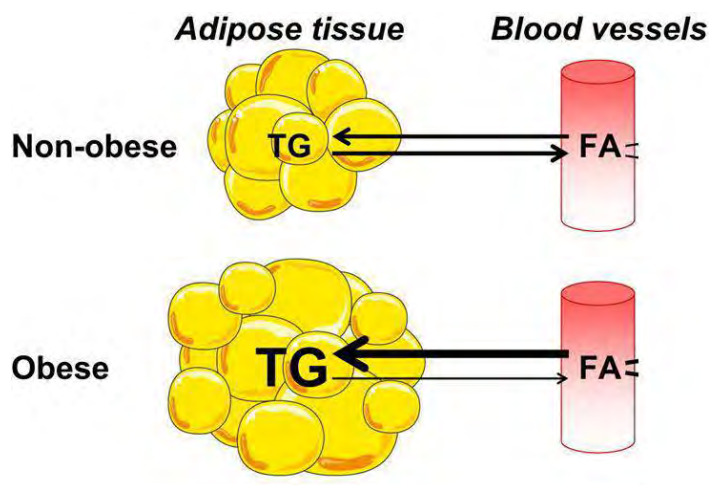


Figure 16 : Balance énergétique du TA blanc dans l'obésité. D'après Langin *et al*, 2011, Cell Metabolism

2. Les effets sur les différents tissus adipeux :

Au niveau cellulaire, les adipocytes du TA blanc vont dans un premier temps augmenter en taille (phénomène d'hypertrophie) puis, une fois une taille critique atteinte, se multiplier en nombre en recrutant de nouveaux précurseurs (phénomène d'hyperplasie). C'est l'accumulation de ces deux phénomènes qui va aboutir à l'expansion du TA blanc²⁷⁶. La phase d'hypertrophie peut être facilement réversible alors que la phase d'hyperplasie se traite beaucoup moins facilement. Par ailleurs, au niveau du tissu dans sa globalité, on observe une vascularisation

limitée qui va aboutir à la formation de zones d'inflammation et d'hypoxie. Cette inflammation se caractérise par une forte infiltration de ce tissu par des cellules immunitaires et en particulier par des macrophages et des lymphocytes²⁷⁷. Ces phénomènes peuvent parfois aboutir à la mort par nécrose de certains adipocytes qui se retrouvent alors entourées par une couronne de macrophage M1, formant ainsi une crown-like structure (CLS), phénomène retrouvé fréquemment dans le TA blanc obèse²⁷⁸. Le métabolisme ainsi que les capacités sécrétoires de l'adipocyte blanc sont elles aussi modifiées par l'obésité et on observe une variation du phénotype avec par exemple une diminution de la sécrétion d'adiponectine et une augmentation de celle de leptine. Ainsi, les sécrétions du TA blanc viscéral et celles du TA blanc sous-cutané se retrouvent modifiées¹⁶⁹ (Figure 17).

Concernant le TA brun, sa présence et la taille des dépôts adipeux bruns sont inversement corrélées à l'obésité des patients. L'activité thermogénique du TA brun se retrouve ainsi globalement diminuée par un contexte d'obésité^{279,280}. Cette perte d'activité diminuerait la consommation de lipides et de glucides par ce TA et favoriserait donc l'accumulation de tissu adipeux blanc²⁸⁰. Le développement du TA beige diminue lui aussi en cas d'obésité²⁸¹. Les raisons de cette diminution de la transdifférenciation du TA blanc ne sont pas encore connues mais certaines études semblent indiquer que l'augmentation de l'adiponectine et la baisse de la leptine bloquent cette action en favorisant le maintien du TA blanc²⁸¹. Tout comme pour le TA brun, la perte du TA beige diminue la consommation de lipides et de glucides dédiés à la thermogenèse et favorise donc l'obésité par déséquilibre de la balance énergétique²⁸¹.

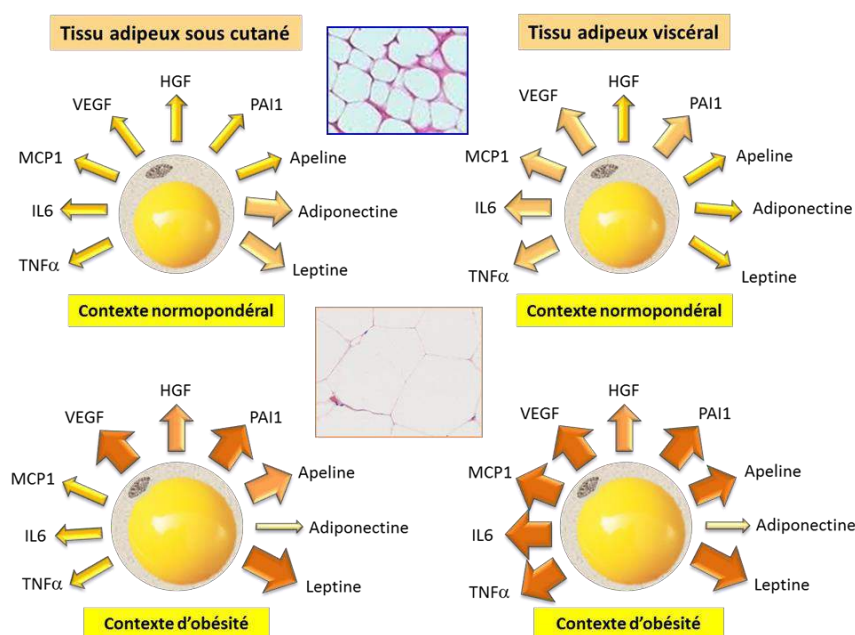


Figure 17 : Variation des sécrétions des TA blancs viscéraux et sous-cutanés en contexte normopondéral et d'obésité. D'après Laurent *et al*, 2014, Medecine Science

Concernant le TA rose, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'effet de l'obésité sur le développement de ce TA.

De façon intéressante, le TAPP, bien que considéré comme un TA blanc viscéral, semble se comporter de façon particulière puisque les études montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre le volume de ce TA et l'obésité du patient (indiquée par l'IMC)^{235,236,282}. Son volume semble plutôt corrélé à l'âge et aurait aussi avoir une influence sur le développement du cancer de la prostate, deux faits intéressants, que nous décrirons plus tard dans des parties adéquates. Par ailleurs, tout comme dans le TA blanc, on retrouve de fortes modifications sécrétoires de ce tissu dans un contexte d'obésité et/ou de dépôts de TAPP abondants²⁴⁰. Ces modifications de sécrétions pourraient entre autres favoriser le développement des tumeurs prostatiques.

Le TA médullaire suit les modifications du TA viscéral puisque chez l'homme on sait que les patients obèses présentent un envahissement médullaire graisseux avec une augmentation du volume de ce TA lors des mesures par IRM. Les études chez la souris montrent aussi, tout comme pour le TA viscéral, une augmentation du volume des adipocytes (hypertrophie) comme c'est le cas dans le TA blanc viscéral en cas d'obésité.

C. La restriction calorique :

1. Description et physiopathologie :

Un autre contexte physiopathologique du tissu adipeux est la restriction calorique avec défaut de malnutrition. La restriction calorique consiste en une diminution des apports énergétiques nécessaires à plus ou moins long terme. En temps normal, cette restriction calorique a plutôt un effet positif voire protectrice vis-à-vis de l'obésité et d'autres maladies²⁸³⁻²⁸⁵. Néanmoins, quand celle-ci devient excessive, des problèmes de malnutrition peuvent apparaître comme c'est le cas dans les comportements anorexigènes^{286,287} (Figure 18). Ce type de comportement peut apparaître suite à un problème psychologique, physiologique ou à cause de certains traitements. Nous nous intéresserons aux formes d'anorexie associées à une malnutrition et non pas à la forme plus légère de restrictions caloriques. De la même manière, nous ne décrirons pas le comportement du tissu adipeux en cas de cachexie, qui est une modification beaucoup plus complexe du tissu adipeux mais aussi d'autres tissus comme le tissu musculaire.

Bien que beaucoup moins répandue que l'obésité, l'anorexie (en particulier d'origine nerveuse) n'en reste pas moins un problème de santé publique important (avec une prévalence annuelle de 0,37 %)²⁸⁸. Par ailleurs comprendre les mécanismes sous-tendant la restriction calorique et

l'anorexie nous permet de mieux appréhender le fonctionnement et le métabolisme complexe des différents tissus adipeux.

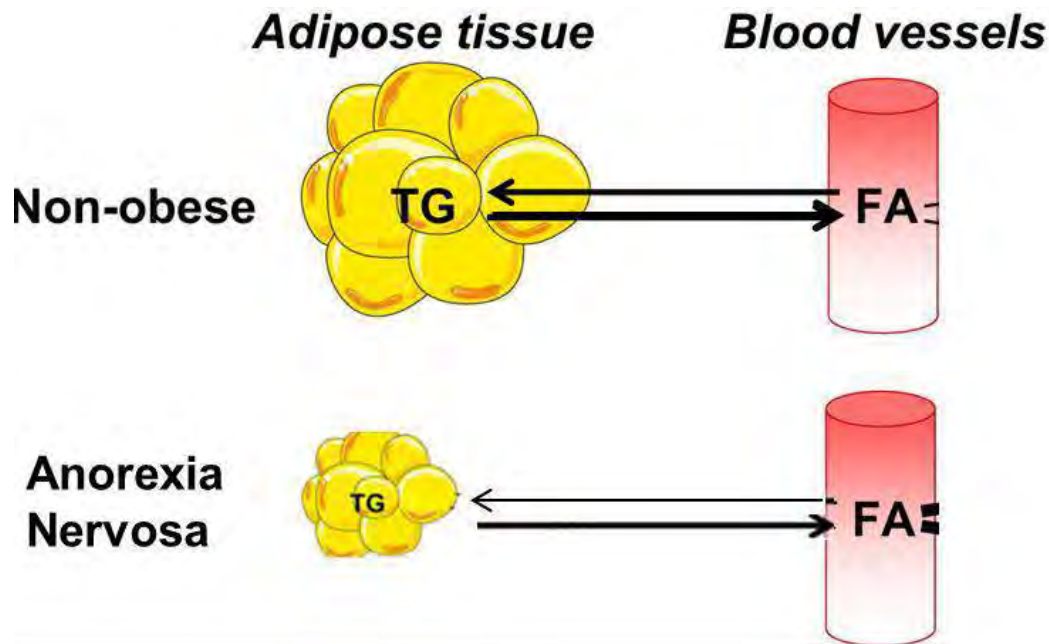


Figure 18 : Balance énergétique du TA blanc dans l'anorexie. D'après Langin *et al*, 2011, Cell Metabolism

2. Les effets sur les différents tissus adipeux :

D'un point de vue physiopathologique la dénutrition agit comme l'inverse de l'obésité. On observe ainsi une diminution des apports caloriques sans augmentation du stockage énergétique. Le manque d'apport va donc induire une rupture de la balance énergétique et donc une diminution progressive des réserves. On assiste alors à une augmentation de la lipolyse et à une diminution de la taille des dépôts adipeux blanc avec des adipocytes de plus petite taille. Ce phénomène apparaît dans tous les TA blancs, qu'ils soient centraux ou périphériques²⁸⁹.

Concernant le TA brun, peu d'études portent sur son rôle clinique dans l'anorexie ou la restriction calorique sévère. Néanmoins, une étude clinique semble indiquer une diminution des dépôts de tissu brun et de leur activité thermogénique²⁹⁰. Il reste néanmoins à savoir si la perte du tissu adipeux et de son activité est une cause ou une conséquence de l'anorexie²⁹⁰⁻²⁹³. Il semble par ailleurs que les patients anorexiques présentant un dépôt de TA brun plus important soient davantage protégés contre l'ostéoporose associée à cette maladie. Bien que les raisons à l'origine de ce phénomène soient encore inconnues, on suppose que le TA brun agirait comme un réservoir de cellules souches ostéoblastiques qui rejoindraient la cavité médullaire pour restaurer cette activité²⁹⁰⁻²⁹³. Concernant le TA beige, il existe peu de données concernant son état dans un contexte anorexique. Néanmoins, il semblerait qu'il subisse les mêmes

modifications que le TA brun, à savoir une réduction de l'adipogenèse avec une transdifférenciation diminuée et une diminution de l'activité thermogénique²⁹³.

Concernant le TA rose, il n'existe pas de données précises du lien potentiel entre ce TA et l'anorexie. Néanmoins, ce tissu dérivant du TA blanc, on peut supposer qu'il subit l'influence de l'anorexie lui aussi. Concernant le lien entre lactation et anorexie, les études portant sur ce point montrent que les femmes anorexiques présentent des défauts lors de l'allaitement. Néanmoins, il est difficile de savoir si les causes de ces arrêts sont d'ordres psychologique ou physiologique. Une étude s'est intéressée à la qualité du lait et a pu y observer des carences dans sa composition. On peut donc supposer que le contenu lipidique de ces adipocytes et le métabolisme du lait se retrouvent modifiés par l'anorexie et la restriction calorique²⁹⁴⁻²⁹⁶.

L'équilibre de la moelle osseuse et des cellules qui la composent est, lui aussi, fortement perturbé dans un contexte d'anorexie. On assiste ainsi à une diminution de l'os cortical (partie la plus solide de l'os majoritairement composée de matrice osseuse) et une augmentation de la partie dédiée à l'os trabéculaire (partie de l'os contenant la majorité de la moelle osseuse)^{269,293,297}. Ce phénomène a pour origine une augmentation de la masse adipeuse contenue dans la moelle osseuse au détriment de la matrice osseuse, avec des adipocytes médullaires de taille augmentée et des dépôts plus larges. Cette modification vient d'une plus grande différenciation des CSM médullaires dans la voie adipogénique au lieu de la voie ostéogénique^{269,293,297}. Ce changement de différenciation vient d'une modification de l'environnement médullaire due à une diminution des taux sériques de l'IGF-1 et de la leptine, deux événements pouvant favoriser la différenciation adipogénique médullaire²⁶⁹. Comme expliqué précédemment, les cellules souches issues du TA brun pourraient être recrutées au niveau médullaire et inverser la dégradation de la matrice osseuse grâce à une nouvelle production d'ostéoblastes²⁹².

D. Le vieillissement :

1. Description et physiopathologie :

Le vieillissement peut être défini comme l'ensemble des changements qui interviennent au cours de la vie d'un organisme. D'un point de vue biologique et gériatrique, le terme « vieillissement » revêt un aspect péjoratif. Il s'agit de la dégradation et de la modification graduelles des fonctions d'un organisme au cours de la vie d'un individu. Cependant, du point de vue de la physiologie et de la biologie cellulaire, ce concept apparaît de plus en plus

complexe et semble être intimement lié au phénomène de sénescence cellulaire. Les termes de vieillissement biologique et de sénescence sont d'ailleurs de plus en plus employés comme synonymes en biologie²⁹⁸. Pour une cellule, la sénescence se définit comme l'arrêt de la prolifération. C'est un événement complexe qui peut intervenir dans de nombreux cas. La plupart du temps, il s'agit d'une sénescence répllicative. C'est un phénomène de régulation physiologique au cours duquel les télomères se retrouvent fortement raccourcis suite à des réplifications multiples. La cellule arrête alors de proliférer mais reste métaboliquement active c'est ce que l'on appelle l'état de sénescence¹⁷⁵. Dans d'autres cas, l'entrée en sénescence peut s'activer suite à des dommages de l'ADN induits par des espèces réactives de l'oxygène ou par l'activation de certains oncogènes^{298,299}. En dehors de l'absence de réplication, il existe de nombreuses modifications phénotypiques liées à la sénescence. Bien que ces modifications soient pour la plupart propre à chaque type cellulaire, on trouve de nombreux points communs comme l'augmentation des sécrétions de cytokines pro-inflammatoires, une surexpression des ligands des cellules immunitaires, l'augmentation des signaux de survie ou encore l'apparition d'une activité bêta-galactosidase^{172,298-300}. Il est donc clair que la sénescence est un phénomène plus complexe que le simple vieillissement au sens commun du terme. Ainsi l'apparition d'une sénescence au niveau d'un organisme peut être indépendante du concept d'âge et certains individus d'âge avancé peuvent ne pas présenter de signes liés au vieillissement biologique ou à la sénescence. Concernant le tissu adipeux, l'étude de sa sénescence est très récente mais de nombreux résultats semblent indiquer un phénotype particulier et propre à ce tissu ayant potentiellement un impact sur l'organisme entier. Les causes de la sénescence du tissu adipeux sont peu connues à l'heure actuelle. Néanmoins deux mécanismes peuvent à ce jour être proposés.

Tout d'abord, il a été montré que l'accumulation de dommages oxydatifs au niveau de l'ADN ou la réduction des télomères activaient les voies dépendantes de p53. Cette activation de p53 débouche ainsi sur le changement de phénotype des adipocytes avec l'apparition d'une résistance à l'insuline ainsi que d'une modification des sécrétions et du métabolisme avec une augmentation de sécrétion de chimiokines comme CCL2 et CCL9 ainsi qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de la lipolyse.^{175,301,302} Il est à noter que bien que la question de la sénescence ne soit pas directement évoquée dans cet article, une activation de p53, en particulier suite à des dommages chroniques à l'ADN, est un élément majeur influant sur l'entrée des cellules en sénescence³⁰³. Il est aussi montré, que cet effet est induit par la réduction de taille des télomères, un événement capable de provoquer la sénescence

cellulaire³⁰³. Ces mécanismes pourraient donc être proposés afin d'expliquer l'entrée en sénescence des adipocytes suite à ces événements. Par ailleurs, cet effet étant induit et renforcé par l'obésité³⁰⁴, ces études soulèvent la question du lien entre obésité, vieillissement et sénescence.

Plus récemment la Sirtuin 1 (encodée par le gène SIRT1), une désacétylase dépendante du NADP, a été mise en évidence comme une enzyme majeure impliquée dans le contrôle du vieillissement et de la sénescence³⁰⁵. La Sirtuin 1 est en temps normal une protéine anti-vieillessement qui va permettre d'augmenter la longévité d'un organisme et d'améliorer la fonction de certains organes comme le cerveau, le foie, le pancréas mais aussi et surtout le TA blanc. Dans ce dernier, la Sirtuin 1 va favoriser la lipolyse, la sensibilité à l'insuline et l'activité mitochondriale, tout en limitant la lipogenèse, l'inflammation, la différenciation adipocytaire et l'entrée en sénescence. Cet effet est en particulier dépendant de l'activation de PGC-1 α et de l'inhibition des activités de PPAR γ , et NF- κ B³⁰⁶ (Figure 19). Dans certaines situations pathologiques (régime trop riche en lipides, stress oxydatif important ...) ^{306,307}, la Sirtuin 1 va être phosphorylée par JNK-1 puis dégradée par le protéasome³⁰⁸. La perte des fonctions de la Sirtuin 1 va ainsi aboutir au développement de nouvelles pathologies ainsi qu'à un vieillissement biologique et une sénescence des différents tissus. Il est à noter que l'effet de la Sirtuin 1 est intimement lié à l'état énergétique du tissu adipeux. En effet, l'obésité³⁰⁷ diminue l'activité de la Sirtuin 1 alors que la restriction calorique l'augmente³⁰⁹. La question se pose donc à nouveau de la place de la sénescence dans l'obésité et du rôle protecteur d'une restriction calorique faible contre cette pathologie.

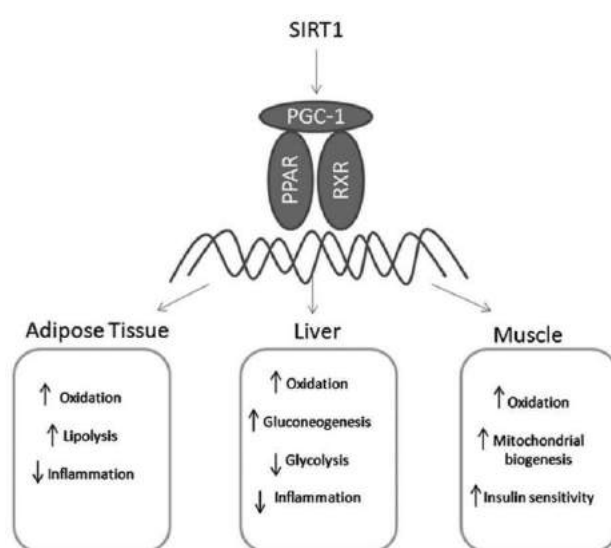


Figure 19 : Effet de Sirt1 sur le tissu adipeux. D'après Fuenres E. *et al*, 2013, molecular medicine report

2. Les effets sur les différents tissus adipeux

Tout comme dans l'obésité, le vieillissement du tissu adipeux associe à la fois des modifications morphologiques et sécrétoires des tissus adipeux.

Du point de vue de la morphologie et de la répartition des dépôts adipeux blancs, on observe globalement une diminution des dépôts sous-cutanés et une augmentation des dépôts viscéraux. Concernant les différents types de tissus adipeux, on observe une perte du TA brun²⁸⁰ avec l'âge ainsi qu'une diminution des dépôts beiges, en particulier dans le tissu sous-cutané³¹⁰. Il en résulte donc une perte globale des fonctions de thermogenèse associée à un déséquilibre énergétique. Au niveau de l'adipocyte blanc, tout comme dans l'obésité, on observe une hypertrophie (augmentation de la taille de la gouttelette) et une hyperplasie (augmentation du nombre d'adipocytes au sein du tissu)^{175,298}.

Le TAPP réagit lui aussi au vieillissement puisque le volume des dépôts de TAPP est fortement corrélé à l'âge du patient. On assiste donc à une expansion du TAPP avec le vieillissement du patient^{235,236}. Ce phénomène se retrouve aussi associé au lien entre âge et cancer de la prostate que nous décrirons dans une prochaine partie.

Les adipocytes médullaires suivent les mêmes modifications morphologiques que les adipocytes blancs et on observe une forte augmentation de la masse adipeuse médullaire³¹¹. On voit alors apparaître chez l'individu âgé un envahissement médullaire par le tissu adipeux ainsi qu'une dégradation de la matrice osseuse et l'apparition d'ostéoporose^{11,266,311}.

Concernant les modifications phénotypiques et sécrétoires, on retrouve un état inflammatoire du tissu adipeux mais avec une différence majeure. Les adipocytes sécrètent, dans ce cas, de plus grandes quantités de COX-2, d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- α . Contrairement à l'obésité où l'inflammation vient en grande partie de la suractivation des macrophages présents au sein du tissu¹⁷⁴, ces sécrétions sont capables d'augmenter le recrutement de cellules immunitaires mais aussi leur activation vers un état inflammatoire latent^{300,312}. Bien que le mécanisme reste mal connu, cet état pro-inflammatoire des adipocytes semble particulièrement lié à l'expression de certains récepteurs comme le récepteur à la Ghreline¹⁷².

La senescence du tissu adipeux a, par ailleurs, de nombreuses implications dans d'autres pathologies. Il semblerait qu'elle soit corrélée à l'apparition du diabète de type 2, de l'obésité et de certains cancers. Nous décrirons le lien entre cancer et tissu adipeux sénescant au cours d'une prochaine partie^{171,298,313}.

Au cours de cette partie nous avons pu voir que le tissu adipeux est un organe complexe, avec de nombreuses spécificités et une grande variabilité. Il est aussi capable d'exercer de nombreuses fonctions aussi bien métaboliques que sécrétoires. Afin d'étudier le lien qui existe entre le tissu adipeux et le cancer de la prostate et l'influence que ce tissu peut avoir sur les capacités invasives d'une tumeur. Dans notre prochaine partie, nous nous intéresserons donc au microenvironnement tumoral et plus précisément au rôle que peut avoir le tissu adipeux dans cet environnement.

PARTIE III : Microenvironnement et progression tumorale

I. Généralités sur le microenvironnement :

Au cours des dernières années, il apparaît de plus en plus clairement que le cancer est une maladie complexe ne se limitant pas uniquement aux cellules tumorales mais pouvant aussi modifier les cellules à proximité de la tumeur. On parle alors de maladie tissulaire. Il a été montré que le micro-environnement tumoral joue un rôle majeur dans le développement et les différentes étapes de la maladie cancéreuse¹. Ces cellules du microenvironnement peuvent induire des modifications dans les cellules tumorales et inversement peuvent elles-mêmes subir l'influence de ces dernières. On définit à l'heure actuelle trois grands types de composants du microenvironnement tumoral impliqués dans le dialogue avec les cellules tumorales ^{1,314,315} (Figure 20) :

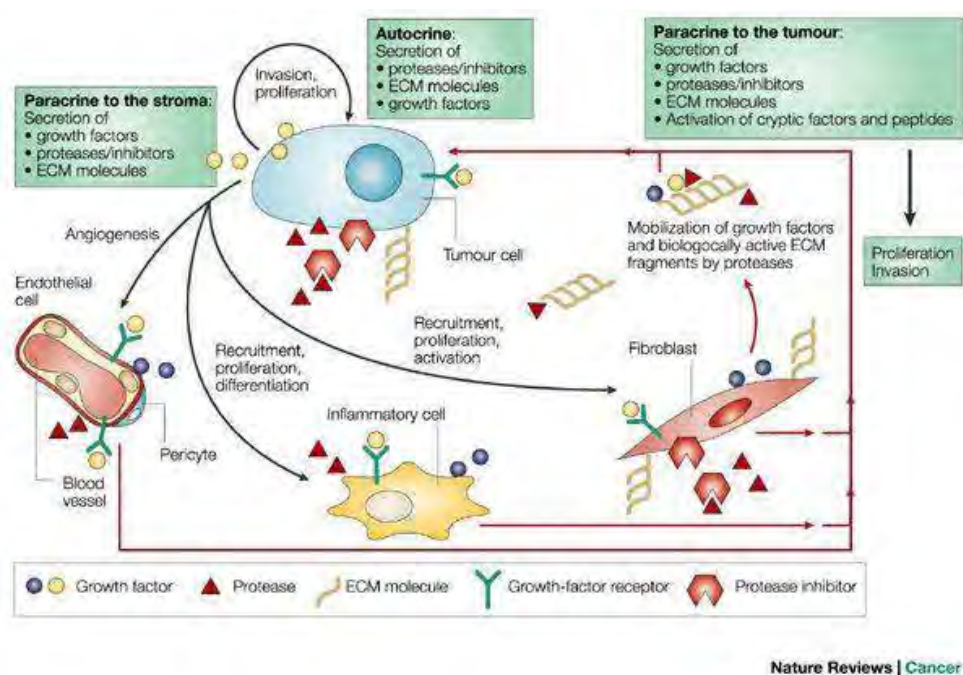


Figure 20 : la complexité du microenvironnement tumoral. Mueller M *et al*, Nature Review of Cancer, 2014

- En premier lieu, on retrouve les cellules d'origine mésenchymateuse^{1,315}. Cet ensemble regroupe des cellules variées aux fonctions très différentes, parmi lesquelles on retrouve les fibroblastes, les myofibroblastes, les CSM³¹⁶, les adipocytes^{3,4} ou encore les cellules endothéliales³¹⁷. Les fibroblastes, myofibroblastes et CSM sont capables de promouvoir la croissance tumorale en interagissant avec les cellules tumorales ou encore en favorisant l'apparition de cellules souches cancéreuses (CSC)^{315,316}. Les cellules

endothéliales sont essentielles afin de permettre la vascularisation tumorale et la néoangiogenèse qui sont nécessaires aussi bien au développement local de la tumeur qu'à sa dissémination métastatique^{317,318}. Les cellules tumorales peuvent agir sur ces cellules de différentes façons. Elles peuvent ainsi favoriser leur recrutement et leur prolifération au niveau du site tumoral, comme c'est le cas pour les fibroblastes³¹⁶, ou encore activer ces cellules en induisant un changement phénotypique, ce qui est le cas pour la plupart des cellules mésenchymateuses³. Les cellules tumorales jouent aussi un rôle majeur dans l'activation des cellules endothéliales et dans l'activation des mécanismes de l'angiogenèse³¹⁸.

- On trouve ensuite les cellules d'origine hématopoïétique. On y retrouve majoritairement des cellules de l'immunité avec les cellules lymphoïdes³¹⁹⁻³²² comme les lymphocytes T, B et NK, ainsi que les cellules d'origine myéloïdes comme les macrophages, les polynucléaires ou les MDSC³²³. Le rôle de ces cellules est assez ambivalent puisqu'il peut être aussi bien anti-tumoral (avec par exemple les lymphocytes T cytotoxiques, NK ou les macrophages M1) que pro-tumoral (avec les lymphocytes T régulateurs ou les macrophages M2). Cette ambivalence de l'environnement immunitaire de la tumeur est par ailleurs particulièrement étudiée afin de développer de nouvelles immunothérapies pour influencer cette balance vers une fonction anti-tumorale^{322,324}. Les cellules tumorales vont agir aussi bien sur le recrutement que sur la prolifération et l'activation des cellules immunitaires au niveau du site tumoral.
- Enfin il existe des composants non-cellulaires au sein du micro-environnement. Majoritairement, il s'agit des composants de la matrice extra-cellulaire (MEC) (protéines, glycanes, protéoglycanes ...)³²⁵. On peut séparer deux sous-types de MEC, la membrane basale (riche en collagène de type IV, en laminine et fibronectine) et la matrice interstitielle (riche en collagène fibrillaire, en protéoglycanes et en glycoprotéines)^{315,326}. Les deux matrices, bien que de compositions différentes, possèdent des rôles à la fois fonctionnels et structurels. Elles peuvent ainsi participer à l'architecture de la tumeur et à la formation des niches tumorales, favorisant ainsi la progression tumorale et l'angiogenèse. La dégradation de cette matrice par les sécrétions cellulaires va aussi permettre de libérer des facteurs favorisant le développement de la tumeur. Au niveau de la matrice cellulaire, les cellules tumorales vont avoir une action locale induisant la dégradation de la MEC. Cette action de dégradation peut venir soit de la sécrétion directe d'enzymes de dégradation par les cellules tumorales, soit de la sécrétion de ces enzymes par des cellules mésenchymateuses du microenvironnement

suite à leur activation par les cellules tumorales. La dégradation de la MEC va permettre la libération de facteurs de croissance et une modification de sa structure favorisant l'invasion cellulaire.

II. Les adipocytes dans le microenvironnement

Parmi les cellules d'origines mésenchymateuses, les adipocytes ont été récemment identifiés comme des acteurs majeurs du microenvironnement tumoral. Longtemps négligées et considérées comme des cellules inertes avec peu d'implications en dehors d'un rôle structurel, ces cellules sont en fait capables d'interagir par différents mécanismes avec les cellules tumorales³²⁷. Par ailleurs, le tissu adipeux va pouvoir agir à différentes étapes de la dissémination puisqu'on retrouve des dépôts adipeux aussi bien au niveau des sites primaires (dépôts périprostatique et cancer de la prostate⁸, tissu adipeux mammaire et cancer du sein^{3,328}, dépôts péricolique et cancer du côlon^{329,330}), qu'au niveau des sites métastatiques (moelle osseuse et métastase osseuse, tissu adipeux omentale et métastase viscérales^{325,331}) (Figure 21).

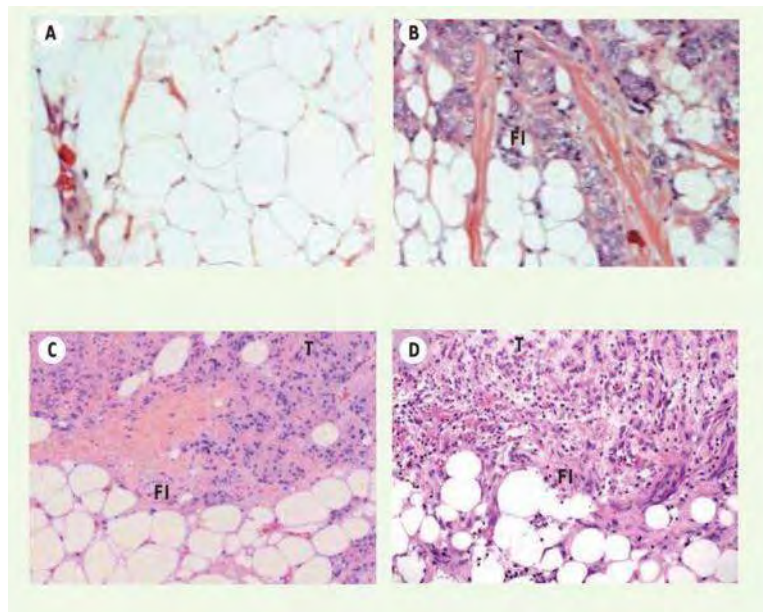


Figure 21 : La proximité entre tissu adipeux et cellules tumorales dans les cancers invasifs. Coupe histologique d'un tissu adipeux mammaire normal (A), d'un carcinome mammaire (B), prostatique (C) et d'un mélanome (D) après coloration à l'hématoxyline-éosine. Les adipocytes localisés au front invasif (FI) de la tumeur (T) ont une taille et un contenu lipidique diminués par rapport à ceux du tissu adipeux normal. D'après Laurent *et al*, Médecine science (Paris),2014

D'autre part, l'obésité, un état pathologique dû à une augmentation de la quantité de tissu adipeux, est fortement liée au développement de certains cancer, soulignant là aussi, le lien entre tissu adipeux et cancer^{14,332}. Bien que les mécanismes liés à ce phénomène ne soient pas encore totalement connus, il existe des indices épidémiologiques³³³. Ainsi, l'obésité semble

augmenter la survenue des cancers du sein³³⁴, du pancréas³³⁵ et du côlon³³⁶ mais semble aussi corrélé à une agressivité plus élevée avec un moins bon pronostic. Dans le cas particulier du cancer de la prostate, l'obésité ne semble pas avoir d'influence sur l'incidence du cancer mais semble en modifier son pronostic¹⁴. En effet, les patients obèses ne développent pas plus de cancer que les autres, mais les cancers qu'ils développent sont plus agressifs et prompts à disséminer et sont donc de plus mauvais pronostic.

A. Les adipocytes associés au cancer

Le tissu adipeux est ainsi présent dans le microenvironnement de nombreux cancers. On pense bien entendu en premier lieu au cancer du sein où la tumeur se développe dans la glande mammaire entourée par le tissu adipeux environnant³. Dans ce cas, les cellules tumorales restent séparées des adipocytes lors du développement *in situ*, mais envahissent ce tissu une fois la membrane basale franchie. D'autres cancers peuvent aussi entrer en contact avec des tissus adipeux à différentes étapes de leur progression. C'est le cas du cancer de la prostate (tissu adipeux périprostatique)^{9,337}, du cancer colorectal (tissu adipeux péricolique et périrectal)^{329,330} et du mélanome (tissu adipeux sous-cutané)³³⁸⁻³⁴⁰. Dans ces cas, on trouve souvent au front invasif des tumeurs localement avancées, un contact direct entre cellules tumorales et adipocytes du tissu adipeux voisin^{3,9}. Néanmoins, ce n'est pas le seul moment ni le seul endroit où les cellules tumorales peuvent entrer en contact avec le tissu adipeux. En effet, au cours de la métastase du mélanome, les cellules tumorales peuvent redisséminer au sein de la peau vers un autre site et ainsi rentrer en contact avec une nouvelle zone du tissu hypodermique³⁴¹. Mais surtout, les cellules tumorales métastasant à l'os (cancer du sein, de la prostate, du poumon) ou se développant au sein de la moelle osseuse (hémopathies malignes comme le myélome multiple) vont être en contact avec les adipocytes médullaires¹⁰. Comme expliqué précédemment, les adipocytes médullaires sont mal connus et font à ce jour encore l'objet de nombreuses recherches, y compris dans leur lien potentiel avec les pathologies cancéreuses^{243,244}.

Par ailleurs, notre équipe a fait partie des premières à montrer qu'en contact avec les cellules tumorales le phénotype des adipocytes peut se trouver modifié³. Notre équipe a ainsi nommé ce nouveau phénotype CAA pour adipocytes associés au cancer³. Il se caractérise par un aspect de « dédifférenciation » avec une perte des marqueurs des adipocytes matures (leptine, adiponectine, FABP4, LHS) et une lipolyse aboutissant à une diminution voire perte de la gouttelette lipidique³. Leurs sécrétions sont également modifiées avec une augmentation de la

sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL1 β , TNF α) mais aussi de protéines de remodelage de la matrice telles que la MMP11^{3,342}. Ces CAAs vont ainsi être capable d'augmenter les capacités invasives et migratoires des cellules tumorales et de faciliter leur transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un mécanisme essentiel dans la progression et la dissémination du cancer³⁴³. Même s'ils ont été initialement identifiés dans le cancer du sein, les CAA se retrouvent aussi dans d'autres cancers et sont visibles dans des études histologiques. Ils ont ainsi été décrits dans le cancer de la prostate invasif³³⁷, de l'ovaire⁶, du colon³⁴⁴ et dans le mélanome³⁴⁵ (Figure 22).

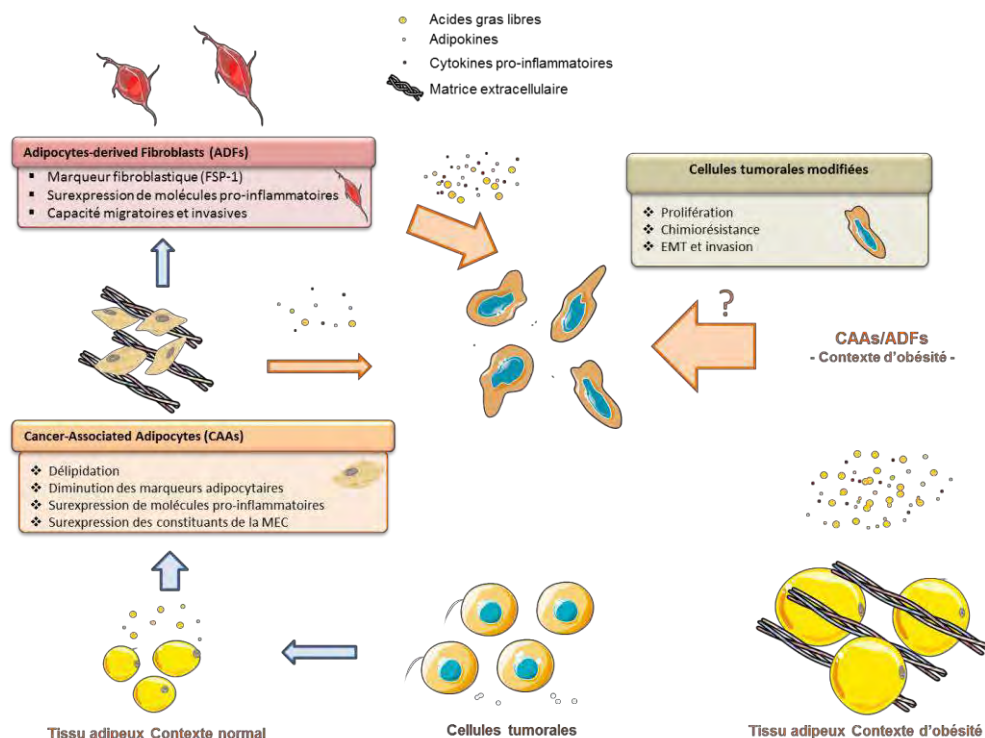


Figure 22 : Place et fonctions des adipocytes dans le microenvironnement tumoral. D'après Laurent *et al*, Medecine science (Paris), 2015

Lorsque l'exposition des adipocytes et des CAAs aux cellules tumorales se prolonge, nous avons pu mettre en évidence que, dans le cancer du sein, un nouveau phénotype apparaissait. Les adipocytes mammaires vont ainsi acquérir un phénotype plus fibroblastique aussi bien sur le plan morphologique que par l'expression de certains facteurs comme FSP-1. Nous avons donc nommé cette nouvelle population de cellules ADFs (pour Adipocyte-Derived Fibroblasts)⁴. Leurs fonctions et sécrétions sont aussi modifiées dans ce sens avec une production accrue de fibronectine et de collagène de type I et une augmentation de leurs capacités migratoires. Cette réorientation des adipocytes matures en ADFs est associée à la

réactivation de la voie Wnt/ β -caténine en réponse à Wnt3a sécrétée par les cellules tumorales⁴. Tout comme les CAAs, les ADFs vont être capables d'influencer l'agressivité et les capacités migratoires et invasives des cellules tumorales. Ils sont aussi retrouvés dans des échantillons cliniques de cancer du sein⁴ (Figure 22).

B. Effet des adipocytes sur la progression locale : survie et prolifération cellulaire

1. Les facteurs solubles

Dans un premier temps, les adipocytes vont agir sur le développement des tumeurs localisées en favorisant la prolifération et la survie des cellules tumorales. Cet effet peut être médié par plusieurs mécanismes et en particulier par les facteurs solubles sécrétés par les adipocytes. Ces facteurs vont ainsi pouvoir agir aussi bien de façon paracrine, à proximité de la tumeur, que de manière endocrine, à distance³⁴⁶⁻³⁴⁹.

La leptine, une cytokine sécrétée principalement par les adipocytes, possède un effet pro-tumoral bien établi dans différents cancers comme le sein, le poumon, l'ovaire ou le cancer colorectal³⁵⁰⁻³⁵². Cet effet est dû à l'activation du récepteur à la leptine présent à la surface des cellules tumorales et débouchant sur l'activation des voies PI3K (PhosphoInositol-3-Kinase), MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et JAK-2/STAT-3 (Janus tyrosine Kinase-2/Signal Transducer and Activators of Transcription 3). Ces voies vont alors favoriser la prolifération des cellules tumorales³⁵³. La leptine est aussi capable d'agir sur l'angiogenèse et d'induire une meilleure néovascularisation des tumeurs et donc un meilleur développement³⁵².

A l'opposé l'adiponectine possède plutôt un rôle anti-tumoral. On retrouve ainsi un faible niveau d'adiponectine dans le sérum de patients atteints de certains cancers comme le cancer du sein³⁵⁴. Elle agit par l'intermédiaire du récepteur AdipoR1 présent à la surface des cellules tumorales et va induire l'activation des voies dépendantes de l'AMPK, c-Jun et des MAPK^{355,356}. Cette adipokine est alors capable d'induire l'apoptose dans les cellules tumorales diminuant la progression tumorale mais aussi dans les cellules endothéliales diminuant ainsi l'angiogenèse. Elle peut aussi augmenter la sensibilité à l'insuline et diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Un contexte inflammatoire chronique ainsi que la résistance à l'insuline sont des états pouvant aussi permettre l'apparition de nouveaux cancers³⁵⁶.

De nombreuses autres adipokines sont impliquées dans la prolifération des cellules tumorales. On pourrait ainsi citer l'IGF-1 dont un haut taux sanguin augmente le risque d'apparition de certains cancers (cancer du sein, du colon, du poumon ou de la prostate)³⁵⁷⁻³⁶⁰. Cette molécule sécrétée par les adipocytes peut ainsi interagir avec les cellules tumorales grâce au récepteur IGF-1R et favoriser leur prolifération et leur résistance à l'apoptose par activation des voies PI3-K/Akt et MAP-K^{357,361}. On peut aussi noter le rôle de l'HGF d'origine adipocytaire dans la prolifération des cancers du sein et de l'ovaire^{362,363} ou encore de la résistine dans les cancers du sein et de la prostate^{364,365}.

Le tissu adipeux peut aussi influencer la croissance tumorale en modifiant la sécrétion de différentes hormones. Dans le cas des hormones oestrogéniques, les adipocytes possèdent une enzyme aromatase. Cette enzyme, aussi appelée cytochrome P19, est capable de catalyser la transformation des androgènes en oestrogènes par phénolisation du cycle A des hormones androgéniques. Les adipocytes peuvent donc produire naturellement des œstrogènes^{366,367}. Cette sécrétion directe des adipocytes va fortement influencer le développement des cellules tumorales mammaires sensibles à cette hormone qui stimule leur prolifération par l'intermédiaire des récepteurs aux œstrogènes³⁶⁸. L'importance de ce phénomène se voit surtout au moment de la ménopause où le tissu adipeux devient la principale source de production d'œstrogènes dans le corps de la patiente et favorise le développement de tumeurs mammaires³⁶⁶. On observe aussi un effet important chez les patientes obèses, où l'expression de l'aromatase du tissu adipeux est globalement augmentée et accroît le risque de cancer du sein^{332,369}. Les adipocytes peuvent aussi induire une modification la sécrétion d'autres hormones comme l'insuline. Dans ce cas, c'est la résistance des adipocytes à l'insuline et la situation pathologique associée qui vont aboutir à une augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas. Il en résulte une hyperactivation de l'axe IGF-1 qui a une activité pro-mitogène favorisant la prolifération des cellules tumorales^{361,370,371}.

Dans le cas précis du cancer de la prostate, on retrouve des études témoignant de l'action des adipokines du TAPP sur les cellules tumorales prostatiques en influant sur la prolifération et la motilité des cellules par l'intermédiaire de la leptine et de l'IL-6 et une action anti-tumorale de l'adiponectine^{7,8,163}.

En cas d'obésité la plupart des effets décrits précédemment sont amplifiés. Pour les adipokines on observe une augmentation de la sécrétion de leptine^{350,372} et une diminution de la sécrétion d'adiponectine³⁷³, renforçant la croissance tumorale et la néoangiogenèse. Les sécrétions d'autres adipokines comme l'IGF-1³⁷⁴, l'HGF³⁷⁵ ou la résistine³⁷⁶ sont aussi amplifiées dans

l'obésité, renforçant ainsi les mécanismes qui leurs sont associés. Concernant les hormones, on observe une augmentation de l'activité aromatasase et donc de la sécrétion d'œstrogènes^{377,378}. La résistance des adipocytes à l'insuline étant renforcée dans le contexte d'obésité, on observe une augmentation de l'insulinémie et des effets associés³⁷⁰.

Les adipocytes peuvent aussi sécréter des cytokines pro-inflammatoires parmi lesquelles on trouve majoritairement l'IL-6, le TNF- α et PAI-1^{379,380}. Ces sécrétions vont induire un état d'inflammation chronique qui va favoriser un remaniement de la matrice tissulaire³⁸¹, une augmentation de l'angiogénèse^{381,382} et un recrutement local de macrophages et d'autres cellules immunitaires^{379,383}. Ces effets vont permettre de favoriser le développement de la tumeur mais aussi son agressivité. Ces cytokines peuvent aussi avoir des effets directs sur la croissance tumorale comme par exemple l'IL-6 qui peut être sécrétée par les CAA et qui semble responsable de l'effet pro-invasif de ces derniers sur les cellules tumorales mammaires³. Ces cytokines ont donc un effet majeur dans le développement du cancer et de la maladie tissulaire. Leur sécrétion est elle aussi renforcée dans l'obésité aboutissant à une plus forte inflammation du tissu adipeux favorisant le développement des tumeurs environnantes³⁸⁴. Par ailleurs, il existe aussi une action indirecte des adipocytes et des cytokines pro-inflammatoires sur la sécrétion d'œstrogène chez les patients obèse. Cette action passe par la sécrétion des adipokines inflammatoires comme l'IL-1 β ³⁸⁵. Ces cytokines sont responsables du recrutement de macrophages M1 dans le tissu adipeux. Il va alors se former des crown-like structures (couronne de macrophages entourant un adipocyte mort) dans lesquelles les macrophages vont être exposés à des acides gras libres. Il va en résulter une sécrétion de médiateurs inflammatoires qui vont induire l'expression de l'aromatasase dans les cellules du tissu adipeux et les cellules tumorales mammaires^{347,386}. Cette sécrétion accrue d'œstrogène va donc là aussi promouvoir le développement des cancers hormonodépendant. Concernant le vieillissement du tissu adipeux, peu de données rapportent une influence sur le développement du cancer en dehors d'études épidémiologiques. Il n'existe donc pas d'études moléculaires précises montrant le lien entre le vieillissement du microenvironnement adipeux et le développement de la tumeur. Néanmoins, les modifications des sécrétions d'adipokines indiquent qu'en cas de vieillissement on observe une augmentation de la leptine et de cytokines pro-inflammatoires (et de l'inflammation du tissu adipeux de manière générale), ainsi qu'une diminution de l'adiponectine^{174,299}. On peut donc supposer qu'il existe un renforcement de la croissance tumorale par ces mêmes mécanismes.

2. Le transfert de lipides :

On peut aussi noter l'identification récente d'un nouveau mécanisme agissant par transfert de lipides depuis les adipocytes vers les cellules tumorales. Les adipocytes vont ainsi libérer des acides gras au cours de leur transformation en CAA³ qui vont être captés et utilisés dans les cellules tumorales par des mécanismes de β -oxydation^{6,328}. Cette activité des cellules tumorales est issue d'un changement métabolique au sein des cellules tumorales puisque celles-ci utilisent plutôt des voies de glycolyse à travers l'effet Warburg^{6,328}. Ce mécanisme de transfert a pour la première fois été montré dans le cancer de l'ovaire avec l'étude de Niemann *et al* qui suggère l'existence d'un transfert de lipides depuis les adipocytes vers les cellules tumorales ovariennes médié par FABP4 et aboutissant à une augmentation des capacités prolifératives des cellules tumorales⁶. Il a été suggéré que cet effet serait dépendant de l'ATP produite au cours de la β -oxydation. Cependant, aucune preuve réelle de production d'ATP n'a été mise en avant à l'heure actuelle et l'origine de cet effet sur la prolifération reste donc hypothétique. Par ailleurs, certains travaux ont mis en avant d'autres rôles du transfert de lipides, comme l'étude menée récemment par notre équipe qui a pu montrer que dans le cancer du sein, le transfert de lipides va favoriser les capacités invasives des cellules plutôt que leur prolifération³²⁸. Il pourrait donc exister des variations d'effet de ce mécanisme suivant le type cellulaire étudié et l'origine de la tumeur. Les fonctions invasives influant plus sur la dissémination locale et à distance que sur la croissance tumorale, ces effets du transfert de lipides seront décrits dans la partie suivante. De nombreuses zones d'ombres sont donc encore présentes à ce jour et il est difficile de savoir si ces différents mécanismes liés au transfert de lipides sont concomitants ou bien spécifiques à des modèles ou à une étape de la maladie tumorale. Bien que cela n'ait pas encore été démontré avec certitude, il est suggéré que l'obésité peut influencer et renforcer le transfert de lipides et donc les différents mécanismes pro-tumoraux associés.^{13,328} A ce jour, aucune donnée spécifique ne relie le transfert de lipide, le cancer et le vieillissement du tissu adipeux.

C. Effet des adipocytes sur la dissémination locale et à distance

1. Les MMP et le remaniement de l'ECM :

Afin que les cellules tumorales puissent migrer au sein du stroma qui les entoure, il est nécessaire qu'il soit dégradé. Cette action s'effectue par une grande famille d'enzyme : les métalloprotéases de la matrice (MMP). Les MMP jouent donc un rôle essentiel aussi bien au niveau la dissémination au sein d'un tissu que dans la nidation dans un tissu³⁸⁷⁻³⁸⁹. Les

adipocytes sont capables de sécréter de nombreuses MMP et de participer ainsi à la dissémination cancéreuse, comme c'est par exemple le cas pour la MMP11 dans le cancer du sein^{390,391} ou les MMP2 et 9 sécrétées par le TAPP et influençant la dissémination locale du cancer de la prostate⁸. Dans un contexte d'obésité cette sécrétion des MMP peut être augmentée, renforçant ainsi la migration des cellules tumorales, comme c'est le cas avec les MMP2 et 9 issues du TAPP¹⁶³. Ces enzymes vont permettre de modifier la structure et la ductilité de l'ECM facilitant la migration et l'invasion des cellules tumorales au sein de ce tissu. Par ailleurs, cette dégradation de la matrice va permettre la libération, l'exposition ou le clivage de nombreux facteurs qu'elle contient et pouvant favoriser la progression et l'invasion tumorales. On pourrait ainsi citer la MMP11, dont un des substrats est le collagène VI, un facteur favorisant l'invasion des cellules tumorales mammaires^{387,390}.

D'un point de vue structurelle la matrice extracellulaire du tissu adipeux obèse se retrouve aussi modifiée par un état de fibrose qui va favoriser l'inflammation locale et donc le développement de la tumeur^{392,393}. On note aussi en cas d'obésité une augmentation de la vascularisation du tissu adipeux mais aussi paradoxalement l'apparition d'hypoxie^{382,394}. Ces deux derniers facteurs vont permettre de développer un environnement qui bien que mieux vascularisé présente aussi une forte inflammation associée à un stress oxydatif. Cette niche initiale sera ainsi adaptée au développement de nouvelles tumeurs agressives. Dans le cas du vieillissement du tissu adipeux, peu de données sont connues mais on sait que, tout comme dans l'obésité, ce tissu est beaucoup plus inflammatoire et fibrotique qu'un tissu normal²⁹⁸. On peut donc supposer que le tissu adipeux sénescant pourrait avoir un rôle semblable au tissu adipeux obèse dans la promotion de l'agressivité tumorale et de la dissémination.

2. Le transfert de lipides dans la métastase

Les échanges métaboliques ne jouent pas qu'un rôle au niveau local mais ont aussi une importance au niveau métastatique. Tout comme au niveau local, les adipocytes agissent par transfert de lipides vers les cellules tumorales et modifient le métabolisme des cellules tumorales. L'effet observé sur la prolifération dans les tumeurs de l'ovaire semble par ailleurs agir sur la dissémination à distance des tumeurs, puisqu'*in vivo* l'inhibition du transfert de lipides, par inhibition de FABP4, diminue le taux de métastases⁶. Par ailleurs, nous avons récemment montré que ce remaniement métabolique dans le cas du cancer du sein pouvait favoriser les capacités invasives des cellules tumorales par apparition de cycles futiles de β -oxydation consommant ces lipides³²⁸. Ils peuvent aussi agir au niveau du site métastatique en

favorisant la nidation par renforcement de l'invasion osseuse et de la prolifération des cellules tumorales après dissémination, comme c'est le cas dans le cancer de la prostate où un transfert de lipide semble s'effectuer depuis les adipocytes médullaires selon un mécanisme dépendant de FABP4¹³. Cet effet sur la prolifération semble être relié à un stress oxydatif médié par un effet Warburg renforce suite à l'activation de HIF- α ¹². Il est à noter que cet effet n'a été montré qu'*in vitro* dans des études sur la métastase osseuse du cancer de la prostate. Elles font cependant partie des rares études portant sur un rôle direct des adipocytes dans le développement des tumeurs solides au niveau du site métastatique osseux. Dans le cadre de la dissémination métastatique, il a pu être prouvé que l'obésité pouvait amplifier ces phénomènes et favoriser le développement de métastases.^{13,328} A ce jour, aucune donnée spécifique ne relie le transfert de lipides, le cancer et le vieillissement du tissu adipeux.

3. Les chimiokines :

Les chimiokines sont elles aussi des molécules jouant un rôle essentiel dans la dissémination du cancer que celle-ci soit locale ou à distance. Il s'agit de molécules capables de guider la dissémination des cellules tumorales invasives. Elles sont donc nécessaires car elles permettent de diriger la migration des cellules tumorales invasives et de les guider vers de nouveaux sites de dissémination. Bien que le lien entre progression tumorale et sécrétion de chimiokine par adipocytes n'ait fait l'objet que de peu d'études, il est cependant clair que ces cellules sont capables de sécréter des chimiokines normalement impliquées dans la chimioattraction des cellules tumorales telles que CCL2, CXCL12 et CCL5^{395,396}. Concernant CCL5, la sécrétion de cette chimiokine a été montrée comme ayant un effet pro-invasif majeur sur les cellules tumorales mammaires triples négatives que ça soit par action directe (EMT, migration dirigée) ou indirecte (remaniement du micro-environnement, inflammation et recrutement de cellules immunitaires)³⁹⁷⁻³⁹⁹. D'autres études ont suggéré un effet chimioattractant du tissu adipeux omental par MCP-1⁶. Néanmoins, aucune étude n'a pu lier ce phénomène de chimioattraction induite par les adipocytes dans la dissémination osseuse. Mes travaux de thèse ont ainsi permis de mettre en avant un rôle de l'axe CCR3/CCL7 à la fois dans la dissémination locale grâce au TAPP mais aussi dans la dissémination métastatique osseuse grâce aux adipocytes médullaires.

Dans un contexte d'obésité, la sécrétion des chimiokines peut être augmentée, comme par exemple pour les chimiokines CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, et CCL11⁴⁰⁰. On peut donc supposer qu'il existe une amplification des phénomènes associés. La même supposition pourrait-être faite dans le vieillissement puisque le tissu adipeux sénescence subit lui aussi des

modifications de son profil de sécrétion de chimiokine, qui peuvent ainsi modifier la dissémination tumorale²⁹⁸. Le mécanisme d'action des chimiokines étant complexe et particulièrement important pour la suite de notre étude, l'implication des chimiokines dans les différents cancers, dont le cancer la prostate, fera l'objet de la prochaine partie.

4. Les exosomes

Enfin, beaucoup plus récemment, il a été montré un rôle potentiel des exosomes d'adipocytes dans la dissémination des cancers. Les exosomes sont de petites vésicules extracellulaires de 50 nm à 100 nm et qui peuvent agir à distance sur d'autres cellules par transfert de matériel protéique, lipidique ou nucléique. Dans une étude menée par notre équipe, il a pu être montré que les exosomes d'adipocytes sont capables de modifier à distance les cellules tumorales de mélanomes afin d'augmenter leur capacité invasive et leur potentiel métastatique³³⁹. Ces exosomes d'adipocytes présentent en effet la particularité de transporter des molécules impliquées dans la β -oxydation (spécificité uniquement retrouvée dans les exosomes issus de ces cellules). L'absorption de ces exosomes par des cellules tumorales de mélanomes va induire des changements métaboliques avec une augmentation de la B-oxydation. Ces cellules vont ainsi devenir dépendantes de cette voie métabolique qui va permettre un renforcement des capacités migratoires des cellules tumorales. Cette étude a d'ailleurs pu montrer qu'il existait un effet de l'obésité renforçant les capacités pro-invasives de ce phénomène³³⁹. Il s'agit pour le moment du seul rôle connu des exosomes d'adipocytes dans la maladie tumorale. On peut néanmoins supposer qu'ils agissent aussi sur d'autres mécanismes. En effet, il a pu être montré dans des travaux portant sur des exosomes issus d'autres types cellulaires du microenvironnement que ces vésicules pouvaient agir sur les capacités invasives, prolifératives des cellules tumorales ou même sur leur capacité à éduquer à distance la niche métastatique. Il reste donc probablement beaucoup de fonctions des exosomes d'adipocytes encore inconnues dans la dissémination des différents cancers⁴⁰¹⁻⁴⁰⁴.

Comme nous avons pu le voir, le microenvironnement est un lieu d'interactions complexes entre les cellules tumorales et le stroma où elles se développent. Dans cette espace, les adipocytes jouent un rôle majeur en agissant sur de nombreuses fonctions des cellules tumorales. De nombreux mécanismes peuvent soutenir ce dialogue entre cellules tumorales et cellules stromales. Dans cette prochaine partie, nous décrirons plus en détail la place des chimiokines dans le développement et l'évolution des cancer. Ces explications permettront

d'approcher mon travail de thèse qui a porté sur l'impact des chimiokines adipocytaires sur la dissémination du cancer de la prostate.

PARTIE IV : Chimioquinas et cancer

I. Généralités :

Les chimiokines sont de petites cytokines (8 à 10 kDa) ayant un rôle dans la chimioattraction des différentes cellules du corps humain. On définit à ce jour quatre grandes familles de chimiokines classées par leur structure en N-terminal. On les discrimine ainsi par le motif comprenant les deux premières cystéines N-terminales éloignées ou non par d'autres acides aminés (désignés par la lettre X). On trouve ainsi les chimiokines C- (aussi appelées γ), CC- (aussi appelées α), CXC- (aussi appelées β) et CX3C- (aussi appelées δ)⁴⁰⁵. Initialement décrites dans le système immunitaire, ces molécules vont interagir directement avec leur récepteur associé (il existe des couples avec des chimiokines associées à des récepteurs précis). Ce récepteur est un RCPG, le plus souvent associé à une sous-unité α i de la protéine G, inhibant l'adénylate cyclase et la production d'AMPc⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. On peut néanmoins trouver des récepteurs aux chimiokines couplés à d'autres sous-unités des protéines G hétérotrimériques (G_α , G_β , et G_γ). Les sous-unités α agissent sur les voies MAPK et Rho⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. Les sous-unités G_β , et G_γ impliquent en général la voie Ras ou les phospholipases C (PLC). Ces dernières catalysent le PIP2 en deux molécules, IP3 et DAG. L'IP3 permet la libération du Ca^{2+} intracellulaire et le DAG est nécessaire à l'activation des différentes protéines kinases de type C⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. Enfin, les récepteurs aux chimiokines peuvent aussi s'homodimériser en activant ainsi la voie des Janus Kinase⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. Ces mécanismes aboutissent à différentes activités mais surtout à un remaniement du cytosquelette cellulaire permettant la migration de cellules variées. Cette migration se fait en suivant le gradient de chimiokines : plus on se rapproche des cellules sécrétrices et plus la concentration de chimiokines est élevée. Les cellules vont donc migrer des zones de faible concentration en chimiokines vers les zones de haute concentration^{408,409}. Au-delà de ce rôle canonique, il est désormais connu que certaines chimiokines jouent un rôle important dans les mécanismes de prolifération et de mort cellulaire⁴⁰⁶. (Figure 23)

II. Chimioquinas et progression tumorale :

Bien que longtemps cantonnés aux cellules immunitaires, les récepteurs aux chimiokines sont aussi retrouvés sur de nombreuses cellules dont les fibroblastes, les cellules endothéliales ou épithéliales. La présence de récepteurs aux chimiokines à la surface des cellules tumorales n'a été montrée que très récemment avec les travaux de l'équipe de Zlotnik⁴¹⁰. Les chimiokines peuvent ainsi jouer un rôle dans leur progression des cancers de différentes manières : elles

peuvent soit influencer la progression en favorisant le développement de la masse tumorale par la prolifération ou par une action sur le microenvironnement, soit permettre la dissémination à d'autres sites par la migration dirigée des cellules tumorales^{406,407} (Figure 23).

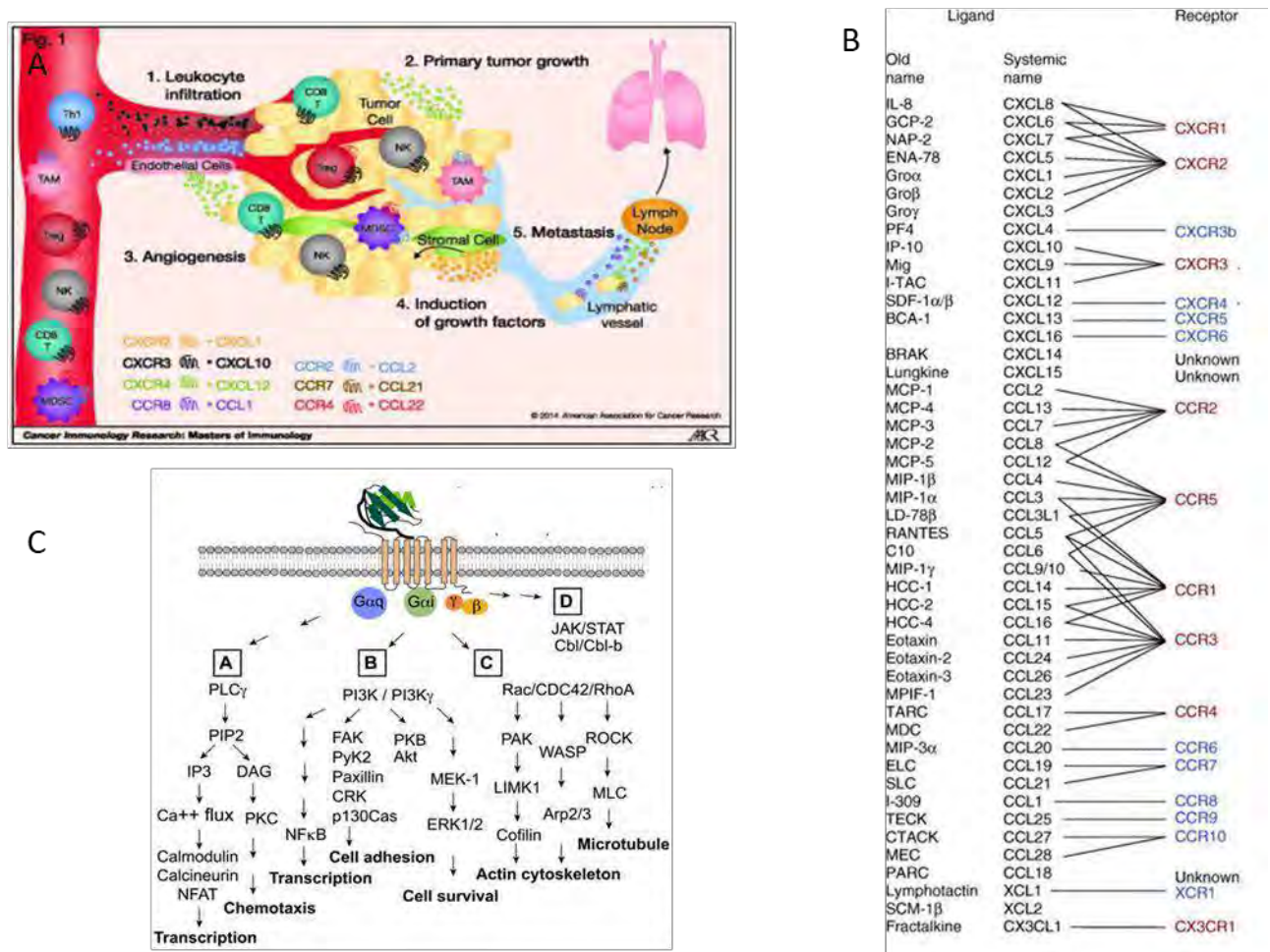


Figure 23 : Chimiokine et cancer. A) différentes fonctions des chimiokines et de leurs récepteurs dans le cancer, B) liste des différentes chimiokines et des récepteurs associés, C) signalisation dépendante des récepteurs aux chimiokines. D'après Wells T.N.C. *et al*, Trends in pharmacological science, 2006 et Wu Y. *et al*, PLOS Pathogens, 2009.

A. Chimiokine et prolifération tumorale :

On retrouve ainsi de nombreux couples chimiokines/chimiorécepteurs impliqués dans la prolifération des cellules tumorales. Néanmoins, il est intéressant de noter que les couples principalement impliqués dans ces mécanismes sont spécifiques à chaque fois et varient suivant le type de cancer. On trouve ainsi le couple CXCL12/CXCR4 impliqué dans la prolifération des cancers du sein, du poumon et de l'ovaire⁴¹¹, le couple CCL19-CCL21/CCR7⁴¹² impliqué dans les carcinomes spino-cellulaires, le couple CCL20/CCR6 dans le cancer colorectal⁴¹³, le couple CCL27/CCR10 dans le mélanome⁴¹⁴ et le couple CXCR6/CXCL16 dans le cancer de la

prostate⁴¹⁵. Dans d'autres cas, plusieurs récepteurs et plusieurs ligands peuvent être impliqués dans cette action pro-proliférative comme dans les cancers du pancréas, les cancers gastriques et le mélanome où on retrouve une action à la fois de CXCR1 et CXCR2 (deux récepteurs très proches structurellement mais d'activités et de ligands différents) qui peuvent être associés aux ligands CXCL1, CXCL2, CXCL3 ou CXCL8^{416,417}. Certains récepteurs ont aussi une activité clairement anti-apoptotique, comme cela a été montré dans le cas de CXCR4, et participent donc à la progression tumorale par ce mécanisme⁴¹⁸. Enfin dans de très rares cas, l'activation d'un chimiorécepteur peut inhiber la croissance tumorale en diminuant la prolifération de certains cancers, comme c'est le cas par exemple de CCR1 dans les carcinomes hépatocellulaires ou CCR5 dans le cancer du sein^{397,419}.

B. Chimiotaxine et angiogenèse :

Les chimiotaxines peuvent aussi moduler la progression locale de la tumeur en agissant sur l'angiogenèse. Elles peuvent agir sur les recrutements des cellules endothéliales par migration dirigée afin de créer de nouveaux réseaux vasculaires au niveau du site tumoral. Les chimiotaxines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL12, CCL2, CCL11 et CCL16 sont plutôt pro-angiogéniques alors que les chimiotaxines CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL14 sont plutôt anti-angiogéniques⁴²⁰. Certaines chimiotaxines peuvent aussi agir en recrutant par migration dirigée des cellules non-endothéliales mais sécrétrices de VEGF et de PDGF qui vont favoriser l'activation des mécanismes d'angiogenèse^{312,421-423}.

C. Chimiotaxine, migration dirigée et dissémination métastatique :

Au-delà de ces rôles dans la survie cellulaire ou l'angiogenèse, le rôle principal des chimiotaxines reste l'induction de la migration dirigée. Cette migration joue un rôle majeur dans les phénomènes de dissémination aussi bien locaux que métastatiques. En effet, la dissémination métastatique est un phénomène précis où seulement certains organes spécifiques seront envahis. Les cellules stromales de chaque site métastatique vont ainsi être capables de sécréter des chimiotaxines spécifiques qui vont guider certaines cellules tumorales jusqu'à ce site afin de développer une métastase. Historiquement, le premier axe de ce type qui a été identifié est l'axe CXCL12/CXCR4 dans le cancer du sein⁴²⁴. Dans cette étude, il avait été montré que les principaux sites de métastase du cancer du sein (les poumons, le cerveau, les ganglions lymphatiques, le foie et la moelle osseuse) étaient capables de sécréter de grandes quantités de CXCL12 qui pouvaient interagir avec le récepteur CXCR4 des cellules tumorales mammaires.

Ces dernières peuvent ainsi être guidées dans leur dissémination vers ces sites. Ce rôle de l'axe CXCR4/CXCL12 a par la suite été retrouvé dans de nombreux cancers tels que le mélanome, le cancer du poumon, colorectal, gastrique, de l'ovaire, du pancréas, de l'œsophage, de la vessie, mais aussi dans l'ostéosarcome, le neuroblastome, le glioblastome et la leucémie lymphoblastique. Bien que les sites métastatiques de ces cancers soient différents, à chaque fois leur migration vers un de leur site métastatique, au moins, est conditionnée par l'axe CXCR4/CXCL12 et par la sécrétion des cellules stromales du site métastatique^{425,426}. Cet axe CXCR4/CXCL12 est un exemple classique de ce phénomène car le plus étudié mais il existe de nombreux autres couples chimiokine/chimiorécepteur impliqués dans ce phénomène avec une importance variable en fonction du site métastatique et du cancer. Dans certains cas, deux axes peuvent être impliqués dans la migration d'une cellule tumorale vers un même site, comme c'est le cas dans le mélanome où la métastase ganglionnaire est liée à l'expression des récepteurs CXCR4 et CCR7. Dans ce cas, l'activation des deux voies permet un renforcement de la dissémination métastatique. La plupart des axes impliqués dans les disséminations métastatiques des différents cancers sont ainsi regroupés dans la figure 24.

Concernant le cancer de la prostate plus spécifiquement, plusieurs études ont établi une corrélation entre l'agressivité du cancer de la prostate et certains axes chimiokines/chimiorécepteurs. On retrouve ainsi en particulier l'axe CXCL12/CXCR4 et 7^{427,428}, l'axe CXCL8/CXCR1 et 2^{429,430} et l'axe CCL2/CCR2⁴³¹⁻⁴³⁴. Tout comme dans le cas des cancers précédents, la chimiokine CXCL12 se retrouve impliquée dans la dissémination du cancer de la prostate. L'expression de CXCR4 et de CXCR7 (un autre récepteur de CXCL12) se retrouve augmentée dans les épithéliums tumoraux et est corrélée à la progression tumorale^{428,435}. Cet axe est par ailleurs lié à la métastase osseuse des cancers de la prostate, du poumon et du sein avec la sécrétion de CXCL12 par les fibroblastes, les ostéoblastes ou d'autres cellules stromales de la moelle osseuse^{427,428,436}. Concernant CXCL8, sa forte expression dans les tumeurs prostatiques est corrélée à un Gleason élevé et donc à une plus grande agressivité tumorale. Cette chimiokine peut se lier à CXCR1 et 2, deux récepteurs retrouvés dans des tumeurs de haut grade^{430,437-439}. Par ailleurs, on retrouve de forts taux de CXCL8 dans le sérum des patients avec un cancer de la prostate métastatique osseux⁴³⁹⁻⁴⁴¹ et certains autres ligands de CXCR2 (CXCL1, CXCL3, CXCL5 et CXCL6) sont eux aussi retrouvés dans les tumeurs prostatiques de mauvais pronostic⁴⁴². Cet axe pourrait donc jouer un rôle aussi bien dans la progression locale que dans la dissémination métastatique du cancer de la prostate. Néanmoins, aucune preuve n'a prouvé formellement l'implication de CXCR2 et

CXCR1 dans la métastase osseuse. Comme expliqué précédemment les seules fonctions connues de ces récepteurs portent sur la prolifération des cellules tumorales prostatiques. En ce qui concerne l'axe CCL2/CCR2, il semble plutôt jouer un rôle dans la dissémination métastatique à distance^{432,443} du cancer de la prostate. Cet axe semble présenter un intérêt d'un point de vue thérapeutique, néanmoins il est important de prendre ces résultats avec précautions car la plupart des études ne portent que sur des expériences *in vitro* ou *in vivo* chez la souris mais aucun résultat convaincant n'a encore été montré chez l'homme. L'expression de CCR2 est corrélée à l'agressivité des lignées tumorales prostatiques *in vitro*^{431,444}. Par ailleurs, CCL2 est sécrété au niveau de la moelle osseuse par les HBME (pour Human Bone Marrow Endothelial cells) et les cellules stromale de la moelle osseuse^{432,443}. Cet axe CCR2/CCL2pourrait donc joué un rôle dans la migration dirigée des cellules tumorales vers le site^{133–136,142,144}. (Figure 24)

Récepteur	Chimiokine	Site de métastase	Type de cellules tumorales
CXCR1 et 2	CXCL8	Moelle osseuse	Cancer de la prostate
CXCR3	CXCL9 CXCL10 CXCL11	Ganglion lymphatique Poumon Foie	Mélanome, colon, ostéosarcome, carcinome pulmonaire
CXCR4	CXCL12	Poumon Moelle osseuse Ganglion lymphatique	Sein, mélanome, rein, thyroïde, poumon à petites cellules, colorectal, gastrique, pancréas, ovaire, gliome, lymphome, leucémie, prostate
CXCR7	CXCL12	Moelle osseuse	Cancer de la prostate
CXCR5	CXCL13	Ganglion lymphatique	Lymphome, carcinome squameux, leucémie, neuroblastome
CCR2	CCL2	Poumon Moelle osseuse	Colon, prostate
CCR5	CCL5	Poumon	Sein
CCR7	CCL19 CCL21	Ganglion lymphatique	Sein, mélanome, l'œsophage, carcinome squameux, poumon, gastrique, colorectal, leucémie, lymphome
CCR9	CCL25	Petit intestin	Mélanome, sein, ovaire
CCR10	CCL27 CCL28	Peau	Mélanome, carcinome squameux

Figure 24 : Implication des différentes chimiokines dans la dissémination métastatique. des cancers. D'après The Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences of UC San Diego

Les axes impliquant les chimiokines et leurs chimiorécepteurs apparaissent clairement comme des acteurs essentiels de la dissémination locale et à distance des cancers. On identifie ainsi de nombreux axes spécifiques aux différents cancers et sites métastatiques. Néanmoins, bien que les adipocytes soient capables de sécréter de nombreuses chimiokines, peu de corrélations ont

été faites à ce jour entre chimiokine du tissu adipeux et dissémination des cancers. Aucune étude n'a d'ailleurs pu mettre en évidence le rôle des adipocytes médullaires dans la dissémination métastatique osseuse des cancers, alors même qu'il s'agit des cellules les plus présentes dans la moelle osseuse et avec la plus grande capacité de sécrétion. Au cours de notre travail, nous avons donc cherché à étudier la place du tissu adipeux périprostatique et médullaire dans la dissémination locale et à distance du cancer de la prostate.

Nous avons ainsi pu voir l'importance du microenvironnement tumoral dans le développement tumoral et le rôle majeur qu'y joue les adipocytes (Figure 25). Ces observations nous ont amenées à penser que les adipocytes pourraient jouer un rôle dans la dissémination du cancer de la prostate aussi bien au niveau local qu'à distance. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet des sécrétions du TAPP et des adipocytes médullaires sur les capacités invasives des cellules tumorales. Dans les prochaines parties je présenterai donc mes résultats de thèse en me concentrant dans un premier temps sur l'influence du TAPP sur la dissémination locale du cancer de la prostate, puis dans un deuxième temps sur l'influence des adipocytes médullaires sur le développement de la métastase osseuse. Je m'attacherai à montrer que la dissémination du cancer de la prostate aussi bien localement qu'à distance dépend des sécrétions adipocytaires sous la dominance d'un axe chimiorécepteur/chimiokine (CCR3/CCL7). Au cours de mes démonstrations, je m'intéresserai aussi à l'effet de l'obésité sur les deux types de dissémination et à l'effet du vieillissement sur la dissémination métastatique osseuse. Pour terminer, je conclurai en discutant les résultats que j'ai obtenus et en soulignant les apports ainsi que les nouvelles questions qu'ils entraînent.

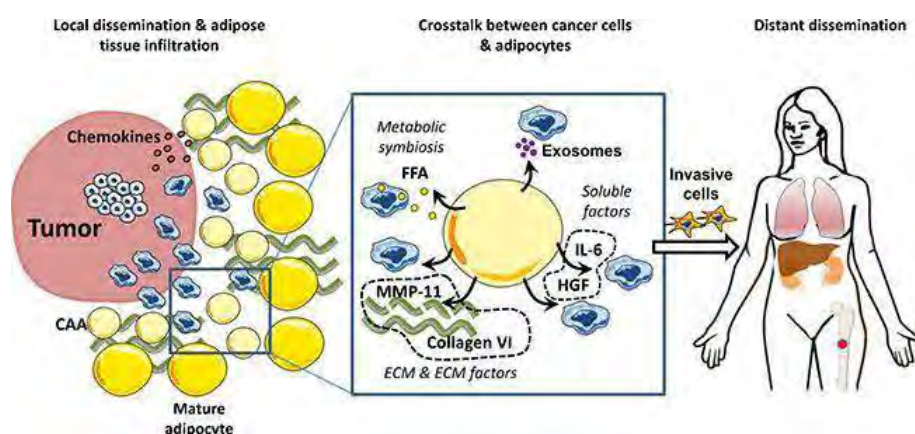


Figure 25 : Rôle des adipocytes dans le microenvironnement tumorales. D'après Minh *et al*, Oncotarget 2017

Résultats

Article 1

I. Effet du tissu adipeux périprostatique sur la dissémination locale du cancer de la prostate : rôle de l'axe CCR3/CCL7

(Laurent *et al*, Nature communication, January 2016)

ARTICLE

Received 22 Dec 2014 | Accepted 18 Nov 2015 | Published 12 Jan 2016

DOI: 10.1038/ncomms10230

OPEN

Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity

Victor Laurent^{1,2}, Adrien Guérard^{1,2}, Catherine Mazerolles³, Sophie Le Gonidec^{1,4}, Aurélie Toulet^{1,2}, Laurence Nieto^{1,2}, Falek Zaidi³, Bilal Majed⁵, David Garandeau^{1,2}, Youri Socrier³, Muriel Golzio^{1,2}, Thomas Cadoudal^{1,4}, Karima Chaoui^{1,2}, Cedric Dray^{1,4}, Bernard Monsarrat^{1,2}, Odile Schiltz^{1,2}, Yuan Yuan Wang^{1,2}, Bettina Couderc^{1,6}, Philippe Valet^{1,4}, Bernard Malavaud^{1,7} & Catherine Muller^{1,2}

Obesity favours the occurrence of locally disseminated prostate cancer in the periprostatic adipose tissue (PPAT) surrounding the prostate gland. Here we show that adipocytes from PPAT support the directed migration of prostate cancer cells and that this event is strongly promoted by obesity. This process is dependent on the secretion of the chemokine CCL7 by adipocytes, which diffuses from PPAT to the peripheral zone of the prostate, stimulating the migration of CCR3 expressing tumour cells. In obesity, higher secretion of CCL7 by adipocytes facilitates extraprostatic extension. The observed increase in migration associated with obesity is totally abrogated when the CCR3/CCL7 axis is inhibited. In human prostate cancer tumours, expression of the CCR3 receptor is associated with the occurrence of aggressive disease with extended local dissemination and a higher risk of biochemical recurrence, highlighting the potential benefit of CCR3 antagonists in the treatment of prostate cancer.

¹Université de Toulouse, UPS, Toulouse F-31077, France. ²Département “Biologie du Cancer” et “Biologie Structurale et Biophysique”, CNRS; Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse F-31077, France. ³Département d’Anatomo-Pathologie, Institut Universitaire du Cancer, Toulouse cedex 9 31059, France. ⁴Département “Tissu Adipeux, Obésité et Diabète”, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U1048, Toulouse F-31432, France. ⁵Centre Hospitalier de la Région de Saint-Omer (CHRSO), Route de Blendecques, BP 60357, Saint-Omer Cedex 62505, France.

⁶Département “Tumeur et Environnement”, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Toulouse Cedex 1 F-31037, France. ⁷Département d’Urologie, Institut Universitaire du Cancer, Toulouse cedex 9 31059, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M. (email: muller@ipbs.fr).

Extraprostatic extension is a widely acknowledged adverse factor in prostate cancer¹, and an important determinant of prostate cancer recurrence after treatment². The prostate gland is surrounded by periprostatic adipose tissue (PPAT), which is, like other fat depots, an active endocrine organ. Adipose tissue is mainly comprised of adipocytes, although other cell types contained in the so-called stromal vascular fraction (SVF) contribute to its growth and function, including adipocyte-derived stem cells, preadipocytes, lymphocytes, macrophages, fibroblasts and vascular endothelial cells^{3,4}. Mature adipocytes, first thought of as energy-storing cells, have emerged this last decade as highly endocrine cells, which are able to secrete hormones, growth factors, chemokines or pro-inflammatory molecules, an heterogeneous group of molecules termed 'adipokines'^{3,4}.

It is increasingly clear that obesity, where the normal balance of adipose tissue secretory proteins is perturbed, is associated with a greater risk of aggressive prostate cancer with increased local dissemination^{5,6}. Obesity, in particular excess visceral adiposity, leads to changes in the cellular composition of adipose tissue (mainly infiltration by macrophages) as well as to modifications of the secretory pattern of mature adipocytes^{3,4}. The existing correlation between the abundance of PPAT and tumour aggressiveness suggests a paracrine role for this fat depot during tumorigenesis⁷. Limited data exists on the mechanisms that could be involved in this effect. We uncovered that the secretions of mature adipocytes possess a strong ability to support the directed migration of prostate cancer cells, suggesting that mature adipocytes can affect the early stages of prostate cancer progression by promoting the spread of cancer cells outside the prostate gland. This switch from a prostate-confined tumour to a locally disseminated cancer is viewed as a crucial step in the progression of the disease at a clinical level².

A complex network of chemokines, and their associated receptors, influences the directed migration of invasive cancer cells⁸. Chemokines comprise a large group of small secreted proteins (8–11 kDa in size) that are grouped into four families (C, CC, CXC and CX3C) depending on the spacing of key cysteine residues near their N terminus, with the CC and CXC families representing the bulk of known chemokines⁸. Directed migration of cells that express the appropriate chemokine receptor occurs along a chemokine gradient, allowing cells to move towards high local concentrations of ligand, a process known as chemotaxis. The functions of chemokines in malignancy depend considerably on the chemokine type and on tumour- and host-dictated characteristics⁸. Many chemokines and their receptors affect the development and progression of prostate cancer, the most evidence being provided for CCR2, CXCR1, CXCR2 and CXCR4 (ref. 9). Expression of these four chemokine receptors is higher in human prostate cancer tissues when compared with normal epithelium or tissues presenting benign prostatic hyperplasia, and their expression could correlate with tumour aggressiveness^{10–12}. More recently, it has been demonstrated that a prostate cancer cell line, Du-145, also expresses the CCR3 receptor¹³, whose over-expression was described previously in human melanoma or kidney cancers^{14,15}. Chemokines are released by the tumour cells themselves and/or by host cells, including infiltrating leukocytes, endothelial cells and fibroblasts^{8,9}.

Few studies have investigated the role of mature adipocytes in this context, although these cells secrete chemokines, the production of which is upregulated in obesity¹⁶. Using combined *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrate here that the ability of PPAT to attract cancer cells away from the prostate gland is dependent on an original CCR3/CCL7 axis. The upregulation of CCL7 secretion in obesity facilitates

extraprostatic extension and increases local dissemination, this effect being totally abrogated when the CCR3/CCL7 axis is inhibited. Our study unravels a new pathway, regulated by obesity, implicating PPAT in prostate cancer aggressiveness and suggests new strategies for treatment of advanced prostate cancer involving CCR3 antagonists, which are currently being developed for other diseases including asthma¹⁷.

Results

CCR3 drives Ad-CM-induced migration of prostate cancer cells.

The conditioned medium from 3T3-F442A adipocytes (Ad-CM) significantly promoted the directed migration of all prostate cancer cell lines studied as compared with the negative control using 0% fetal calf serum (FCS). The migration of the most aggressive cell lines, PC-3 and Du-145, was even slightly higher than that observed with 10% FCS (Fig. 1a). As expected, these cells expressed chemokine receptors important for prostate cancer dissemination in humans (CXCR1, CXCR2, CXCR4 and CCR2)⁹ as well as CCR3 whose function in prostate cancer chemotaxis has been recently described *in vitro*¹³ (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1a).

Antagonists of these receptors were used to analyse their involvement in Ad-CM-induced migration. The doses used were within the range of IC₅₀ (maximal doses between two- and 2.5-fold IC₅₀) and without toxicity on prostate cancer cells (Supplementary Fig. 2). The highest doses of CXCR4 (AMD3100 (ref. 18)), CXCR1/CXCR2 (SB225002 (ref. 19)) or CCR2 (sc-202525 (ref. 20)) antagonists inhibited the migration of PC-3 cells by 10–20% (Fig. 1c). For the CCR2 antagonist, this inhibitory effect was only present at maximal doses and not at the described IC₅₀ (ref. 20). For the CCR1/CCR3 antagonist UCB35625 (ref. 21), a clear dose-dependent effect was found and this effect was the strongest among all the inhibitors used (45% inhibition at 200 nM compared with control). A CCR3 neutralizing monoclonal antibody (mAb) gave similar results (50% inhibition compared with control) and migration was unaffected by a mAb against CCR1, which is not expressed by prostate cancer cells (Fig. 1b,d). Use of CXCR2 and CXCR4 neutralizing mAbs also confirmed the results obtained with the pharmacological inhibitors with a decrease of PC-3 migration by 15% and 20%, respectively (Fig. 1d). Combination of both CXCR2 and CXCR4 mAbs inhibited the migration of PC-3 cells by 25% (compared with a 50% inhibition in the presence of CCR3 mAb alone), whereas a 60% decrease was observed in the presence of the three blocking mAbs (CCR3, CXCR2 and CXCR4; Fig. 1d). The combined effect of blocking mAbs appears, therefore, rather additive than synergistic. Similar results were obtained with combination of inhibitors. In all cases, the effect of CCR1/3 antagonist alone was greater than the effect of combination of CXCR1/2, CCR2 and CXCR4 antagonists (Supplementary Fig. 3). Experiments using blocking mAbs and pharmacological inhibitors conducted with Du-145 cells confirmed these results (Supplementary Fig. 1b,c). Taken together, these results highlight that CCR3 alone is a master regulator of prostate cancer cells migration towards Ad-CM.

The CCR3 receptor was expressed in cell lines derived from several tumour models (breast, colon, pancreas and melanoma) that come into contact with surrounding adipose tissue during invasion²² (Supplementary Fig. 4a). The migration of these cells in response to Ad-CM was correlated with their aggressiveness. In contrast to prostate cancer cells, inhibition of CCR3 had no effect on the Ad-CM-directed migration of all but one cell line (20% inhibition in the breast cancer cell line MDA-MB231; Supplementary Fig. 4b). These results were confirmed using CCR3 blocking mAb (Supplementary Fig. 5). Use of pharmacological inhibitors and blocking mAbs showed that

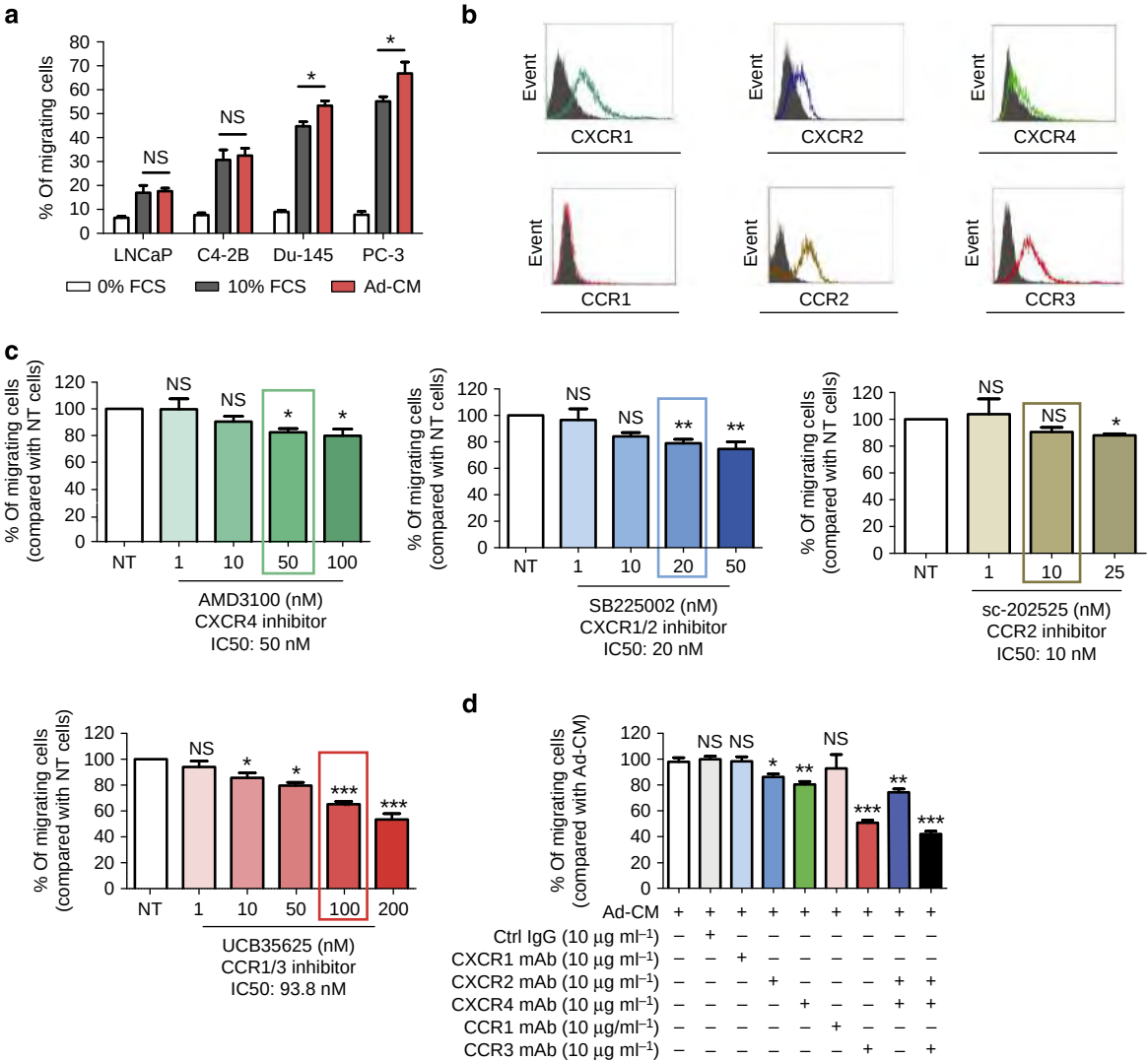


Figure 1 | Adipocytes promote the migration of prostate cancer cells in a CCR3-dependent manner. (a) *In vitro* migration of the indicated prostate cancer cell lines towards a medium containing either 0% (used as a negative control) or 10% FCS, or towards conditioned medium obtained from 3T3-F442A mature adipocytes (Ad-CM). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 5$). (b) One representative experiment out of three showing the expression of chemokine receptors (CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR1, CCR2 and CCR3) detected by flow cytometry in the human prostate cancer cell line, PC-3. Solid histogram: control isotypes; open histogram: indicated antigens. (c) *In vitro* migration towards Ad-CM in the presence of increasing doses of the indicated receptor antagonists. Cells were pre-incubated with the receptor antagonists for 30 min at 37 °C before their addition to Transwell chambers. The receptor antagonists were also present during the migration assay (12 h). The molecules were used within a range of doses that inhibit chemotaxis; the line surrounding the histogram indicates the previously described IC₅₀ of the inhibitors in chemotaxis experiments. Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). (d) Similar experiments were performed in the presence of blocking monoclonal antibodies (mAbs) directed against CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR1, CCR3 or control IgG at 10 μ g ml⁻¹ used alone or in combination. Bar plots represent the percentage of migrating cells relative to the migration of untreated cells (set to 100%). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated versus untreated (NT) cells was evaluated with Student's *t*-tests. Statistical analysis: * statistically significant by Student's *t*-test $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS, not significant. *n* stands for the number of replicated independent experiments.

both CXCR2 and CXCR4 are predominantly involved in the migration of the other cancer models towards Ad-CM (Supplementary Fig. 5). For example, the CXCR4 blocking mAb inhibits the migration of melanoma or pancreatic cancer cells towards Ad-CM by 40% (Supplementary Fig. 5). These results highlight that the balance between active receptors and secreted chemokines varies from one tumour type to another, with the preferential and specific involvement of CCR3 in prostate cancer.

Role of the CCR3/CCL7 axis in adipocytes-induced chemotaxis. To detect the CCR3 ligand secreted by adipocytes, we conducted a proteomic analysis of Ad-CM and reproducibly detected six

secreted chemokines: CXCL1, CXCL5, CXCL12, CCL2, CCL7 and CCL9, whose presence in Ad-CM was validated by ELISA (Supplementary Table 1). CXCL1 and CXCL5 bind to CXCR2, CXCL12 to CXCR4 and CCL2 to CCR2 (Fig. 2a)²³. Of note, no ligand for CXCR1 was found in the adipocyte secretome, in accordance with the absence of effect of the CXCR1 blocking mAb on the migration of all the tested models (Fig. 1d, Supplementary Figs 1c and 5). Among the chemokines identified in our proteomic study, only CCL7 has been described as a ligand for CCR3 (ref. 24) (Fig. 2a). Since the secretion of CCL5, another CCR3 ligand, has been described for mammary adipocytes²⁵, we dosed this chemokine by ELISA in

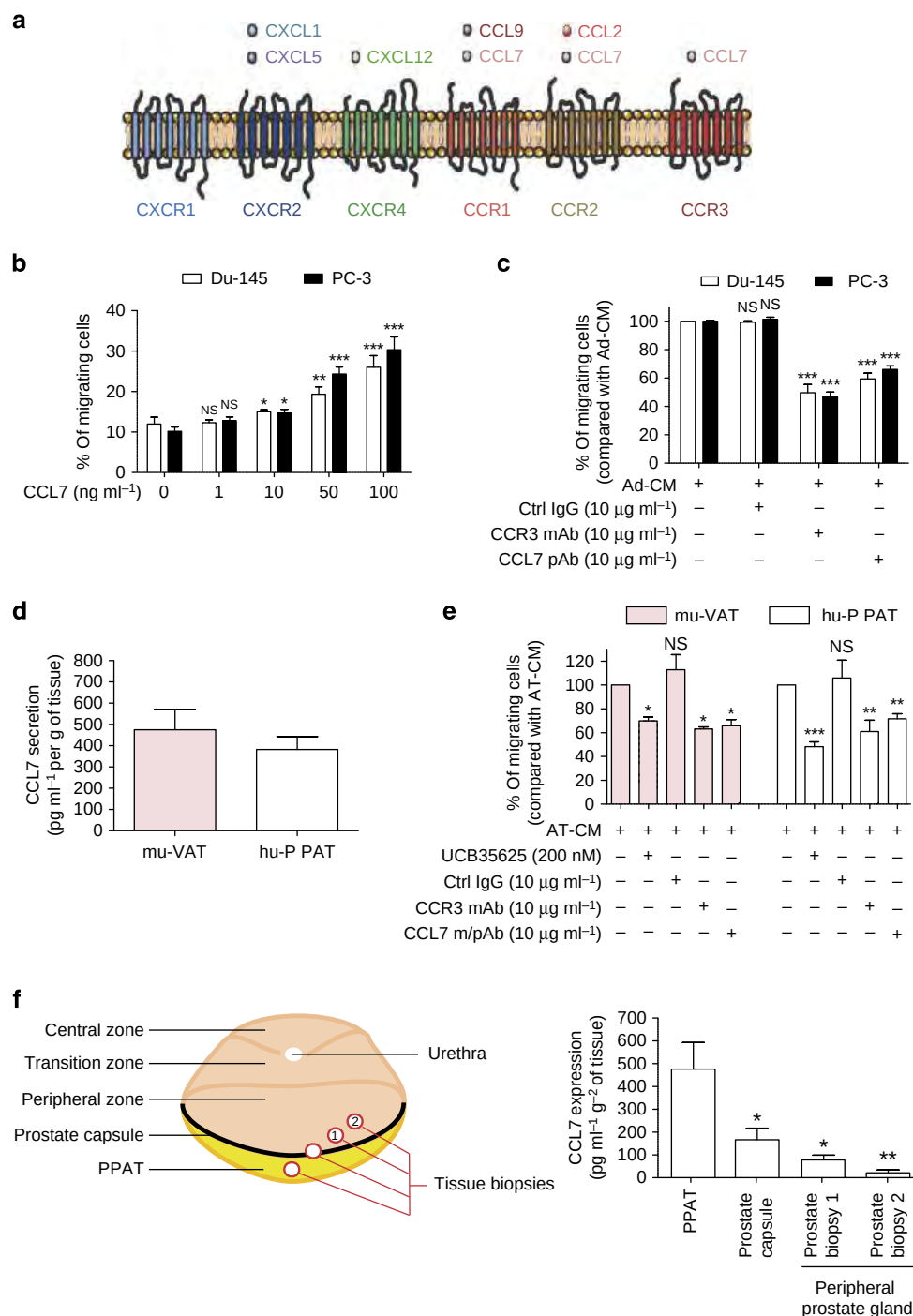


Figure 2 | CCL7/CCR3 axis is involved in the directed migration of prostate cancer cells towards PPAT. (a) Graphic representation of chemokines identified by proteomic analyses of Ad-CM and their corresponding receptors. (b) *In vitro* migration of Du-145 and PC-3 cells towards medium without serum in the presence or absence of CCL7 recombinant protein (1–100 ng ml⁻¹). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). The statistical differences between the mean percentages of migrating cells in experiments performed in the presence versus in the absence of CCL7 were evaluated with Student's *t*-tests. (c) *In vitro* migration of Du-145 and PC-3 cells towards Ad-CM in the presence of m/pAbs directed against CCR3 or CCL7, or control IgG (10 μ g ml⁻¹). Bar plots represent the percentage of migrating cells relative to the migration of untreated cells (set to 100%). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated versus untreated cells was evaluated with Student's *t*-tests. (d) CCL7 secretion by murine visceral adipose tissue (mu-VAT, three samples) or human periprostatic adipose tissue (hu-PPAT, five samples). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. (e) *In vitro* migration of PC-3 cells towards mu-VAT and hu-PPAT conditioned medium (AT-CM) in the presence or absence of CCR3 antagonist (UCB35625, 200 nM), blocking m/pAbs directed against CCR3 or CCL7, or control IgG (10 μ g ml⁻¹). Bar plots represent the percentage of migrating cells relative to the migration of untreated cells (set to 100%). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated versus untreated cells was evaluated with Student's *t*-tests. (f) Graphic representation of the site of the staged biopsies performed in human prostatectomy specimens ($n = 3$) is shown (left panel) and the expression of CCL7 in these biopsies is shown (right panel). The mean expression of CCL7 in staged prostate biopsies was compared with the mean expression in PPAT. Statistical analysis: * statistically significant by Student's *t*-test $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS, not significant. *n* stands for the number of replicated independent experiments. *n* stands for the number of replicated independent experiments.

Ad-CM. As shown in Supplementary Table 1, the level of CCL7 was almost undetectable in Ad-CM (mean concentration 0.01 ng ml^{-1} for 1×10^5 cells compared with 28.3 ng ml^{-1} for CCL7), in accordance with the results of our proteomic analysis. Expression of CCL7 by adipocytes has been only described in one study using the murine pre-adipocyte cell line 3T3-L1 (ref. 26). As illustrated by its alternate name, monocyte chemoattractant protein 3 (MCP-3), CCL7 was originally shown to recruit monocytes to sites of injury and mediate local inflammatory responses. This chemokine has since been shown to regulate the migration of multiple immune cells, including T lymphocytes, natural killer cells, immature dendritic cells, basophils and eosinophils²⁷. CCL7 could also be implicated in the chemotaxis of cancer cells to metastatic sites, although *in vivo* studies are limited in number and mainly concern gastric and colorectal cancers^{28,29}. To our knowledge, the role of CCL7 in the chemotaxis of prostate cancer cells has never been studied.

A set of results confirmed the role of CCL7 in the migration of prostate cancer cells towards Ad-CM. Prostate cancer cells (PC-3 and Du-145) underwent chemotaxis in response to increasing doses of recombinant CCL7 (Fig. 2b) and their migration was inhibited by CCL7 neutralizing polyclonal antibody (pAb) when Ad-CM was used as a chemoattractant (Fig. 2c). Similar results were obtained with LNCaP and C4-2B, two less aggressive prostate cancer cell lines, highlighting the role of the CCR3/CCL7 axis in the chemotaxis of prostate cancer cells in response to adipocyte secretions (Supplementary Fig. 6). CCL7 was also detected in CM of mouse visceral adipose tissue (mu-VAT-CM) and in that of human PPAT (hu-PPAT-CM; Fig. 2d). The migration of prostate cancer cells towards CM from these primary tissues also depended on the CCR3/CCL7 axis (Fig. 2e). We sought to assess the role of adipose tissue in the CCL7-directed migration of prostate cancer cells. We first verified that prostate cancer cells do not secrete this chemokine (Supplementary Fig. 7a) and that the inhibition of CCR3/CCL7 did not affect cell migration in response to 10% FCS (Supplementary Fig. 7b). Punch biopsy samples of human prostatectomy specimens taken from the PPAT or from inside the prostate gland revealed a strong gradient of CCL7 expression (Fig. 2f), suggesting that CCL7 is secreted by PPAT and passively diffuses to the prostate peripheral zone through the prostate capsule, that has been shown to be a permeable barrier³⁰. Therefore, the gradient of CCL7 found in PPAT will be able to promote the directed migration of invasive tumour cells expressing the CCR3 receptor.

CCR3/CCL7-induced chemotaxis is enhanced by obesity.

Obesity is associated with poor outcome in prostate cancer patients^{5,6}. In obesity, changes in adipocyte size affect the metabolic and endocrine functions of adipose tissue, and infiltration by macrophages contributes to systemic inflammation and metabolic syndrome. CCL7 has been reported to be over-expressed in adipose tissue in a context of obesity at mRNA levels¹⁶ and we confirmed this over-expression in the VAT of obese individuals and mice (Fig. 3a and Supplementary Fig. 8a). Leptin and CCL7 expression were correlated, suggesting that CCL7 secretion is related to the hypertrophic state of adipocytes³¹ (Supplementary Fig. 8b). Using ELISA, we confirmed that the secretion of CCL7 was higher in obese, when compared with lean mu-VAT-CM (Fig. 3b).

The migration of prostate cancer cells in response to mu-VAT-CM was significantly higher when cells migrate towards CM obtained from the VAT of obese mice compared with that of lean animals (1.9-fold increase; Fig. 3c). Importantly, this effect was totally abrogated when the CCR3/CCL7 axis was inhibited using pharmacological inhibitors or specific blocking mAbs (Fig. 3c).

Mature adipocytes and the so-called SVF were then separated to determine the main source of CCL7 secretion in adipose tissue (Fig. 3d). In lean conditions, the secretion of CCL7 was slightly higher in adipocytes than in the SVF, and a dramatic increase of CCL7 expression was observed in obesity only in mature adipocytes (around fivefold increase compared with lean conditions; Fig. 3e). When the secretions of adipocytes isolated from the mu-VAT of obese mice were used as a chemoattractant, the migration of prostate cancer cells was enhanced compared with secretions from adipocytes isolated from lean mice (Fig. 3f). As shown before for whole adipose tissue, the use of pharmacological inhibitors and CCR3/CCL7 blocking m/pAbs completely abrogated the increase of tumour cell migration observed in obesity (Fig. 3f). The SVF fraction has a slight but significant effect on prostate cancer migration. However, this effect was independent of the CCR3/CCL7 axis and obesity (Supplementary Fig. 9). Adipocytes isolated from human PPAT exhibit very short-term survival in culture ($<4 \text{ h}$). To circumvent this problem, we derived adipocytes from *ex vivo* differentiation of progenitors present in the SVF fraction of three patients. These adipocytes secrete CCL7 and use of Ad-CM prepared from these cells supported prostate cancer cells migration in a CCR3-dependent manner (Supplementary Fig. 10). Comparison of cells differentiated from lean versus obese patients would have been informative in the context of our study.

Since it has been demonstrated that mature adipocyte CXCL12 secretion (the ligand for CXCR4) is enhanced by obesity³², we investigated the role of the CXCR4/CXCL12 axis in our model. First, we demonstrated that the secretion of CXCL12 in isolated mature adipocytes was only slightly regulated by obesity when compared with CCL7 (1.6-fold increase for CXCL12 and fivefold increase for CCL7; Supplementary Fig. 11a) in accordance with previously published data³². Secretion of CXCL12 was also detected at low levels in the SVF, with a slight enhancement in obesity (Supplementary Fig. 11a). Using the conditioned medium from isolated adipocytes, we further demonstrated that both CXCR4 and CXCL12 blocking mAbs inhibit the migration of PC-3 cells by about 20% in obese, but not lean, conditions (Supplementary Fig. 11b). However, the enhanced chemotaxis towards the secretion of mature adipocytes isolated from obese animals was still observed in the presence of CXCR4/CXCL12 blocking mAbs in opposition to CCR3/CCL7 m/pAbs that completely abrogated this effect (Supplementary Fig. 11c). Thus, obesity increases the directed migration of prostate cancer cells by modulating the secretory pattern of mature adipocytes, this effect being mainly dependent on the CCR3/CCL7 axis.

Over-expression of CCR3 in aggressive human tumours.

We sought to investigate the role of CCR3 in human prostate cancer and, to begin with, we studied its expression in a first tissue microarray (TMA) containing 10 normal prostate samples and 91 human prostate cancer annotated with cancer differentiation (Gleason score). CCR3 was expressed in prostate cancer, but not in normal epithelium (Fig. 4a), and its expression was correlated with Gleason score that reflects both the extent of glandular differentiation and the pattern of growth of the tumour in the prostatic stroma (a high score is associated with an aggressive tumour and poor prognosis)³³ (Supplementary Table 2). Very interestingly, the proportion of tumours expressing moderate and high levels of CCR3 increased in 4 + 3 compared with 3 + 4 Gleason scored tumours. Despite a similar global Gleason score (7), it has been shown that a higher contingent of undifferentiated cells within the tumours (Gleason 4 + 3) significantly worsens the prognosis as compared with tumours that exhibit a larger differentiated contingent (Gleason 3 + 4)³⁴.

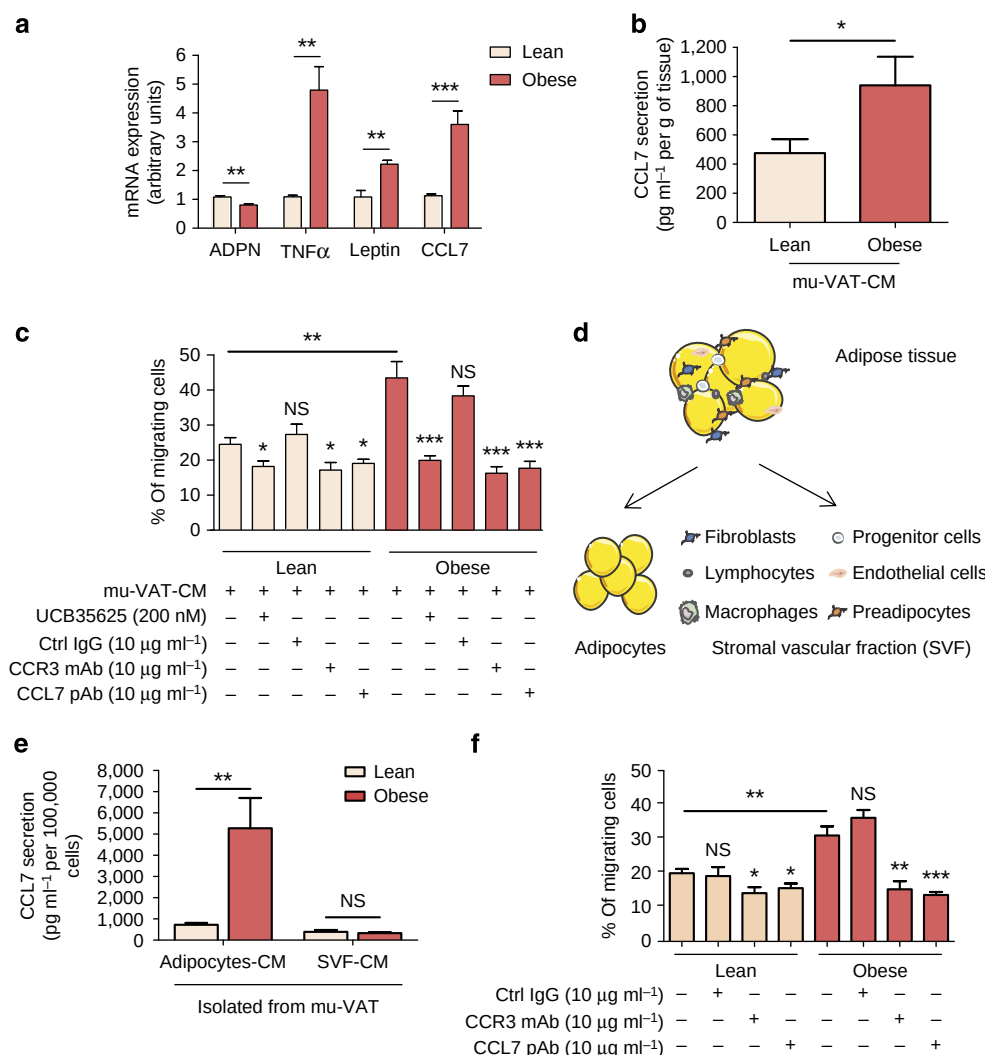


Figure 3 | CCL7 secretion by mature adipocytes is positively regulated in obesity and promotes an increased directed migration of prostate cancer cells. (a) mRNA were extracted from murine visceral adipose tissue (mu-VAT) of age-matched C57BL/6 mice either lean or obese (after 12 weeks of high-fat diet). Expression of CCL7 mRNA was evaluated by RT-qPCR. A panel of genes whose expression has been shown to decrease (Adiponectin, ADPN) or increase (tumor necrosis factor- α (TNF- α), Leptin) in obesity was used as a control to validate the samples. Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 5$). (b) Secretion of CCL7 in mu-VAT-CM obtained from lean or obese C57BL/6 mice (three animals per group). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). (c) *In vitro* migration of PC-3 cells towards mu-VAT-CM obtained from lean or obese animals (three animals per group) treated or not with CCR3 inhibitor (UCB35625 200 nM), blocking m/pAbs directed against CCR3 or CCL7, or control isotype (all used at 10 μ g ml⁻¹). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated versus untreated cells was evaluated with Student's *t*-tests. (d) Graphic representation of the cellular components of adipose tissue. (e) CCL7 secretion by primary adipocytes or SVF cells isolated from mu-VAT of C57BL/6 lean or obese mice (six animals per group). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). (f) *In vitro* migration of PC-3 cells towards mu-VAT adipocyte-CM. Adipocytes were isolated from the mu-VAT of lean or obese C57BL/6 mice (six animals per group) in the presence or absence of blocking m/pAbs directed against CCR3 or CCL7 or control IgG (10 μ g ml⁻¹). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated versus untreated cells was evaluated with Student's *t*-tests. The differences between the percentages of migrating cells towards Ad-CM isolated from mu-VAT from obese versus lean mice are also shown. Statistical analysis: * statistically significant by Student's *t*-test $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS, not significant. *n* stands for the number of replicated independent experiments.

We then constructed a second fully annotated TMA from prostatectomy pieces of 101 patients that underwent surgery between 1 February 2010 and 1 December 2011 in the Department of Urology of the University Hospital of Toulouse (Supplementary Tables 3 and 4). The clinical and biochemical (post-operative serum Prostate-Specific Antigen (PSA)) outcomes of the patients were updated in March 2015. CCR3 staining was then performed in this second TMA and scored by two pathologists into low-, intermediate- and high-expressing tumours. Stained areas of all tumours were digitalized and protein expression was quantified using ImageJ software plug-ins

to obtain more accurate measures than the traditional evaluation relying on manual scoring^{35,36}. We verified that the results obtained were in accordance with the three groups defined by the manual scoring (see Methods section). As shown in Table 1 and Fig. 4b, CCR3 expression was positively correlated with Gleason score, the size of the undifferentiated component (percentage of tumour classified as Gleason 4 or 5), localization at the peripheral zone of the prostate gland, local extension of the prostate cancer (shown by pT stage), the presence of lymphatic emboli and biochemical recurrence (BCR). Of note, CCR3 was significantly over-expressed in tumours from obese patients (body mass index

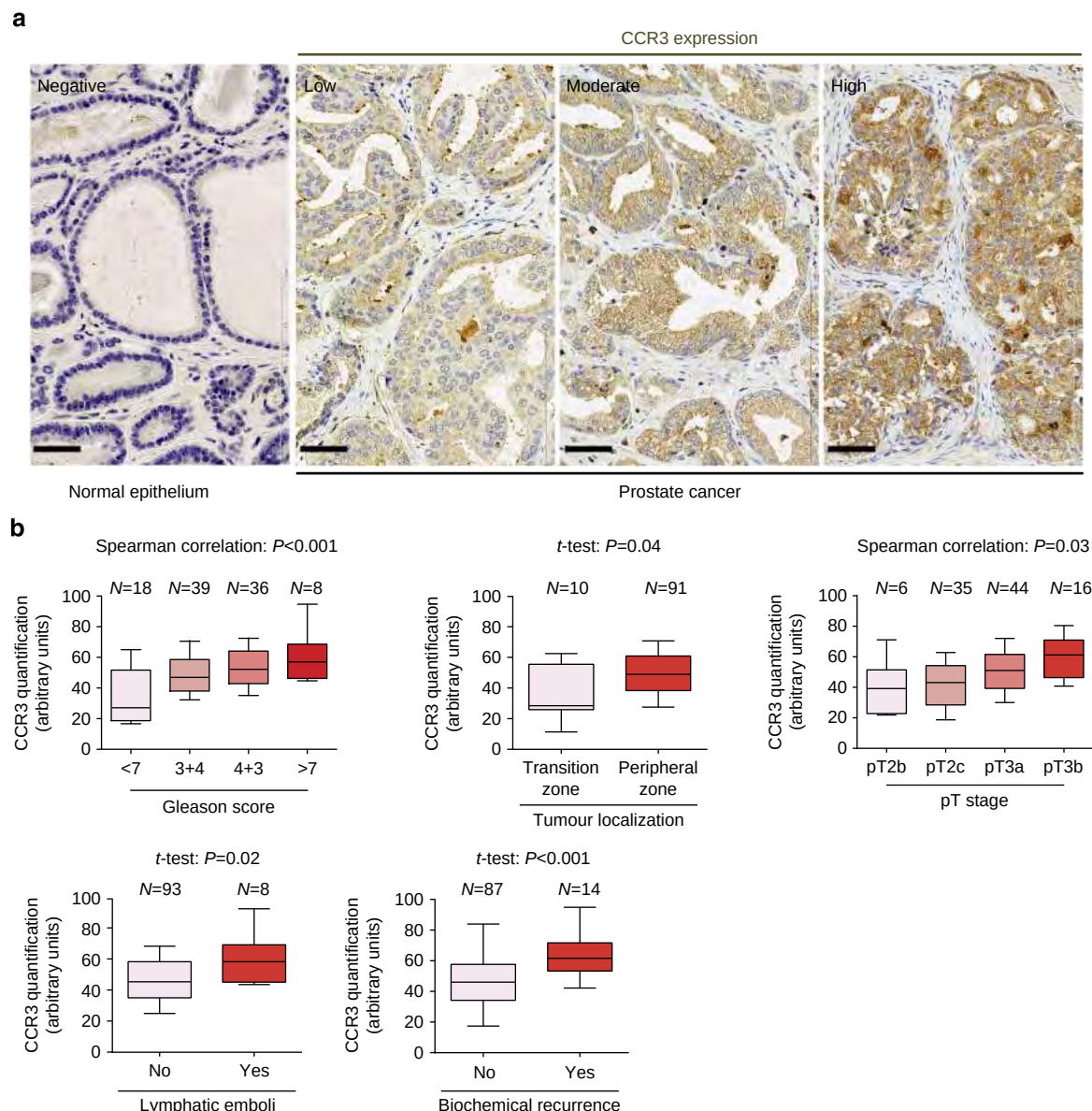


Figure 4 | CCR3 is expressed in prostate cancer and its expression is correlated with poor prognosis and a high risk of local extension.

(a) Immunohistochemical staining for CCR3, as well as hematoxylin counter-staining, was performed in normal epithelium and human prostate cancer tissues. Two pathologists, who were blind to clinical data, independently scored CCR3 expression. Pictures show a representative experiment for each of the staining intensities of CCR3 expression found in human tumours (low, moderate and high expression) whereas normal epithelium remains negative in all tested samples (pictures, zoom $40\times$). Scale bars, $50\ \mu\text{m}$. **(b)** CCR3 expression was evaluated by immunohistochemistry on a TMA containing 101 tumours in duplicate. The boxes represent the median (black middle line) limited by the 25th (Q1) and 75th (Q3) percentiles. The whiskers are the upper and lower adjacent values, which are the most extreme values within $Q3 + 1.5(Q3 - Q1)$ and $Q1 - 1.5(Q3 - Q1)$, respectively. These box plots represent CCR3 values comparing tumours Gleason score, tumour localization, tumour stage, patients with and without lymphatic emboli or biochemical recurrence. For the correlation between CCR3 expression and variables with more than two ordered classes regarding disease severity (for example, Gleason score or tumour stage), we used Spearman's correlation tests assuming a monotonic relation between considered variables. We used Student's t -tests (notified by *) to correlate CCR3 expression to non-ordered categorical variables (for example, presence or not of emboli or biochemical recurrence). The biochemical recurrence, as defined by the European Association of Urology guidelines, corresponded to two PSA readings $>0.2\ \text{ng ml}^{-1}$.

(BMI) $30\text{--}35\ \text{kg m}^{-2}$, 7.9 % of the cohort). This result probably indirectly indicates that their surrounding PPAT express higher levels of CCL7 since it has been demonstrated that chemokines are able to regulate the expression of their own receptors³⁷. We sought to enlarge these results linking CCR3 to prognosis by investigating its role in surgical treatment failure defined either by BCR, locoregional recurrence or distant metastases or by the use of adjuvant radiation or hormonal deprivation therapy, criteria that we used in a previous study³⁸. CCR3 values were strongly

correlated with surgical treatment failure (Supplementary Fig. 12a). Very interestingly, when compared in patients exhibiting or not surgical treatment failure at 1 year of follow-up within the four Gleason score classes (i.e. <7 , 7 (3 + 4 or 4 + 3), >7), CCR3 values were systematically higher in patients with surgical treatment failure regardless of Gleason scores (Supplementary Fig. 12b). Moreover, the differences in CCR3 values were greater in case of favourable Gleason score (<7 ; Supplementary Fig. 12b). Finally, we observed in a small series of

Table 1 | Histological and immunohistochemical characteristics of the cohort.

	CCR3 quantifications (arbitrary units), median (extant)	P value
Prostatectomie piece weight (g)	48.5 (11.4–94.7)	0.82
PSA before surgery (ng ml ^{−1})	48.5 (11.4–94.7)	0.38
Gleason score		
Gleason <7	27.2 (11.4–85.0)	<0.001
Gleason =7 (3+4)	47.0 (21.0–90.2)	
Gleason =7 (4+3)	52.2 (30.6–75.7)	
Gleason >7	57.0 (44.7–94.7)	
Tumour localization		
Transition zone	37.6 (11.4–62.8)	0.04*
Peripheral zone	49.7 (17.3–94.7)	
Percentage of low differentiated contingent (grade 4 and 5)	48.5 (11.4–94.7)	<0.001
pT stage		
pT2b	39.9 (31.9–71.1)	0.03
pT2c	41.4 (11.4–75.7)	
pT3a	51.6 (17.3–90.2)	
pT3b	60.0 (35.9–94.7)	
Lymphatic emboli		
No	47.4 (11.4–90.2)	0.02*
Yes	62.0 (44.7–94.7)	
Lymph node invasion		
Nx (no node dissection performed)	43.4 (18.7–71.1)	0.40*
N0	49.6 (11.4–94.7)	
N1	56.4 (44.7–71.1)	
Biochemical recurrence		
No	42.1 (11.4–90.2)	<0.001*
Yes	61.5 (42.2–94.7)	
Body mass index (BMI)		
Lean (BMI ≤30 kg m ^{−2})	47.4 (11.4–85.0)	0.01*
Obese (BMI >30 kg m ^{−2})	64.6 (27.7–94.7)	

PSA, prostate-specific antigen; TMA, tissue microarray.
CCR3 expression was evaluated by immunohistochemistry on a TMA containing 101 tumours in duplicate. For the correlation between CCR3 expression and quantitative data (for example prostate weight) or variables with more than two ordered classes regarding disease severity (for example Gleason score or tumour stage), we used Spearman correlation tests assuming a monotonic relation between considered variables. We used Student's t-tests (notified by *) to correlate CCR3 expression to non-ordered categorical variables (for example presence or not of emboli or biochemical recurrence). The biochemical recurrence, as defined by the European Association of Urology guidelines, corresponded to two PSA readings >0.2 ng ml^{−1}.

eight patients that CCR3 expression was slightly upregulated in tumour cells present at the invasive front compared with cells from the centre of tumours, this effect being more pronounced in overweight and obese patients (Supplementary Fig. 13). Note that some blood vessels (indicated by blue stars) also express CCR3 but that quantification was only performed in tumour glands (indicated by arrows) under the supervision of two pathologists. These compelling results show for the first time that CCR3 is expressed in prostate cancer and that its expression, amplified in obesity, is correlated both with the occurrence of aggressive prostate cancer, BCR and surgical treatment failure.

CCR3 has a major role in tumour progression in obese mice. We then used an orthotopic graft model in the obesity-sensitive C57BL/6 murine strain^{39,40} to assess the importance of the CCR3/CCL7 axis and its regulation by obesity during prostate

cancer dissemination *in vivo*. Like all prostate cancer cells studied so far, TRAMP-C1P3 expressed the CCR3 receptor but not CCR1 (Fig. 5a). Recombinant CCL7 protein induced the migration of TRAMP-C1P3 cells and inhibition of the CCR3/CCL7 axis impaired their migration towards Ad-CM (Fig. 5b,c). We engineered TRAMP-C1P3 cell lines stably expressing three different short hairpin RNAs (shRNA) against CCR3 (m4CCR3, m5CCR3 and m6CCR3). CCR3 expression at the cell surface was 27–40% lower in these cells than in wild-type cells (wtCCR3; Fig. 5d). Their migration towards Ad-CM was about twofold lower than that of wtCCR3 cells and migration was the most impaired in the m6CCR3 cell line (Fig. 5e). In contrast with wtCCR3 cells, the migration of shCCR3 cells in response to Ad-CM was not affected by the use of the CCR3 inhibitor, UCB35625 (Fig. 5e). Of note, the migration of shCCR3 cells was similar to wt cells when 10% FCS was used as a chemoattractant, highlighting the specificity towards CCR3 of the observed migration defect (Supplementary Fig. 14). Finally, in contrast with shCtrl cells, the migration of m6CCR3 cells in response to mu-VAT-CM from obese or lean mice was similar and was not affected by the inhibition of the CCR3/CCL7 axis (Fig. 5f), highlighting again the key role of this axis in the increased prostate cancer migration observed in conditions of obesity.

ShCtrl and m6CCR3 cells were injected into the prostate of C57BL/6 mice. After 3 weeks, tumours formed in animals injected with shCtrl cells were significantly larger in mice fed a high-fat diet (HFD) than in those fed a normal diet (Fig. 6a,b). In both lean and obese conditions, tumours formed in mice injected with cells deficient in m6CCR3 were significantly smaller than in those injected with shCtrl cells (Fig. 6a,b). Furthermore, depletion of CCR3 totally abrogated the differences in tumour size observed between lean and obese mice after injection of the parental cell line. Persistent *in vivo* CCR3 depletion was confirmed by immunohistochemistry on excised tumours (Fig. 6b). We and others have previously demonstrated that when tumour cells come into contact of adipose tissue, adipocytes disappear, fibroblast-like cells accumulate and a desmoplastic stroma ensues, indicating that a cross-talk promoting the tumour's proliferative and invasive capacities is being established^{41–43}. In control tumours, PPAT thickness was smaller in areas in contact with tumour and this tissue was almost completely absent in obese animals (Fig. 6b). The observed differences in tumour size for shCtrl cells between obese and lean mice (Fig. 6a) suggest that the cross-talk between adipocytes and tumour cells is amplified in obesity, leading to increased tumour progression. CCR3-deficient tumours were smaller in size, and the surrounding PPAT was still present and thicker than in control tumours, demonstrating that, in these conditions, adipose tissue is not modified by the tumour. At proximity to CCR3-deficient tumours in obese animals, as expected, adipocytes were hypertrophic compared with those of lean mice, increasing PPAT thickness (Fig. 6b, middle panel). Although we assessed that the short-term (up to 5 days) growth of CCR3-deficient cells was similar to wt cells (Supplementary Fig. 15), we cannot formally exclude that long-term CCR3 depletion intrinsically affects tumour growth and survival. In conclusion, in mouse models, our compelling results show that CCR3 is therefore a major determinant of prostate cancer progression by influencing tumour size and adipose tissue remodelling and that its effect is substantially influenced by obesity.

Discussion

There is increasing evidence in the literature that tumour-surrounding adipocytes might affect tumour progression. When tumour cells invade the adipose tissue, we and others have demonstrated that these invasive cells dramatically impact

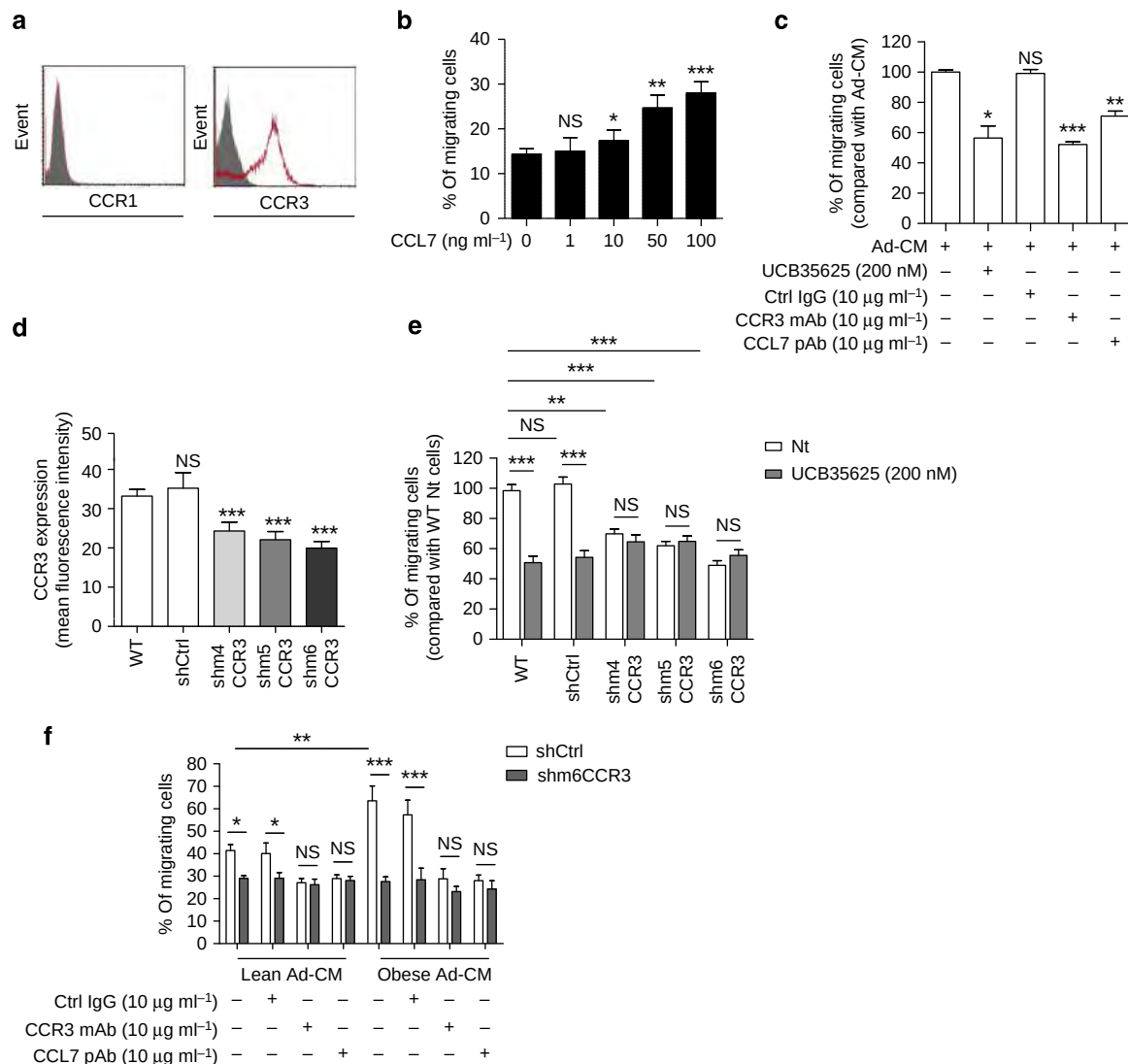


Figure 5 | Down-regulation of CCR3 expression in TRAMP-C1P3 cells. (a) One representative experiment out of three showing CCR1 and CCR3 expression detected by flow cytometry in the murine prostate cancer cell line TRAMP-C1P3. Solid histogram: control isotypes; open histogram: CCR1 or CCR3. (b) *In vitro* migration of TRAMP-C1P3 towards medium without serum, supplemented or not with CCL7 recombinant protein (1–100 ng ml⁻¹). Data are shown as mean ± s.e.m. ($n = 3$). The statistical differences between the mean percentages of migrating cells in experiments performed in the presence versus in the absence of CCL7 were evaluated with Student's *t*-tests. (c) *In vitro* migration of TRAMP-C1P3 cells towards Ad-CM as a chemoattractant treated or not with UCB35625 (200 nM), anti-CCR3, anti-CCL7 Abs, or control isotype (10 µg ml⁻¹). Data are shown as mean ± s.e.m. ($n = 3$). Data are expressed as the percentage of migrating cells relative to the migration of untreated cells (set to 100%). The statistical significance of differences between means of migrating cells in treated versus untreated cells was evaluated with Student's *t*-tests. (d) Mean fluorescence intensity of CCR3 expression determined by flow cytometry in TRAMP-C1P3 cells (WT), transfected with control shRNA (shCtrl) or with one of three different shRNA sequences targeting the CCR3 receptor (shm4, m5 and m6CCR3). Data are shown as mean ± s.e.m. ($n = 3$). The statistical significance of differences between means of fluorescence in control or CCR3 invalidated cells versus WT cells was evaluated with Student's *t*-tests. (e) *In vitro* migration of TRAMP-C1P3 cells transfected with either shCtrl or three different shRNA sequences targeting the CCR3 receptor (shm4, m5 and m6CCR3) towards Ad-CM. As indicated, cells were treated with the CCR3 antagonist UCB35625. Data are shown as mean ± s.e.m. ($n = 3$). (f) *In vitro* migration of TRAMP-C1P3 cells transfected with either shCtrl or shm6CCR3 towards CM of mu-VAT adipocytes obtained from lean or obese mice. As indicated, cells were treated with Abs against CCR3 or CCL7, or control isotype (10 µg ml⁻¹). Data are shown as mean ± s.e.m. ($n = 3$). Statistical analysis: * statistically significant by Student's *t*-test $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS, not significant. *n* stands for the number of replicated independent experiments.

adipocytes that then exhibit a modified phenotype and specific biological features. We named these adipocytes 'Cancer-Associated Adipocytes' (CAA)^{43,44}. In turn, CAAs modify cancer cells' characteristics/phenotype leading to more aggressive behaviour characterized by increased proliferative and invasive capacities, mediated by the secretion of proteases, pro-inflammatory cytokines and modulation of cancer cell metabolism^{4,22,45}. Acquisition of a CAA phenotype has been observed in various cancer types, including prostate, and appears

to be a general phenomenon²². *In vivo*, morphological changes and delipidation of adipocytes at proximity to tumours are also observed. When adipose tissue is in contact with tumours, this tissue disappears and is replaced by a desmoplastic reaction^{42,44,46} (see also Fig. 6b). Reaching the surrounding adipose tissue is therefore a key step in tumour progression. At a clinical level, this switch from a prostate-confined tumour to a locally disseminated cancer is also viewed as a crucial step in the progression of the disease². Based on our *in vitro* experiments, we

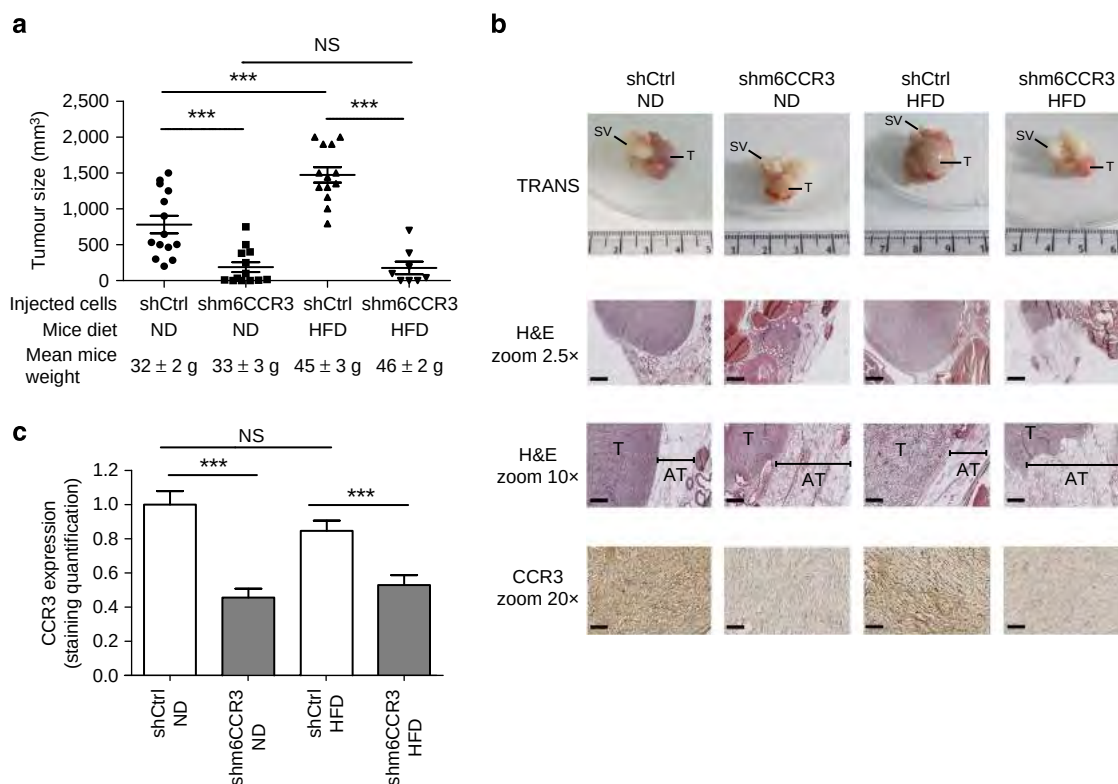


Figure 6 | CCR3 contributes to prostate cancer progression *in vivo* and this event is regulated by obesity. (a) GFP-tagged shCtrl or m6CCR3 transfected TRAMP-C1P3 cells were injected into the prostate (dorsal lobe) of 18 week-old C57BL/6 mice fed a standard rodent diet (normal diet, ND) or a high-fat diet (HFD). Graphs depict the tumour volume measured 21 days after injection. The mean weight of the mice before the injection, as well as the mean tumour size $\pm$ s.e.m. in each group, is shown on the legend ($N \geq 8$ tumours per group). (b) Representative photograph of a tumour from each group taken with white light (Trans) imaging (upper line of the picture; T, tumour; SV, seminal vesicles). The three other lines represent tumour sections from each group after hematoxylin-eosin (H&E) coloration (top and middle, T, tumour; AT, adipose tissue) and CCR3 staining in tumours (lower line). The hypertrophy of adipocytes in obese mice is shown by their comparison with adipocytes from lean mice in mice grafted with the shm6CCR3 cell line (mean size in ND: $56.47 \pm 16.63 \mu\text{m}$ versus mean size in HFD: $133.53 \pm 23.82 \mu\text{m}$, $P < 0.001$, as determined using ImageJ software). Scale bars, respectively, for 2.5, 10 and $20 \times$: 1 mm, 250 and 125 μm . (c) Quantitative expression of CCR3 staining with ImageJ. Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. (three tumours in each group with five fields per tumour). Statistical analysis: *** statistically significant by Student's *t*-test $P < 0.001$, NS, not significant.

propose that this key step could be controlled by mature adipocytes, which promote the migration of tumour cells to PPAT through chemokine secretion. Ability of tumour cells to migrate towards a chemokine gradient indicates that they have developed a metastatic phenotype (with both migratory and invasive capacities)⁸. Interestingly, acquisition of this phenotype might be also facilitated by surrounding PPAT that expresses inflammatory cytokines, including interleukin-6 (ref. 47), and metalloproteinases⁴⁸, both favoring the invasive properties of tumour cells^{49–51}. We used *in vitro* and *in vivo* approaches (murine models) but also human tumours to show that mature adipocytes secrete CCL7, which diffuses through the capsule to the peripheral zone of the prostate. Here CCL7 interacts with the CCR3 receptor to promote cell migration along the chemokine gradient, across the prostate capsule towards PPAT. This axis, with the exception of one *in vitro* study, has not been previously implicated in cancer⁵². Hypertrophic adipocytes secrete large amounts of CCL7, which stimulates adipocyte-dependent directed migration, and then, would facilitate extraprostatic extension in obesity (recapitulated in Fig. 7). The observed increase in migration associated with obesity is totally abrogated when the CCR3/CCL7 axis is inhibited, highlighting its key role in this altered condition. Although the effect of the CCR3/CCL7 axis appears predominant in the enhanced migration of prostate cancer cells, our work underlines that other chemokines and their associated receptors, might be involved in prostate cancer

directed migration towards adipose tissue. First, we demonstrated that CXCR2 and CXCR4 also contribute to this effect (Fig. 1c,d), and inhibition of the CXCR4/CXCL12 axis exhibited a slight but significant effect in obese conditions (Supplementary Fig. 11b). Second, in the presence of CXCR2, CXCR4 and CCR3 blocking mAbs, 40% of cells still migrate, highlighting the involvement of other receptors that remain to be identified (Fig. 1d). As reviewed recently⁵³, multiple chemokines and their receptors (including, in addition to the receptors tested in our study, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR3, CXCR5 and CXCR7) are involved in prostate cancer directed migration. These additional receptors could therefore deserve further investigation in our model. Although not investigated in a context of obesity, a previous study demonstrated that the homing of ovarian cancer cells to the omentum (a large fat pad that extends from the stomach and covers the bowel and the most frequent intra-peritoneal localization of metastatic ovarian cancer) might predominantly involve a CXCR1/CXCL8 axis, at least *in vitro* and in murine models⁴⁶. These results highlight that the homing of tumour cells to surrounding adipose tissue would depend considerably on tumour- and host-dictated characteristics (that is, the specific secretion pattern of adipose depots). Such a concept is supported by our results with other types of cancer demonstrating, at least *in vitro*, that their migration towards Ad-CM is rather dependent on the CXCR2 and CXCR4 receptors, with no involvement of the CCR3 receptor (Supplementary Fig. 5). The absence of CCR3

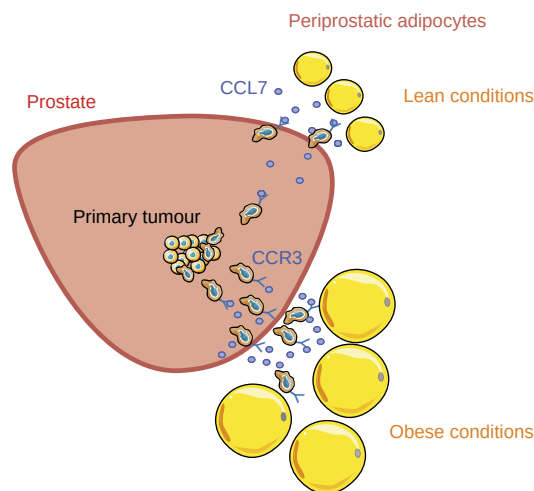


Figure 7 | Schematic representation of the proposed role of PPAT in the local dissemination of prostate cancer and its amplification in obesity.

Mature adipocytes secrete the chemokine CCL7, which diffuses through the capsule to the peripheral zone of the prostate. The interaction between CCL7 and the CCR3 receptor, expressed by invasive tumour cells, promote their migration outside of the prostate gland. Hypertrophic adipocytes secrete larger amounts of CCL7, which increases adipocyte-dependent directed migration facilitating extraprostatic extension in obesity.

involvement in migration towards Ad-CM, despite its expression in other cellular models, is intriguing and is not explained at the present time. It is interesting to note that in contrast to prostate cancer (Supplementary Fig. 7a), the other models have been previously reported secrete CCL7 (refs 29,54). This autocrine secretion could lead to the absence of a CCL7 gradient between tumour cells and Ad-CM, therefore, hindering directed migration. In addition, it has been previously documented that CCR3 activity exhibits a marked sensitivity to relatively small changes in the extracellular environment (such as pH and ionic strength)⁵⁵ that can potentially be achieved by tumour cell metabolism. This could also represent an interesting hypothesis since it has been proposed that prostate cancer cells might exhibit unique metabolic features with a higher dependence on lipid metabolism than aerobic glycolysis for growth and survival⁵⁶.

In conclusion, deciphering the pivotal chemokine/chemokine receptor axis for adipose tissue-induced chemotaxis in each tumour type would considerably help to set up specific therapeutic strategies especially in obese patients since increased local dissemination is also observed for other cancer types, breast cancer providing the most convincing evidence to date⁵⁷. In human prostate cancer, we showed that the expression of the CCR3 receptor, which is upregulated in obese patients, is associated with aggressive prostate cancer with extended localization and a higher risk of both BCR and treatment failure. To our knowledge, the correlation between expression of a chemokine receptor and these different parameters of prostate cancer progression has never been reported within the same study. Our results highlight the clinical relevance of CCR3 expression in prostate cancer local dissemination. Indeed, first, CCR3 expression is correlated with Gleason score that reflects both the extent of glandular differentiation and the pattern of tumour growth in the prostatic stroma⁵⁸. In fact, higher Gleason scores are characterized by isolated islets of cancer cells that are able to locally disseminate⁵⁸. Second, prostate capsule penetration and local spread, which correspond with pT stage, are also strongly correlated with CCR3 expression. Third, our experiments also suggest that cells expressing higher levels of

CCR3 are recruited to the invasive front and this effect is amplified in overweight and obese patients (Supplementary Fig. 13). Therefore, our results suggest new strategies for the treatment of advanced prostate cancer involving CCR3 antagonists, which are currently being developed for other diseases including asthma¹⁷.

Methods

Antibodies. mAbs against CCR1 (clone 141-2, reference D063-3) and CCR3 (clone 444-11, reference D085-3) obtained from MBL International (Woburn, MA, USA) were used for flow cytometry ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) and as blocking antibodies ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) in the migration assays. Anti-CCR2 (clone E68, reference ab32144), used for flow cytometry ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$), and anti-CCR3 (clone Y31, reference ab32512), used for immunohistochemistry ($15 \mu\text{g ml}^{-1}$), mAbs were purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA). Monoclonal Abs against CXCR1 (Clone 42705, reference MAB330), CXCR2 (clone 48311, reference MAB331) and CXCR4 (clone 44716, reference MAB172) were used for flow cytometry ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) and as blocking antibodies in the migration assays ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), and were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). mAbs against human CCL7 (Clone 36320, reference MAB282) and pAbs against murine CCL7 (reference AF-456) were used as blocking antibodies in the migration assays ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). CXCL12 blocking mAbs (Clone 79014) directed against murine CXCL12 were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and used for migration assay ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Inhibitors and recombinant chemokines. Recombinant CCL7 protein was obtained from Peprotech (Rocky hill, CT, USA). The antagonist of CXCR1 and CXCR2, SB225002 (ref. 19) was purchased from Tocris (Bristol, UK) and used at final concentrations from 1 to 100 nM. SB225002 inhibits neutrophil chemotaxis in response to CXCL1 and IL8 *in vitro* ($\text{IC}_{50} = 20 \text{ nM}$)¹⁹. The CXCR4 antagonist, AMD3100, which inhibits CXCL12-stimulated chemotaxis ($\text{IC}_{50} = 50 \text{ nM}$)⁵⁹, was purchased from Sigma-Aldrich and used at final concentrations from 1 to 100 nM. The inhibitor targeting CCR2, sc-202525, which inhibits CCL2-induced chemotaxis ($\text{IC}_{50} = 10 \text{ nM}$)²⁰ was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TE, USA) and used at final concentrations from 1 to 25 nM. The inhibitor targeting CCR1 and CCR3, UCB35625 was purchased from Tocris (Bristol, UK) and used at final concentrations from 1 to 200 nM. This molecule inhibits CCL11-induced chemotaxis in cells transfected with CCR3 (with an IC_{50} value of 93.8 nM)²¹. The maximal doses (between two- and 2.5-fold the IC_{50}) do not exhibit toxicity on prostate cancer cells as determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays after 24 h exposure ($<15\%$ decrease in the number of treated cells compared with untreated control). All the molecules were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). The final DMSO concentration of each dilution was used in all corresponding controls.

Cell lines and culture. The human prostate tumour cell lines LNCaP (ATCC CRL-1740), C4-2B (from DSMZ, Braunschweig, Germany), Du-145 (ATCC HTB-81) and PC-3 (ATCC CRL-1435; provided by Dr Olivier Cuvillier, IPBS, Toulouse, France) were used in this study. LNCaP, Du-145 and PC-3 are derived from human prostate carcinoma metastases (lymphonodal, brain and bone lesions, respectively⁶⁰⁻⁶²). C4-2B cell line was derived from a bone metastasis after orthotopic transplantation of C4-2 cells (subclone of LNCaP) in nude mice⁶³.

The human colon carcinoma cell lines sw480 (ATCC CCL-228) and sw620 (ATCC CCL-227; provided by Dr A. Ferrand, CRCT UMR 1037, Toulouse, France), the pancreatic cancer cell line CAPAN (ATCC HTB-79) and PANC-1 (ATCC CRL-2547) (provided by Dr C. Bousquet, CRCT UMR1037, Toulouse, France), the breast cancer cell lines T-47D (ATCC HTB-133) and MDA-MB321 (ATCC CRM-HTB-26; provided by Dr K. Bistricky, LBME), the melanoma cell lines 501mel and Lu1205 (gifts from Dr L. Larrue, Institut Curie, Orsay, France). All cell lines were cultured in RPMI medium (Invitrogen, Auckland, NZ) supplemented with 10% FCS, 125 mg ml^{-1} streptomycin and 125 UI ml^{-1} penicillin, in a humidified atmosphere of 5% CO_2 .

The murine prostate cancer cell line TRAMP-C1P3 (ATCC CRL-2730)³⁹ was kindly provided by Dr Richard P. Ciavarrà (Eastern Virginia Medical School, Norfolk, VA) and cultured in DMEM medium (Invitrogen, Auckland, NZ) supplemented with 10% FCS, 5 mg ml^{-1} insulin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 10 nM dihydrotestosterone (Sigma-Aldrich) and antibiotics. The TRAMP-C1P3 was obtained using an *in vivo* selection scheme of intraprostatic implantation of TRAMP-C1 cells, derived from a prostate adenocarcinoma in transgenic C57BL/6 mice expressing the antigen SV40 under the control of the prostate specific probasin promoter³⁹. All the cell lines were used within 2 months after resuscitation of frozen aliquots. To obtain TRAMP-C1P3 cells with stable downregulation of CCR3 expression, cells were transduced with the lentiviral vector PLVIMH containing either control or shRNA coding sequences for murine CCR3 (NM_009914). Note that cells transduced with lentiviral vectors also expressed GFP. Interference sequences were generated with the 'siDesign' Dharmacon tool. The sequences of the sense strands of the shRNAs generated are:

m4CCR3 5'-cgctgtccccAGACCACACCTATGAATAttcaagagaTATTCATAGG GTGTGGTCTttttgaaat-3', m5CCR3 5'-cgctgtccccGACCACACCTATGAATAT ttaagagaATATTCATAGGGTGTGGTCTttttgaaat-3' m6CCR3 5'-cgctgtccccGGTG AGAGGTTCGGAAACttcaagagaGTTTCCGGAACCTCTCACCTttttgaaat-3' under the control of the H1 promoter. Nucleotide sequences targeting CCR3 are shown in capital letters, whereas the sequence responsible for the hairpin structure and sequences necessary for the directional cloning are shown in lowercase letters. 293T cells were kindly provided by Genethon (France) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FCS. Generation of 293T-LVTHM-shCCR3 and preparation of high-titer lentiviral vector pseudotyped with VSV-G protein was performed as followed. Subconfluent 293T cells were cotransfected with 20 µg of a plasmid vector, 15 µg of pCMV-ΔR8.91, and 5 µg of pMD2G-VSVG by calcium phosphate precipitation. After 16 h medium was changed, and recombinant lentivirus vectors were harvested 24 h later. Cells (50×10^3) were plated on 35-mm dishes 24 h before transduction with viral vectors at a multiplicity of infection of 10:1 (refs 64,65). One week after transduction and amplification, sterile fluorescence-activated cell sorting was used to select a population consisting of >90% GFP-expressing cells. The cells were kept in culture for a maximum of 1 month and the expression of GFP was checked every week.

The murine 3T3-F442A pre-adipocyte cell line was cultured in DMEM (Invitrogen, Auckland, NZ) supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine and antibiotics. Differentiation was induced by incubating confluent cells in differentiation medium (DMEM supplemented with 10% FCS and 50 nM insulin) for up to 14 days after which more than 90% of the cells had accumulated fat droplets.

Ad-CM was obtained by incubating the murine adipocytes in DMEM medium containing no FCS and 1% BSA (Sigma-Aldrich) and, after 12 h, the medium was harvested and immediately stored at -80°C . Media from a six-well plate in which the cells were differentiated was pooled to create one sample of Ad-CM. The frozen aliquots were only used once, as for all the conditioned media used in our study. For migration assays, the conditioned medium was diluted to one half in DMEM medium containing 1% BSA. Cell lines were authenticated on the basis of viability, recovery, growth rate and morphology. Cell lines were regularly tested for mycoplasma contamination.

Mice. Mice were handled in accordance with National Institute of Medical Research (INSERM) principles and guidelines. C57Bl6/J male mice were obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France). Mice were housed conventionally in an animal room at constant temperature ($20\text{--}22^\circ\text{C}$) and humidity (50–60%), and with a 12 h light–dark cycle. All the mice had free access to food and water throughout the experiment. The C57Bl6/J mice were assigned to a normal diet (PicoLab Rodent Diet 20, Purina Mills, Inc., Brentwood, MO, USA) or HFD (Research Diets, Inc., New Brunswick, New Jersey, USA). The energy contents of the diets were as follows: 16% protein, 81% carbohydrate and 4% fat for the normal diet; 20% protein, 20% carbohydrate and 60% fat for the HFD. C57Bl6/J mice (initially 10 weeks old) were fed a normal diet or a HFD for 8–10 weeks. A 10-week period of HFD is used to mimic the development of obesity in humans associated with the emergence of insulin resistance and low-grade inflammation⁶⁶. To collect visceral adipose tissue (mu-VAT), mice were killed at 20 weeks. For intraprostatic injection of TRAMP-C1P3 cells expressing control (Ctrl) or anti-CCR3 shRNA, we used mice fed either a normal diet or a HFD at 18 weeks. The mice continued to be fed either a normal diet or HFD and were killed 3 weeks later (21 weeks old). The Midi-Pyrénées animal ethics committee approved all procedures.

Conditioned medium from mu-VAT. Mu-VAT was dissected from lean or obese mice immediately post mortem. Mu-VAT was weighed and 1 g of tissue was placed immediately in 8 ml of DMEM medium supplemented with 1% BSA. Mu-VAT was incubated overnight at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 , the medium was collected (mu-VAT-CM) and stored in small aliquots at -80°C . Mu-VAT-CM was obtained from three animals from each group (lean or obese).

Conditioned medium from isolated adipocytes and SVF. In particular experiments (see text), mature adipocytes and SVF cells were isolated from whole mu-VAT. Briefly, mu-VAT (1 g of tissue) was incubated in 8 ml of DMEM, 1% BSA in the presence of liberase at a final concentration of $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Roche Applied Science, Meylan, France) for 30 min at 37°C under shaking. After digestion, FCS at a final 5% concentration was added to inhibit the liberase. The samples were then centrifuged (20 min, room temperature, 100 g) to separate adipocytes (floating cells) from the SVF (pellet). Six animals from each group (lean or obese) were used for one experiment. The pooled isolated primary adipocytes and SVF cells were then cultured (5×10^6 cells) in 5 ml of DMEM (without serum) containing 1% BSA for 24 h and the CM was collected at the end of the incubation period and immediately stored at -80°C .

Hu-PPAT samples. hu-PPAT samples were collected from radical prostatectomy in accordance with the recommendations of the ethics committee of the Rangueil Hospital (Toulouse, France). All patients gave their informed consent to participate to this study, which was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki

Principles as revised in 2000. PPAT samples were collected at a distance from the tumours and were macroscopically devoid of fibrosis. These samples were collected and treated within 15 min after the surgery to limit the delay between devascularization and freezing, thus ensuring the preservation of labile molecules. PPAT samples were weighed and 1 g of tissue was placed immediately in 5 ml of DMEM supplemented with 1% BSA. Hu-PPAT was incubated overnight at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 and the medium was collected (hu-PPAT-CM). For each patient ($n=5$), hu-PPAT-CM was separated into small aliquots and immediately stored at -80°C . In specified experiments, staged biopsies were performed in three independent prostatectomy pieces (punch biopsy with 4 mm trocar). These biopsies were performed in PPAT, at the same level as the prostate capsule and inside the prostate gland (at 2 and 4 cm from the prostate capsule, for biopsy 2 and 3, respectively). After sampling, the tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . For CCL7 ELISA assays, tissues were dissociated with a tissue dissociator, which enables the release of secreted substances from the tissue (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Inc., Auburn, CA, USA), in 1 ml of buffer containing PBS $1 \times$ and 1% BSA.

Ex vivo differentiation of progenitors cells from the SVF of hu-PPAT. PPAT pieces were submitted to collagenase digestion as previously described in Methods, then centrifuged to separate adipocytes from SVF (pellet). The SVF was then used for *ex vivo* differentiation. Briefly, confluent cells (day 0) were differentiated in DMEM containing 1 µM insulin, 10 µM dexamethasone, 0.5 mM IBMX, supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine and antibiotics. Two days post induction, medium was changed to DMEM containing only 1 µM insulin, 10% FBS with glutamine and antibiotics. After 10–14 days of culture in lipogenic medium, Ad-CM was attained by incubating the obtained mature adipocytes (obtained from human PPAT) in DMEM medium containing no FCS and 1% BSA (Sigma-Aldrich) for 12 h, after which, the medium was harvested, and immediately stored at -80°C . The media from each six-well plate of differentiated cells was pooled to create one sample of Ad-CM. The frozen aliquots were only used once, as for all the conditioned media used in our study. For migration assays, the conditioned medium was diluted to one half in DMEM medium containing 1% BSA.

Human visceral adipose tissue. Human visceral adipose tissue (hu-VAT) was collected according to the guidelines of and the full ethical approval from the Ethics Committee of Toulouse Rangueil and Nancy Jeanne d'Arc Hospitals. All patients gave their informed consent to participate in the study and research was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki Principles as revised in 2000 (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). Hu-VAT samples from normal weight individuals were obtained from eight patients undergoing intra-abdominal surgery (aged 42.7 ± 4.5 years, BMI $23.1 \pm 3.3 \text{ kg m}^{-2}$). Hu-VAT from obese individuals was obtained from 18 patients suffering from morbid obesity grade III undergoing bariatric surgery (aged 44.5 ± 1.8 years, BMI $47.6 \pm 1.3 \text{ kg m}^{-2}$). Tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen after removal and stored at -80°C . Samples were then used for mRNA extraction and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR).

Boyden chamber migration assays. For cell migration, 2×10^5 serum-deprived cells were seeded in the upper chamber of Transwell plates (obtained from Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany, 8 µM pores). The lower chamber was filled with either DMEM without serum, DMEM containing 10% FCS or Ad-CM. Similar experiments were also performed with lower chambers filled with mu-VAT-CM, primary Ad-CM, SVF-CM (from lean or obese mice) or hu-PPAT-CM. After 12 h incubation at 37°C , non-migrated cells were removed by wiping the upper side of the membranes with a cotton swab. This step was omitted for a control assay to assess the total number of viable cells at the end of the experiment. The transmigrated cells present in the undersurface of the inserts were stained with Toluidine blue 1% supplemented with 0.1 M borax (Sigma, St Louis, MO, USA). Membranes were then cut and incubated in a lysis buffer (Tris-HCl 6.25 mM (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 10% β-mercaptoethanol). Absorbance at 570 nm was measured with a 100 µl aliquot in duplicate transferred to a 96-well plate (µQUANT from Biotek Instrument Inc, Winooski, VT, USA). In particular experiments, cells were pre-incubated for 30 min at 37°C with blocking mAbs directed against CCR3, CCL7 or control IgG at a final concentration of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ or with pharmacological inhibitors against CXCR1/2, CXCR4, CCR1/CCR3 or CCR2. Experiments with recombinant chemokine CCL7 were also performed. In this case, the chemokine was added to the culture medium containing 0.1% BSA without serum in the lower chamber.

Flow cytometry and ELISA. For flow cytometry analyses, 1×10^6 prostate tumour cells were fixed using paraformaldehyde solution (3.7% diluted in PBS) during 20 min at 4°C . After washing with PBS, cells are incubated for 2 h at 4°C with $10\text{--}20 \mu\text{g ml}^{-1}$ of mAbs (as recommended by the manufacturer) or matched control isotypes at similar concentrations. After washing with PBS containing 0.5% BSA and 2% FCS, cells were incubated for 30 min at 4°C with secondary fluorescein-labelled IgG. The cells were analysed in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lanes, NJ). Secreted murine and human CCL7 were

Table 2 | Primers used for RT-qPCR analysis.

Genes	Species	Forward primer	Reverse primer	[C]
CCL7	Murine	5'-AAGATCCCCAAGAGGAATCTCAA-3'	5'-CTTCCCAGGGACACCGACTA-3'	900 nM
CCL7	Human	5'-AAACCTCCAATTCTCATGTGGAA-3'	5'-CAGAAGTGCTGCAGAGGCTTT-3'	900 nM
Leptin	Murine	5'-GGGCTTCACCCATTCTGA-3'	5'-TGGCTATCTGCAGCACATTTTG-3'	900 nM
Leptin	Human	5'-CCTTCCAGAAACGTGATCCAA-3'	5'-GGCCAGCAGCTGAAGAAGAT-3'	900 nM
Adiponectin	Murine	5'-TGGAATGACAGGAGCTGAAGG-3'	5'-TATAAGCGGCTTCTCCAGGCT-3'	300 nM
Adiponectin	Human	5'-GCAGAGATGGCACCCTG	5'-GGTTTCACCGATGTCTCCCTTA-3'	900 nM
TNF-α	Murine	5'-TGGGACAGTGACCTGGACTGT-3'	5'-TTCGGAAGCCCATTTGAGT-3'	300 nM
TNF-α	Human	5'-CCGAGTCTGGGCAAGTCTAC-3'	5'-TGGGAAGGTTGGATGTTCTGT-3'	300 nM
GAPDH	Murine and Human	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	500 nM
HPRT	Murine and Human	5'-TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC-3'	5'-GGACGCAGCAACTGACATTTTC-3'	500 nM

RT-qPCR, quantitative reverse transcription PCR.

quantified with an ELISA kit from Peprotech and R&D Systems, respectively, according to the protocols provided by the manufacturers. Secreted murine CXCL12 was quantified with an ELISA kit from R&D systems, according to the protocols provided by the manufacturers.

RNA extraction and RT-qPCR. Total RNAs were extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Gene expression was analysed using RT-qPCR. Total RNAs (1 µg) were reverse transcribed for 60 min at 37 °C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Auckland, NZ) in the presence of a random hexamer. A minus reverse transcriptase reaction was performed in parallel to ensure the absence of genomic DNA contamination. RT-qPCR was performed starting with 25 ng of cDNA and 300, 500 or 900 nM concentration of a mix of sense/antisense primers (depending on genes) in a final volume of 25 µl using the SYBR Green Universal PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Fluorescence was monitored and analysed in a GeneAmp 7300 detection system instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA). Analysis of housekeeping genes HPRT and GAPDH (500 nM) was performed in parallel to normalize for gene expression. Data were analysed by the 2^{-ΔΔCt} method and presented as fold change relative to a control sample after normalization against the expression of housekeeping genes. Here Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. All primers used in this study have been validated for PCR efficiency and are presented in Table 2.

Analysis of the adipocyte secretome by mass spectrometry. Ad-CM (serum- and phenol red-free) was collected on ice, centrifuged and filtered to remove cell debris and supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). A total of 5 ml of Ad-CM was concentrated with StrataClean resin (Stevens, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After reduction and alkylation of cysteine, the sample was separated by 12% acrylamide SDS-PAGE. Proteins were visualized by Coomassie Blue staining and each lane was cut into 13 homogenous slices and subjected to in-gel tryptic digestion. The tryptic digest was analysed by nano liquid chromatography coupled with tandem-mass spectrometry with an Ultimate3000 system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)⁶⁷, except that peptides were eluted with a 5–50% gradient of solvent B for 60 min at a 300 nl min⁻¹ flow rate. Mascot was used to automatically extract peak lists from raw files. MS/MS data were searched against all entries in the *Mus musculus* database and identified peptides were validated with in-house software⁶⁷, except that 1% false discovery rate was used for validation.

Surgical orthotopic implantation of TRAMP-C1P3 cells. Intraprostatic grafts of either TRAMP-C1P3 shCtrl or shm6CCCR3 were established in 18 week-old C57BL/6 mice fed either a normal diet or HFD by surgical orthotopic implantation. Mice were anaesthetized by isoflurane inhalation and placed in the supine position. A lower midline abdominal incision was made and 30 µl of tumour cell suspension (2 × 10⁶ cells) was injected into the dorsal lobe of the prostate with a 30-gauge needle and glass syringe. The surgical wound was closed in two layers with 4–0 Dexon interrupted sutures. All procedures were performed with a dissecting microscope. The local Institutional Animal Care and Use Committee approved the experimental protocols described in the study.

Autopsy and histology. All mice were killed 21 days later. A midline incision was made to access to the abdominal cavity. The tumours were removed *en bloc* with the seminal vesicles and the surrounding adipose tissue, weighed, and a picture of the tumours was taken. Tumours were then fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin to confirm the nature of the disease and to assess extraprostatic extension and the aspect of adipose tissue. CCR3 expression was determined with the protocol described for human samples (see below).

Patients and prostate cancer TMA. The first TMA, previously developed by the Pathology Department of Toulouse Rangueil Hospital, containing specimens of prostate cancer (*n* = 91 in duplicates) and normal epithelium (*n* = 10 in duplicates) was used to report CCR3 expression in relation to cancer differentiation⁶⁸. The sum of tumour Gleason scores was recorded for each microarray. The second fully annotated TMA was engineered from prostatectomy pieces of 101 patients that underwent surgery between 1 February 2010 and 1 December 2011 in the Department of Urology of the University Hospital of Toulouse (directed by Professor P. Rischmann). The clinical and biochemical (PSA measurement) follow-up of the patients was updated in March 2015. Surgical treatment consisted of a robot-assisted, open-retropubic radical prostatectomy. Prostatectomy was associated in some cases with ilio-obturator bilateral lymphadenectomy (standard or extended). All patients included in the study had localized disease without metastasis (as assessed by clinical and radiological examinations) at the time of the surgery. All patients signed a consent form for the use of their tissue samples for scientific purposes before surgical intervention. The surgery specimen was treated within 15 min of its removal to limit the delay between devascularization and freezing, thus ensuring the preservation of labile molecules. Tissue samples were placed in cryovials, frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Two pathologists (Dr Catherine Mazerolles and Dr Youri Socrier), who were blind to clinical data, independently selected the areas of interest used for the preparation of TMA. Selected tumour areas had a morphology and histological differentiation similar to the tumour Gleason score of the whole tumour or the worst Gleason score found in the tumour in the case of multifocal tumours. After selecting the sample block, 0.2 mm diameter core samples were included according to a predetermined pattern in a recipient block. Gleason scores, pathological and clinical stage, surgical margins (a positive surgical margin was defined as cancer cells in contact with the inked specimen surface), follow-up time and BCR, as defined by the European Association of Urology guidelines by two PSA readings > 0.2 ng ml⁻¹ (ref. 69), were available for all patients. Surgical treatment failure was defined by patients exhibiting either BCR, locoregional recurrence or distant metastases or by the use of adjuvant radiation or hormonal deprivation therapy, as previously defined³⁸.

Analysis of the expression of CCR3 by immunohistochemistry. Immunohistochemical experiments were performed to detect the expression of CCR3 in prostate cancer TMA. Immunostaining was performed with the EnVision FLEX Mini Kit, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus; Dako France, Trappes, France). The TMA were immersed in xylene to remove paraffin and then rehydrated by successive baths of graded alcohol (100–70% and then distilled water), followed by treatment with the antigen unmasking solution for antigen retrieving (Citrate Target Retrieval Solution from Dako) in a water bath at 95 °C. After saturation of endogenous peroxidases (Peroxidase blocking solution from Dako), the samples were incubated with the primary anti-CCR3 antibody (diluted to 1/100). TMAs were then incubated with FLEX/HRP conjugate secondary antibody (EnVision FLEX + Mouse and Rabbit from Dako). The samples were rinsed, then treated with liquid DAB (BioGenex, San Ramon, CA) and washed with distilled water. Finally, the counter-staining was carried out with hematoxylin (Dako) and the various TMA were mounted with Eukitt reagent. Two pathologists, who were blind to clinical data, independently scored CCR3 expression in human tumours as negative, low, moderate (mid) or high (manual scoring). None of the tumours were negative for CCR3 expression. The slides were then digitally scanned via Hamamatsu Nanozoomer 2.0RS and analysed with the device software provided by the manufacturer. The intensity of CCR3 staining has been quantified by computer through the use of ImageJ software, with tumour staining separated using deconvolution plug-in^{35,36}. As a first step, we used a color deconvolution technique to separate the pure DAB and hematoxylin stained areas leaving a complimentary image. The pixel intensities of separated DAB or hematoxylin images range from 0 to 255. Value 0 represents the lightest shade of the color while 255 represent the darkest shade of the color in the image. To assign an automated score by judging the pure DAB staining pattern, a histogram profile of every image,

that is, the number of pixels of a specific intensity value versus their respective intensity was raised using ImageJ standard programme feature. Note that we excluded the pixel intensity values corresponding to the unspecific staining. Intensity for each tumour gland was quantified after manual selection of the area of interest under the supervision of pathologists. Finally, we verified that the results obtained were in accordance to the three groups defined by the manual scoring (median signal $\pm$ s.e.m., low expression: 28.5 ± 4.1 , moderate: 46.2 ± 2.0 , high: 56.0 ± 3.1 arbitrary units).

Expression of CCR3 in pT3 human tumours. Frozen tissues obtained after radical prostatectomy of eight patients with pT3a or pT3b prostate cancer, defined by two pathologists (Dr Catherine Mazerolles and Dr Youri Socrier), were analysed for CCR3 expression. Four of these patients presented BMI < 25 and four BMI > 25. All these patients underwent surgery between 1 February 2010 and 1 December 2011 in the Department of Urology of the University Hospital of Toulouse (directed by Professor P. Rischmann) and signed a consent form for the use of their tissue samples for scientific purposes before surgical intervention. The staining of CCR3 and slides digitalization has been performed as previously. Note that some blood vessels also express CCR3 but that quantification was only performed in tumour glands under the supervision of two pathologists.

Analysis of cell number by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay.

PC-3 or TRAMP-C1P3 cells transfected with either a control vector (shCtrl) or an sh directed against CCR3 (shC6CCR3) were plated (3×10^3 cells) in quadruplicate for each time point in a 96-well plate. Following the attachment of all cells after 6 h, the number of viable cells was measured by an MTT assay. Briefly, 100 μ l of MTT (50 mg ml⁻¹) was added to the wells and incubated for 2 h. After aspiration, 100 μ l of DMSO was added to each well and incubated for 15 min at 37 °C to solubilize the bio-reduced coloured MTT-formazan and to lyse the cells. The optical density was read at 570 nm in a microplate reader.

Statistical analysis. The statistical significance of differences between means was evaluated with unpaired Student's *t*-tests. All statistical tests were two-sided. *P* values below 0.05 (*), <0.01 (**) and <0.001 (***) were deemed as significant and 'NS' was used to denote not significant. For the analysis of TMA, we first performed a descriptive analysis with the clinical and biological features of patients. We then examined the clinical and biological characteristics of patients to identify patients with aggressive and extended tumours. For the correlation between CCR3 expression and quantitative data (for example, prostate weight) or variables with more than two ordered classes regarding disease severity (for example, Gleason score or tumour stage), we used a Spearman's rank correlation test assuming a monotonic relation between considered variables. We used the Student's *t*-test to correlate CCR3 expression to non-ordered variables represented by a category (for example, presence or absence of lymphatic emboli). Non-parametric tests are more conservative than parametric tests. In some cases, we also expected a lack of statistical power given the limited size of some sub-populations of variables. Leptin and CCL7 expression in hu-VAT were correlated using Pearson's correlation analysis.

References

- Magi-Galluzzi, C. *et al.* International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 3: extraprostatic extension, lymphovascular invasion and locally advanced disease. *Mod. Pathol.* **24**, 26–38 (2011).
- Kapoor, J. *et al.* Extraprostatic extension into periprostatic fat is a more important determinant of prostate cancer recurrence than an invasive phenotype. *J. Urol.* **190**, 2061–2066 (2013).
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 85–97 (2011).
- Wang, Y. Y. *et al.* Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett.* **324**, 142–151 (2012).
- Allott, E. H., Masko, E. M. & Freedland, S. J. Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. *Eur. Urol.* **63**, 800–809 (2013).
- Parker, A. S. *et al.* Obese men have more advanced and more aggressive prostate cancer at time of surgery than non-obese men after adjusting for screening PSA level and age: results from two independent nested case-control studies. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **16**, 352–356 (2013).
- van Roermund, J. G. *et al.* Periprostatic fat correlates with tumour aggressiveness in prostate cancer patients. *BJU Int.* **107**, 1775–1779 (2011).
- Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 540–550 (2004).
- Vindrieux, D., Escobar, P. & Lazennec, G. Emerging roles of chemokines in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **16**, 663–673 (2009).
- Zhang, S. *et al.* Chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 expression are associated with perineural invasion of prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **27**, 62 (2008).
- Lu, Y. *et al.* CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J. Cell Biochem.* **101**, 676–685 (2007).
- Murphy, C. *et al.* Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4117–4127 (2005).
- Zhu, F., Liu, P., Li, J. & Zhang, Y. Eotaxin-1 promotes prostate cancer cell invasion via activation of the CCR3-ERK pathway and upregulation of MMP-3 expression. *Oncol. Rep.* **31**, 2049–2054 (2014).
- Lee, Y. J. *et al.* Chemokine receptor CCR3 expression in malignant cutaneous tumors. *Ann. Dermatol.* **22**, 412–417 (2010).
- Johrer, K. *et al.* Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2459–2465 (2005).
- Huber, J. *et al.* CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3215–3221 (2008).
- Elsner, J., Escher, S. E. & Forssmann, U. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy* **59**, 1243–1258 (2004).
- Rosenkilde, M. M. *et al.* Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *J. Biol. Chem.* **279**, 3033–3041 (2004).
- White, J. R. *et al.* Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J. Biol. Chem.* **273**, 10095–10098 (1998).
- Cherney, R. J. *et al.* Discovery of disubstituted cyclohexanes as a new class of CC chemokine receptor 2 antagonists. *J. Med. Chem.* **51**, 721–724 (2008).
- Sabroe, I. A. E. A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. *J. Biol. Chem.* **275**, 25985–25992 (2000).
- Muller, C., Nieto, L. & Valet, P. In Adipose Tissue and Cancer 121–146 (2013).
- Proudfoot, A. E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 106–115 (2002).
- Xu, L. L. *et al.* Monocyte chemotactic protein-3 (MCP3) interacts with multiple leukocyte receptors: binding and signaling of MCP3 through shared as well as unique receptors on monocytes and neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2612–2617 (1995).
- Celis, J. E. *et al.* Identification of extracellular and intracellular signaling components of the mammary adipose tissue and its interstitial fluid in high risk breast cancer patients: toward dissecting the molecular circuitry of epithelial-adipocyte stromal cell interactions. *Mol. Cell Proteomics* **4**, 492–522 (2005).
- Kabir, S. M., Lee, E. S. & Son, D. S. Chemokine network during adipogenesis in 3T3-L1 cells: Differential response between growth and proinflammatory factor in preadipocytes vs. adipocytes. *Adipocyte* **3**, 97–106 (2014).
- Cheng, J. W. *et al.* The role of CXCL12 and CCL7 chemokines in immune regulation, embryonic development, and tissue regeneration. *Cytokine* **69**, 277–283 (2014).
- Hwang, T. L. *et al.* CCL7 and CCL21 overexpression in gastric cancer is associated with lymph node metastasis and poor prognosis. *World J. Gastroenterol.* **18**, 1249–1256 (2012).
- Cho, Y. B. *et al.* CC chemokine ligand 7 expression in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol. Rep.* **28**, 689–694 (2012).
- Ayala, A. G., Ro, J. Y., Babaian, R., Troncoso, P. & Grignon, D. J. The prostatic capsule: does it exist? Its importance in the staging and treatment of prostatic carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **13**, 21–27 (1989).
- Couillard, C. *et al.* Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**, 782–788 (2000).
- Kim, D. *et al.* CXCL12 secreted from adipose tissue recruits macrophages and induces insulin resistance in mice. *Diabetologia* **57**, 1456–1465 (2014).
- Pierorazio, P. M., Walsh, P. C., Partin, A. W. & Epstein, J. I. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int.* **111**, 753–760 (2013).
- Stark, J. R. *et al.* Gleason score and lethal prostate cancer: does 3 + 4 = 4 + 3? *J. Clin. Oncol.* **27**, 3459–3464 (2009).
- Sysel, A. M., Valli, V. E., Nagle, R. B. & Bauer, J. A. Immunohistochemical quantification of the vitamin B12 transport protein (TCII), cell surface receptor (TCII-R) and Ki-67 in human tumor xenografts. *Anticancer Res.* **33**, 4203–4212 (2013).
- Chatterjee, S. *et al.* Quantitative immunohistochemical analysis reveals association between sodium iodide symporter and estrogen receptor expression in breast cancer. *PLoS ONE* **8**, e54055 (2013).
- Kukreja, P., Abdel-Mageed, A. B., Mondal, D., Liu, K. & Agrawal, K. C. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res.* **65**, 9891–9898 (2005).
- Malavaud, B. *et al.* Sphingosine kinase-1 activity and expression in human prostate cancer resection specimens. *Eur. J. Cancer* **46**, 3417–3424 (2010).
- Somers, K. D. *et al.* Orthotopic treatment model of prostate cancer and metastasis in the immunocompetent mouse: efficacy of flt3 ligand immunotherapy. *Int. J. Cancer* **107**, 773–780 (2003).

40. Lin, S., Thomas, T. C., Storlien, L. H. & Huang, X. F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57BL/6J mice. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**, 639–646 (2000).
41. Nieman, K. M., Romero, I. L., Van Houten, B. & Lengyel, E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 1533–1541 (2013).
42. Bochet, L. *et al.* Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* **73**, 5657–5668 (2013).
43. Dirat, B. *et al.* Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* **71**, 2455–2465 (2011).
44. Dirat, B., Bochet, L., Escourrou, G., Valet, P. & Muller, C. Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes? *Endocr. Dev.* **19**, 45–52 (2010).
45. Hefetz-Sela, S. & Scherer, P. E. Adipocytes: impact on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* **138**, 197–210 (2013).
46. Nieman, K. M. *et al.* Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* **17**, 1498–1503 (2011).
47. Finley, D. S. *et al.* Periprostic adipose tissue as a modulator of prostate cancer aggressiveness. *J. Urol.* **182**, 1621–1627 (2009).
48. Ribeiro, R. *et al.* Human periprostic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness *in vitro*. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31**, 32 (2012).
49. Walter, M., Liang, S., Ghosh, S., Hornsby, P. J. & Li, R. *et al.* Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* **28**, 2745–2755 (2009).
50. Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 41–51 (2007).
51. Chambers, A. F. & Matrisian, L. M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl Cancer Inst.* **89**, 1260–1270 (1997).
52. Jung, D. W. *et al.* Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int. J. Cancer* **127**, 332–344 (2010).
53. Salazar, N., Castellan, M., Shirodkar, S. S. & Lokeshwar, B. L. Chemokines and chemokine receptors as promoters of prostate cancer growth and progression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **23**, 77–91 (2013).
54. Asiedu, M. K., Ingle, J. N., Behrens, M. D., Radisky, D. C. & Knutson, K. L. TGF β /TNF α -mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Res.* **71**, 4707–4719 (2011).
55. Dairaghi, D. J., Oldham, E. R., Bacon, K. B. & Schall, T. J. Chemokine receptor CCR3 function is highly dependent on local pH and ionic strength. *J. Biol. Chem.* **272**, 28206–28209 (1997).
56. Zadra, G., Photopoulos, C. & Loda, M. The fat side of prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 1518–1532 (2013).
57. Ewertz, M. *et al.* Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **29**, 25–31 (2011).
58. Humphrey, P. A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod. Pathol.* **17**, 292–306 (2004).
59. Fricker, S. P. *et al.* Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 588–596 (2006).
60. Horoszewicz, J. S. *et al.* The LNCaP cell line—a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog. Clin. Biol. Res.* **37**, 115–132 (1980).
61. Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H. & Paulson, D. F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer* **21**, 274–281 (1978).
62. Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. & Jones, L. W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17**, 16–23 (1979).
63. Thalmann, G. N. *et al.* Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res.* **54**, 2577–2581 (1994).
64. Delenda, C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J. Gene Med.* **6**(Suppl 1): S125–S138 (2004).
65. Bousquet, E. *et al.* Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res.* **69**, 6092–6099 (2009).
66. Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A. & Thorens, B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E834–E842 (2002).
67. Gautier, V. *et al.* Label-free quantification and shotgun analysis of complex proteomes by one-dimensional SDS-PAGE/NanoLC-MS: evaluation for the large scale analysis of inflammatory human endothelial cells. *Mol. Cell Proteomics* **11**, 527–539 (2012).
68. Brizuela, L. *et al.* First evidence of sphingosine 1-phosphate lyase protein expression and activity downregulation in human neoplasm: implication for resistance to therapeutics in prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 1841–1851 (2012).
69. Heidenreich, A. *et al.* EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* **65**, 467–479 (2014).

Acknowledgements

This study was supported by the French National Cancer Institute (INCA PL 2010–2014 to P.V. and C.M.), the ‘Ligue Régionale Midi-Pyrénées contre le Cancer’ (to C.M.), the ‘Association de Recherche sur les Tumeurs prostatiques’ (to C.M.). K.C., B.M. and O.S. were supported by grants from the ‘Agence Nationale de la Recherche’ (ANR Plates-formes technologiques du vivant), ‘Fondation pour la Recherche Médicale (Programme Grands Equipements)’, ‘Région Midi-Pyrénées’, and ‘Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBISA)’. Victor Laurent received a PhD fellowship from the ‘Association de Recherche contre le Cancer’. We would like to acknowledge the ‘Anexpro Phenotypage’ platform (INSERM US006) and the staff of animal facilities for their expertise. This work also benefited from the ‘Toulouse Réseau Imagerie’ (TRI)-RIO Optical Imaging Platform at Institute of Pharmacology and Structural Biology (Genotoul, Toulouse, France) supported by grants from the ‘Région Midi-Pyrénées (Contrat de Projets Etat-Région)’, the Grand Toulouse community, the ‘Association pour la Recherche sur le Cancer’ (Equipement 8505), the CNRS and the European Union through the ‘Fonds Européen de Développement Régional’ programme. We gratefully acknowledge the help of Christine Bordier and Pr Denis Hudrisier for the cytometry experiments. The authors would also like to thank Dr Nathalie Ortega (IPBS, Toulouse, France) and Dr Thordur Oskarsson (HI-STEM, Heidelberg Germany) for their critical reading of the manuscript, and Emily Clement for the English editing of the manuscript.

Author contributions

V.L. performed most of the experiments. A.G. and V.L. performed experiments with mice and human adipose tissue and participated in the analysis of TMA. A.T. and D.G. performed flow cytometry and migration experiments with blocking Abs in the panel of tumour cell lines used. C.M., F.Z. and Y.S., constructed and performed immunohistochemistry experiments and interpreted the CCR3 expression data in the two prostate cancer TMA. All the pathology experiments were performed under the supervision of Dr Mazerolles. S.L.G. was in charge of the generation of lean and obese mice and assisted with some animal experiments. M.G. helped to carry out the *in vivo* experiments, validation of the tumour model and assessment of tumour growth by fluorescence imaging. T.C. set up the conditions for the preparation of human PPAT conditioned medium. C.D. performed RT-qPCR experiments in VAT derived from lean and obese mice. K.C., B.M. (Bernard Monsarrat) and O.S. performed and analysed proteomic experiments. L.N. helped to generate the shRNA plasmids and edited the manuscript. Tumour cells were transduced by B.C., B.M. (Bilal Majed) performed the statistical analysis and edited the manuscript. P.V. and B.M. (Bernard Malavaud) contributed to the design of the experiments and edited the manuscript. V.L. and C.M. wrote the manuscript. C.M. directed the study.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: Part of the authors (V.L., A.G., B.M. for Bernard Malavaud, P.V. and C.M.) are inventors of a patent application (FR1455491 - PCTIB2015054550) entitled “Inhibition de la chimiokine CCL7 ou de son récepteur CCR3 pour le traitement et le diagnostic du cancer de la prostate”. The remaining authors have no competing financial interests.

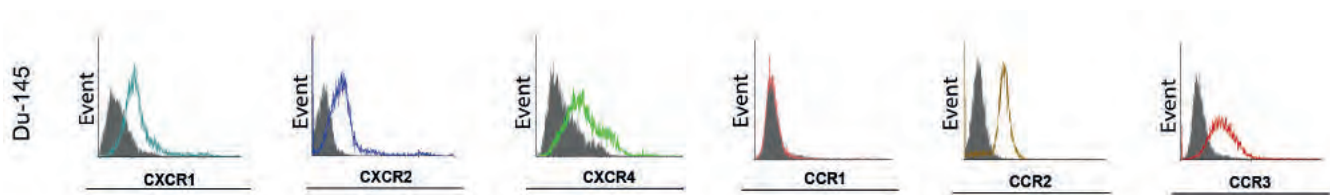
Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Laurent, V. *et al.* Periprostic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat. Commun.* **7**:10230 doi: 10.1038/ncomms10230 (2016).

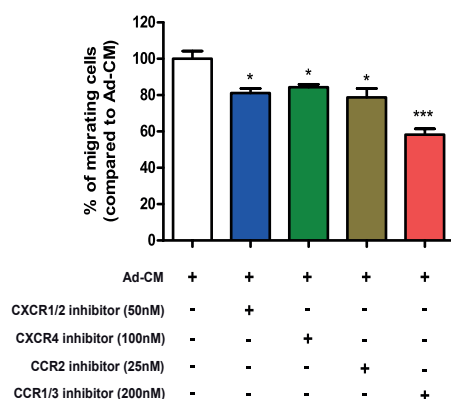


This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

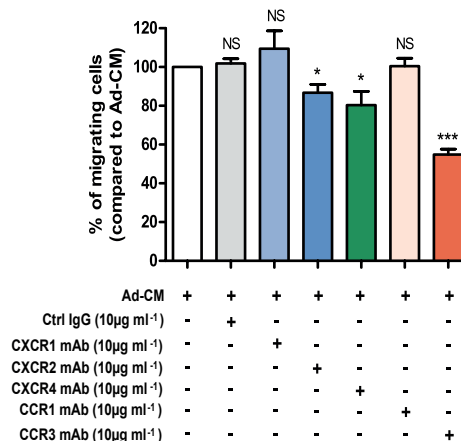
a



b

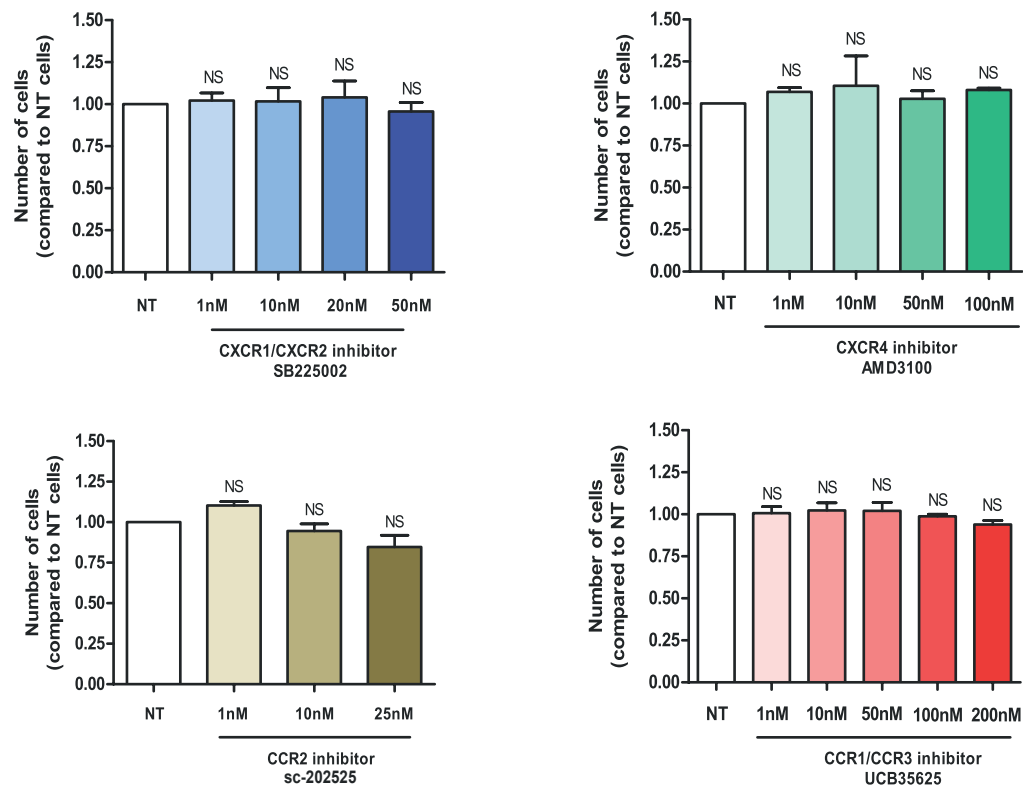


c

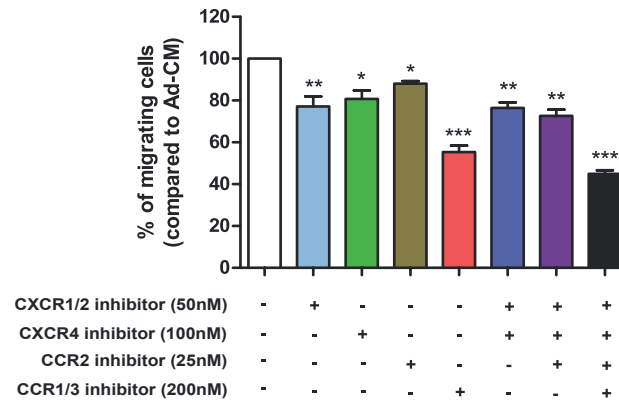


Supplementary Figure 1. CCR3 is involved in the migration of Du-145 cells towards Ad-CM. (a)

One representative experiment out of three showing the expression of chemokine receptors (CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR1, CCR2 and CCR3) detected by flow cytometry in the human prostate cancer cells, Du-145. Solid histogram: control isotypes; open histogram: indicated antigens. (b) Du-145 cells were pre-incubated or not with the SB225002 (CXCR1/2 inhibitor, 50nM), AMD3100 (CXCR4 inhibitor, 100nM), sc-202525 (CCR2 inhibitor, 25nM) or UCB35625 (CCR1/3 inhibitor, 200nM) for 30 minutes and migration towards Ad-CM (obtained from *in vitro* differentiated 3T3-F442A mature adipocytes) was performed for 12 h in the presence of inhibitors. (c) Similar experiments were performed in the presence of cells treated or not with control isotype, anti-CXCR1, anti-CXCR2, anti-CXCR4, anti-CCR1 or anti-CCR3 mAbs, all used at 10µg ml⁻¹. Data are expressed as the percentage of migrating cells relative to the migration of untreated cells (set to 100%) and are shown as mean±s.e.m (n=3). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated *versus* untreated (NT) cells was evaluated with Student's t-tests. Statistical analysis: * statistically significant by Student's t-test, p<0.05, *** p<0.001, NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments.

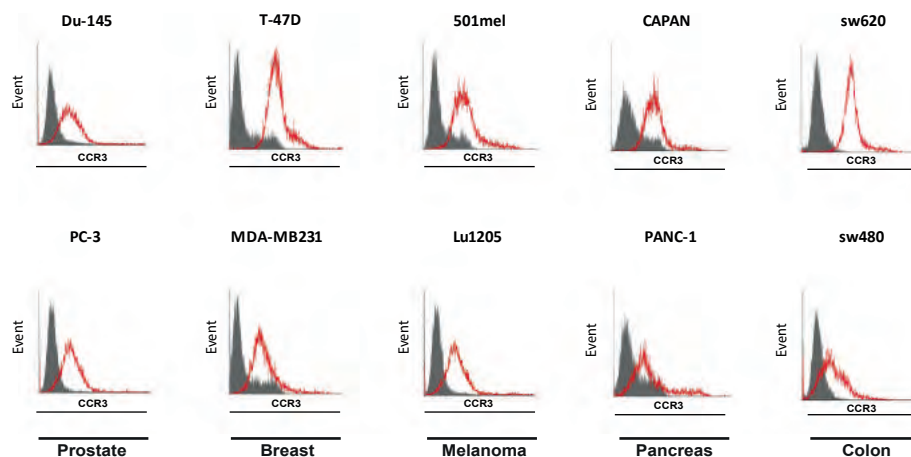


Supplementary Figure 2. Pharmacological inhibitors used in migration assays are not toxic for prostate tumor cells. The effect of the chemokine receptors inhibitors on PC-3 cells viability was determined using MTT assays. Cell viability was determined with cells exposed during 24 h to increasing doses of the pharmacological inhibitors. Data are expressed as the number of treated viable cells relative to the viability of untreated cells (set to 1) and are shown as mean $\pm$ s.e.m (n=3). The statistical significance of differences between means of viable cells (in %) in treated *versus* untreated (NT) cells was evaluated with Student's t-tests. Statistical analysis: NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments.

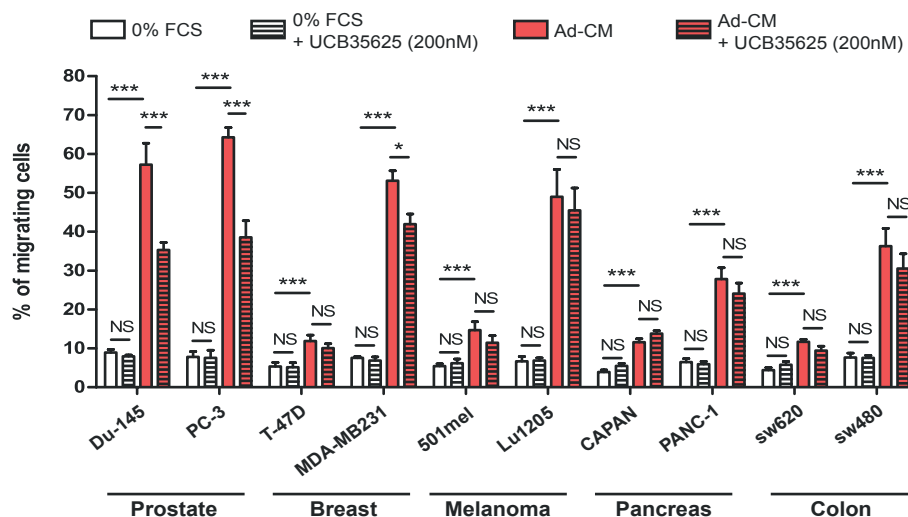


Supplementary Figure 3. CCR3 receptor is a key player in prostate cancer cell migration towards Ad-CM compared to CXCR2, CXCR4 and CCR2. PC-3 cells were pre-incubated or not with the SB225002 (CXCR1/2 inhibitor, 50nM), AMD3100 (CXCR4 inhibitor, 100nM), sc-202525 (CCR2 inhibitor, 25nM) or UCB35625 (CCR1/3 inhibitor, 200nM) for 30 minutes and migration towards Ad-CM (obtained from *in vitro* differentiated 3T3-F442A mature adipocytes) was performed for 12 h in the presence of inhibitors (used alone or in combination). Bar plots represent the percentage of migrating cells relative to the migration of untreated cells (set to 100%). Data are shown as mean±s.e.m (n=3). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated *versus* untreated (NT) cells was evaluated with Student's t-tests. Statistical analysis: * statistically significant by Student's t-test $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments.

a



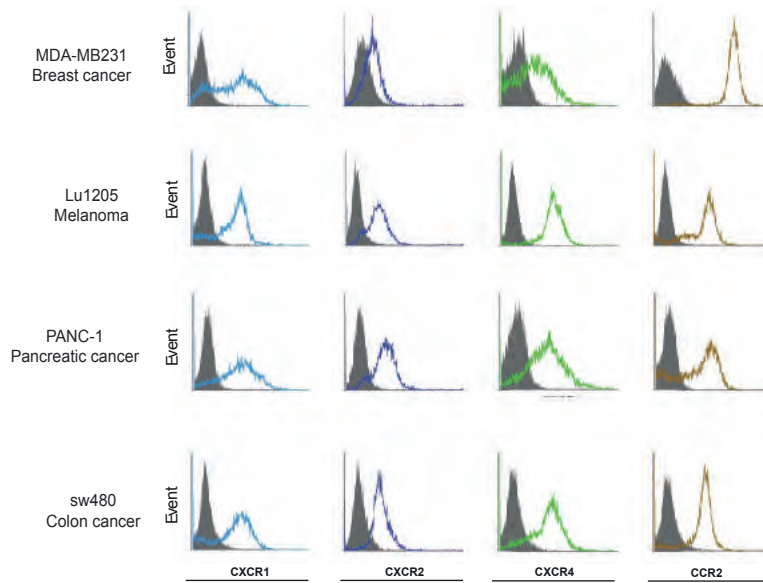
b



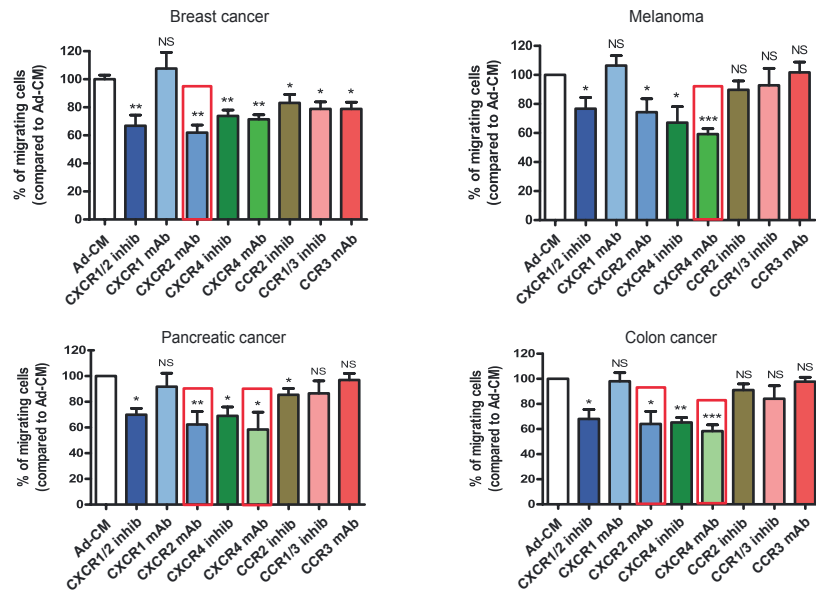
Supplementary Figure 4. CCR3 is not involved in the migration of other cancer models towards Ad-CM.

(a) One representative experiment out of three showing CCR3 expression detected by flow cytometry in human prostate cancer (Du-145 and PC-3), breast cancer (T-47D and MDA-MB231), melanoma (501mel and Lu1205), pancreatic cancer (CAPAN and PANC-1) and colon cancer (sw620 and sw480) cell lines. Solid histogram: control isotypes; open histogram: CCR3. CCR1 expression was not detected in all the cell lines (data not shown) **(b)** *In vitro* migration towards either 0% FCS or Ad-CM (*in vitro* differentiated 3T3-F442A mature adipocytes) of human prostate cancer (Du-145 and PC-3), breast cancer (T-47D and MDA-MB231), melanoma (501mel and Lu1205), pancreatic cancer (CAPAN and PANC-1) and colon cancer cells (sw620 and sw480) treated or not with UCB35625 (200nM). Cells were pre-incubated with the inhibitor for 30 minutes and the inhibitor remained present during the migration (12 h for prostate, breast, pancreas, colon cancer models and 24 h for melanoma cells). For each cancer model a poorly aggressive cell line (T-47D, 501mel, CAPAN and sw620) and an aggressive cell line (MDA-MB231, Lu1205, PANC-1 and sw480) were chosen. Note that the migration of aggressive cells towards Ad-CM was higher than poorly aggressive cells. The migration towards 0% FCS that relied on chemokinesis was not affected by CCR3 inhibitor in all tested models. CCR3 inhibitor affects the migration towards Ad-CM of prostate cancer cell lines and of one breast cancer cell line MDA-MB231 (to a slight extent, 20% inhibition). The migration of the other models was unaffected by CCR3 antagonist. Data are shown as mean $\pm$ s.e.m (n=3). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated *versus* untreated (NT) cells was evaluated with Student's t-tests. Statistical analysis: * statistically significant by Student's t-test $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments.

a



b

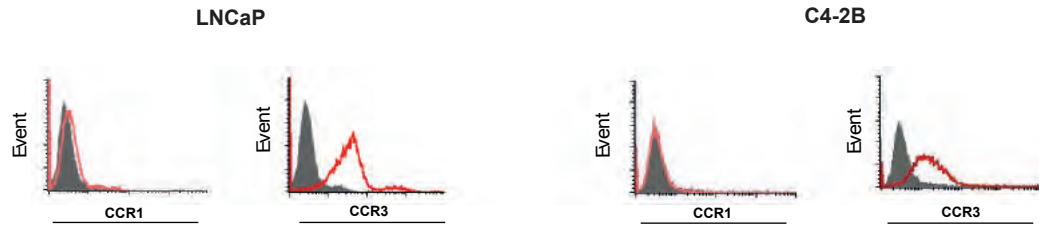


Supplementary Figure 5. Migration of breast, pancreatic, colon cancers and melanoma towards Ad-CM predominantly involves CXCR2 or CXCR4 receptors.

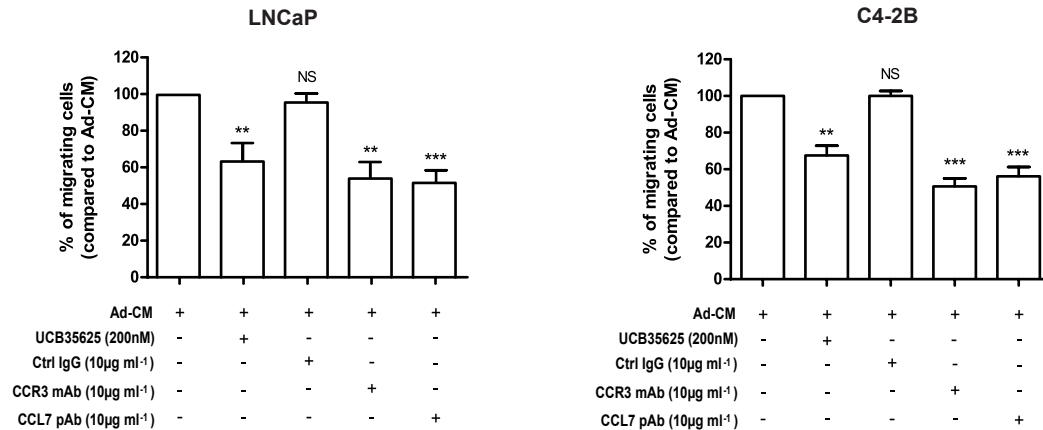
(a) One representative experiment out of three showing CXCR1, CXCR2, CXCR4 and CCR2 expression detected by flow cytometry in human breast cancer (MDA-MB231), melanoma (Lu1205), pancreatic cancer (PANC-I) and colon cancer (sw480) cell lines. Solid histogram: control isotypes; open histogram: chemokine receptor expression.

(b) *In vitro* migration towards Ad-CM (*in vitro* differentiated 3T3-F442A mature adipocytes) of human breast cancer (MDA-MB231), melanoma (Lu1205), pancreatic cancer (PANC-I) and colon cancer cells (sw480) treated or not with the SB225002 (CXCR1/2 inhibitor, 50nM), AMD3100 (CXCR4 inhibitor, 100nM), sc-202525 (CCR2 inhibitor, 25nM) or UCB35625 (CCR1/3 inhibitor, 200nM), with control isotype, anti-CCR1, anti-CCR3, anti-CXCR1, anti-CXCR2 or anti-CXCR4 mAbs, all used at $10\mu\text{g ml}^{-1}$. Cells were pre-incubated with the inhibitors or mAbs for 30 minutes and the inhibitors or mAbs remained present during the migration experiments (12 h for prostate, breast, pancreas, colon cancer models and 24 h for melanoma cells). The line surrounding the histogram indicates the mAb that induces the highest inhibitory effect in cell migration. Bar plots represent the percentage of migrating cells relative to the migration of untreated cells (set to 100%). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m ($n=3$). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated *versus* untreated (NT) cells was evaluated with Student's t-tests. Statistical analysis: * statistically significant by Student's t-test $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments.

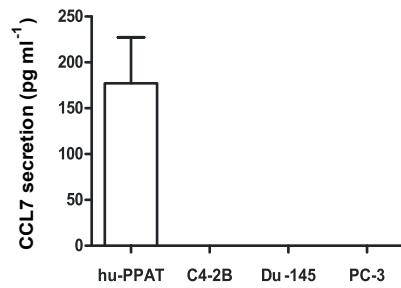
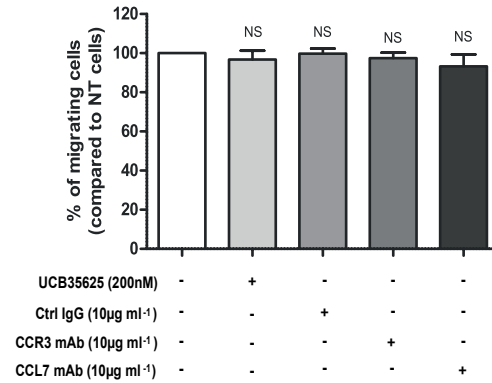
a



b

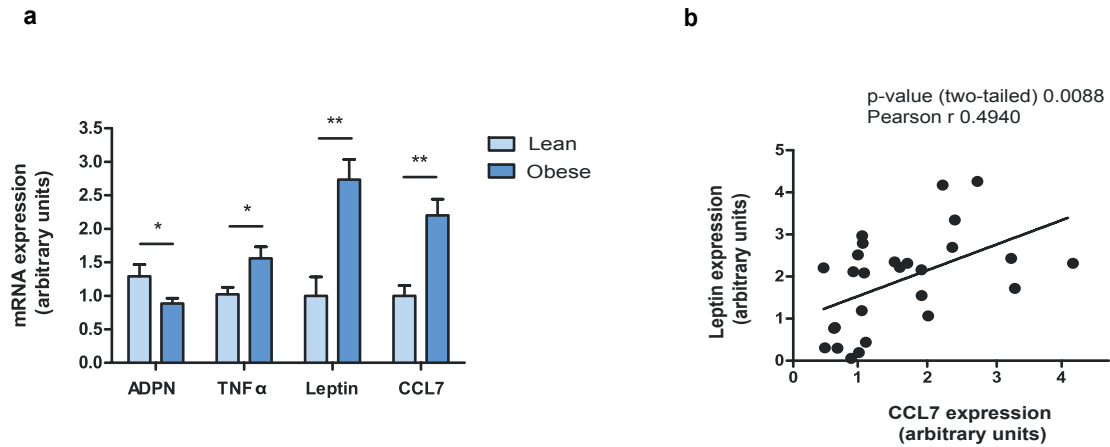


Supplementary Figure 6. CCR3/CCL7 axis is involved in the migration of the poorly aggressive prostate cancer cell lines, LNCaP and C4-2B, towards Ad-CM. (a) One representative experiment out of three showing the expression of chemokine receptors (CCR1 and CCR3) detected by flow cytometry in the human prostate cancer cells, LNCaP and C4-2B. Solid histogram: control isotypes; open histogram: indicated antigens. (b) Migration of LNCaP and C4-2B cells towards Ad-CM in the presence or not of UCB35625 (200nM), or control IgG or m/pAbs directed against CCR3 or CCL7 (10 μ g ml⁻¹). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m (n=3). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated *versus* untreated (NT) cells was evaluated with Student's t-tests. Statistical analysis: ** statistically significant by Student's t-test p<0.01, *** p<0.001, NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments.

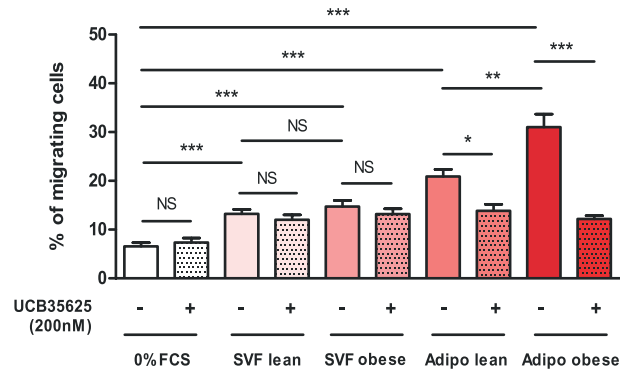
a**b**

Supplementary Figure 7. Absence of autocrine secretion of CCL7 in prostate cancer cells. (a)

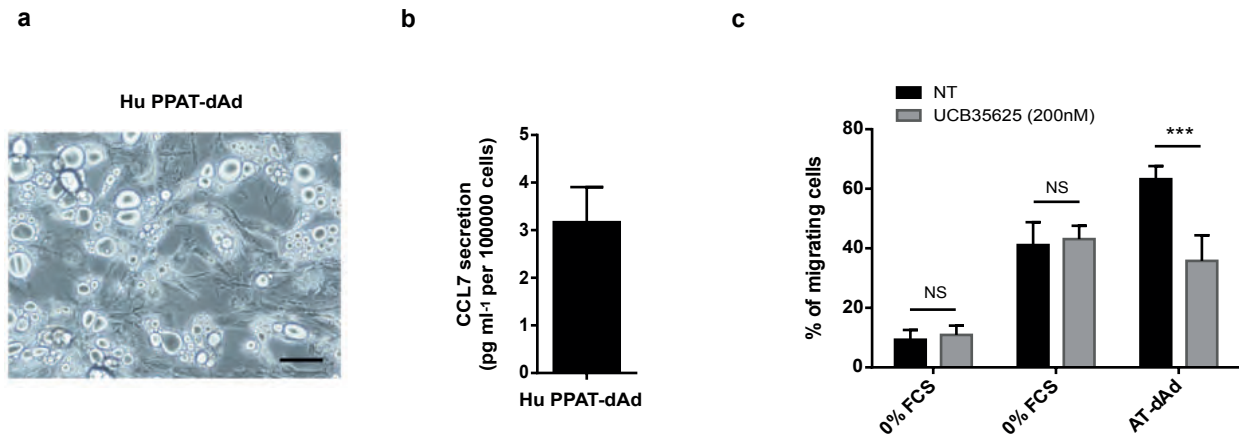
Dosage of CCL7 by ELISA in the CM of indicated prostate cancer cell lines. CM was obtained by incubating prostate tumor cells overnight in medium without serum containing 1% BSA. At the end of the incubation period, the medium was collected and stored in small aliquots at -80°C. The secretion of CCL7 is shown as mean±s.e.m (n=3) and hu-PPAT CM is used as a positive control. **(b)** *In vitro* migration of PC-3 cells towards a medium containing 10% FCS used as a chemoattractant treated or not with UCB35625 (200nM), anti-CCR1 or anti-CCR3 mAbs, anti-CCL7 pAbs, or control isotype (all used at 10µg ml⁻¹). Data are shown as mean±s.e.m (n=3). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) of treated *versus* untreated cells (NT) was evaluated with Student's t-tests. Statistical analysis: NS for not statistically significant. n stands for the number of replicated independent experiments.



Supplementary Figure 8. CCL7 expression is up-regulated in human VAT in obesity. (a) mRNA were extracted from human visceral adipose tissue (hu-VAT) of either lean (N=8) or obese (N=18) patients undergoing abdominal surgery. Expression of CCL7 mRNA was evaluated by RT-qPCR. A panel of genes whose expression has been shown to decrease (Adiponectin, ADPN) or increase (TNF α , Leptin) in obesity was used as a control to validate the samples. Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. Statistical analysis: * statistically significant by Student's t-test; $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (b) Pearson's correlation between leptin (marker of adipocytes hypertrophy) and CCL7 expression. The correlation between leptin and CCL7 expression suggests that CCL7 secretion is related to the hypertrophic state of adipocytes.

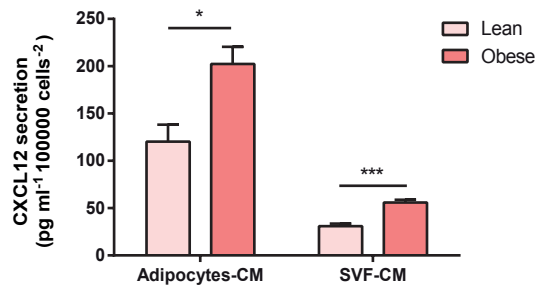


Supplementary Figure 9. The directed migration of prostate cancer cells towards the secretions of SVF does not involve the CCL7/CCR3 axis. *In vitro* migration of PC-3 cells treated or not with the CCR3 inhibitor (UCB35625, 200nM) towards medium without serum (negative control) or CM obtained from adipocytes or SVF cells isolated from the VAT of C57BL/6 lean or obese mice (six animals per group). Data are shown as mean±s.e.m (n=3). Statistical analysis: * statistically significant by Student's t-test p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments. Note that the % of migrating cells was significantly higher when SVF-CM was used as a chemoattractant compared to 0% serum. The migration of prostate cancer cells towards SVF-CM was unaffected by obesity and CCR3 antagonist.

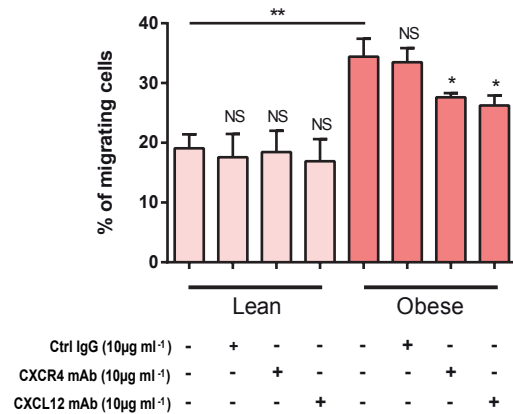


Supplementary Figure 10. *Ex vivo* differentiated mature adipocytes from ADSCs present in the SVF of PPAT secrete CCL7 and are able to support prostate cancer directed migration in a CCR3 dependent manner. (a) Representative image of mature adipocytes obtained after *ex vivo* differentiation of ADSCs isolated from human PPAT (hu-PPAT-dAd). Scale bars, 50µm. (b) CCL7 secretion by *ex vivo* differentiated adipocytes. Data are shown as mean±s.e.m (n=3). (c) *In vitro* migration towards Ad-CM obtained from *ex vivo* differentiated adipocytes in the presence of UCB35625 (200nM). Cells were pre-incubated with the receptor antagonist for 30 minutes at 37°C prior to their addition to Transwell chambers. The receptor antagonist was also present during the migration assay (12 h). Data are shown as mean±s.e.m (n=3). Statistical analysis: * statistically significant by Student's t-test p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments.

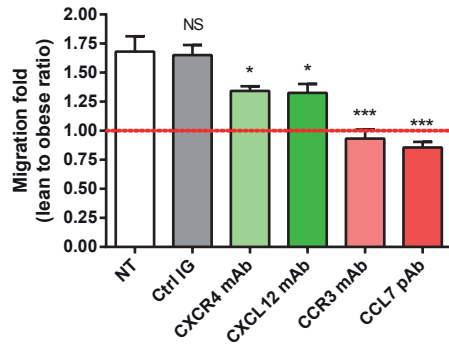
a



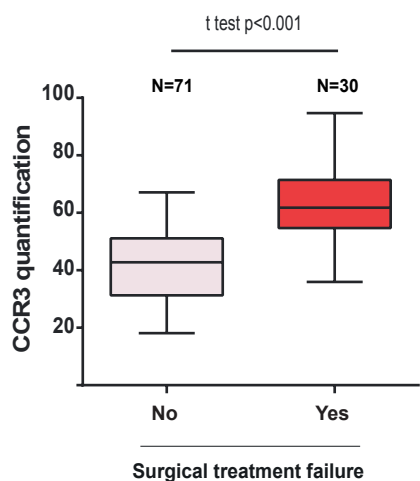
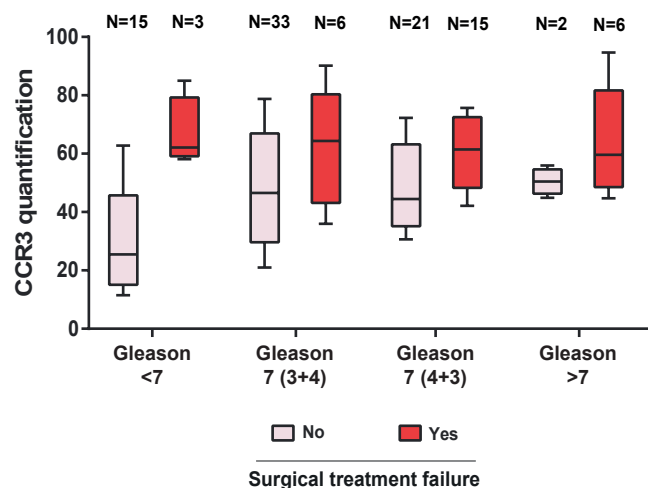
b



c

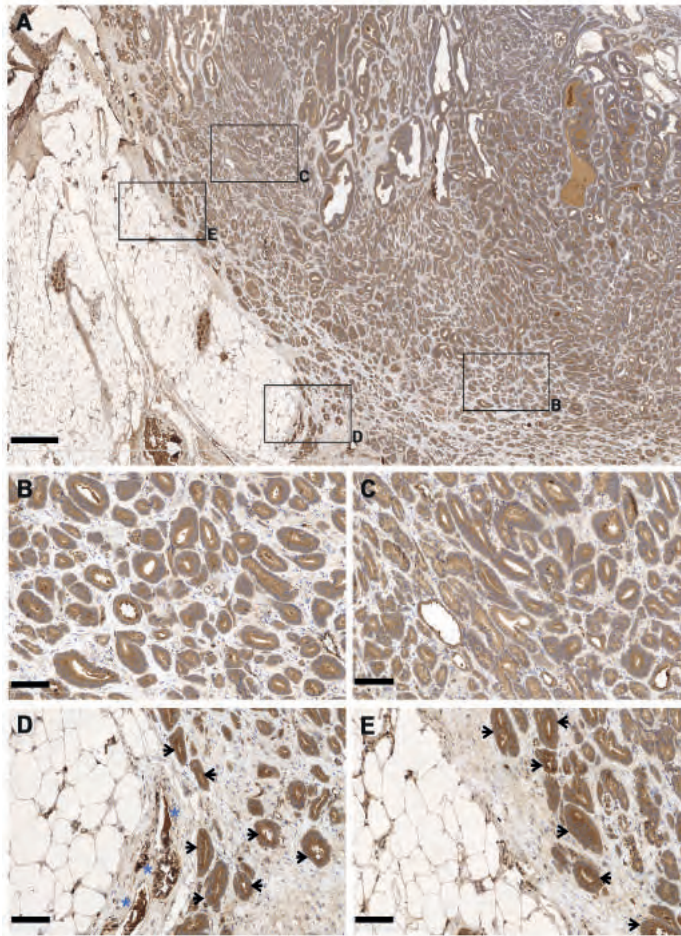


Supplementary Figure 11. CXCR4/CXCL12 axis is poorly involved in the migration towards Ad-CM obtained from lean and obese mice. (a) CXCL12 secretion by primary adipocytes or SVF cells isolated from mu-VAT of C57BL/6 lean or obese mice (six animals per group). Data are shown as mean±s.e.m (n=3). (b) Adipocytes were isolated from the mu-vat of lean or obese C57bl6 mice (six animals per group). *In vitro* migration of PC-3 cells towards mu-VAT adipocyte-CM was performed in the presence or absence of blocking mAbs directed against CXCR4 or CXCL12, or control IgG (10µg ml⁻¹). Data are shown as mean±s.e.m (n=3). The statistical significance of differences between means of migrating cells (in %) in treated *versus* untreated cells was evaluated with Student's t-tests. The differences between the percentages of migrating cells towards Ad-CM isolated from mu-VAT from obese *versus* lean mice are also shown. (c) Inhibition of the CCR3/CCL7, but not CXCR4/CXCL12 axis totally abrogates the enhanced chemotaxis observed in obesity. The histograms represent the ratio of migration towards conditioned medium of primary isolated adipocytes from obese to lean mice in each treated conditions. Statistical analysis: * statistically significant by Student's t-test p<0.05, *** p<0.001, NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments.

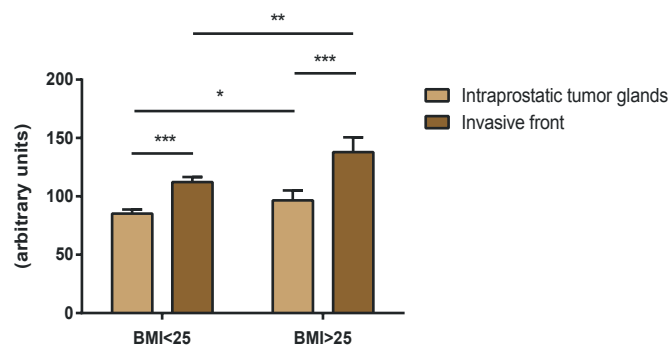
a**b**

Supplementary Figure 12. CCR3 expression is higher in tumors from patients exhibiting surgical treatment failure in all classes of Gleason. (a) Boxplots of CCR3 values comparing patients with and without surgical treatment failure. We used Student's t-test to correlate CCR3 expression to the occurrence or not of a surgical treatment failure (which is a non-ordered variable represented by a category). The median values for CCR3 expression in the two categories are shown. (b) Boxplots of CCR3 values comparing patients at one year of follow-up within the four Gleason score classes. CCR3 values were systematically higher in patients with treatment failure regardless of Gleason score class. Discrepancies in CCR3 values tended to be greater in case of favorable Gleason score (<7). The boxes represent the median (black middle line) limited by the 25th (Q1) and 75th (Q3) percentiles. The whiskers are the upper and lower adjacent values, which are the most extreme values within $Q3+1.5(Q3-Q1)$ and $Q1-1.5(Q3-Q1)$, respectively. N defines the number of individuals within each group.

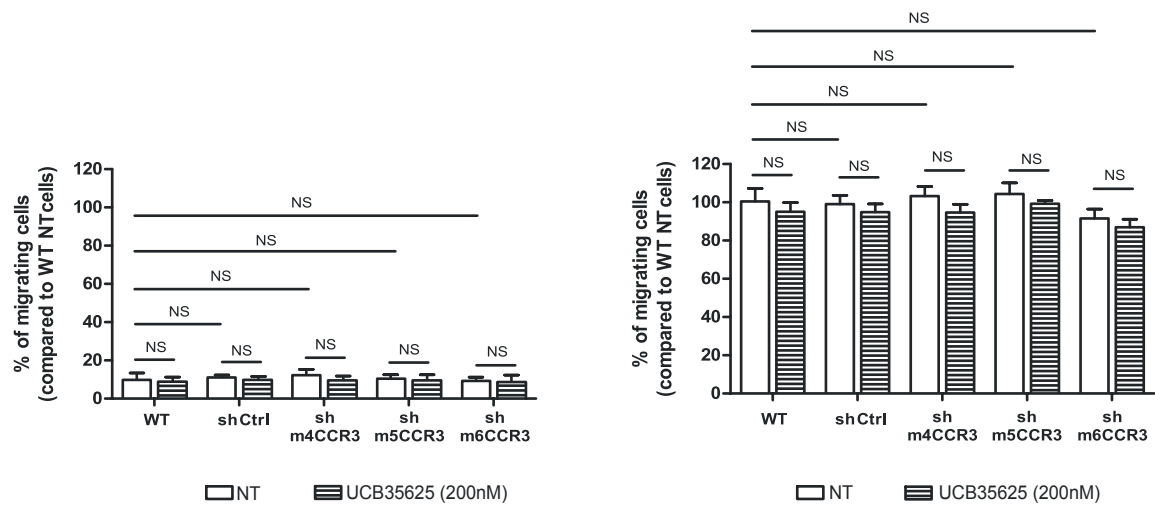
a



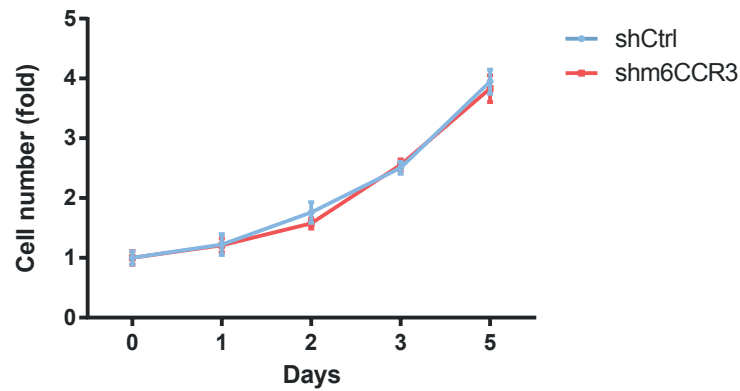
b



Supplementary Figure 13. CCR3 expression is increased in tumor cells present at the invasive front and this effect is increased in overweight and obese patients. (a) Immunohistochemical staining for CCR3 (with HE counter-staining) was performed in eight whole slices of human pT3a and pT3b prostatectomy pieces. Pictures show a representative experiment (obtained for patient with BMI = 28 kg m⁻²). A: picture of the whole slice after staining with CCR3; (B, C): zoom of the intra-tumoral CCR3 staining in two representative zones; (D, E): zoom of the CCR3 staining at the invasive front in two representative zones. Scale bars, for A, 500 μ m and for B, C, D, E, 100 μ m. (b) Histograms show CCR3 expression in tumor cells at the invasive front compared to intra-tumoral areas for four lean (BMI<25) and four overweight/obese patients (BMI>25). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m (n=4 tumors per group). Tumor glands (showed with black arrows) were defined with two pathologists and the stained areas of tumors were digitalized and protein expression was quantified using ImageJ software plugins. Note that some blood vessels (blue stars) or nerve tissues are also strongly stained but quantification only considered tumor glands. Statistical analysis: * statistically significant by Student's t-test $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.



Supplementary Figure 14. CCR3 invalidation is without effect on prostate cancer cell migration when 10% FCS is used as chemoattractant. *In vitro* migration of the indicated cell lines towards 0% (left panel) or 10% FCS (right panel) in the presence or absence of the CCR3 antagonist (UCB35625, 200nM). Note that the observed migration was similar between WT cells and cells transfected with control vector (shCtrl) or sh directed against CCR3. Furthermore, the migration was unaffected by treatment with the CCR3 antagonist whatever the cell lines considered. Data are shown as mean±s.e.m (n=3). Statistical analysis: NS for not significant. n stands for the number of replicated independent experiments.



Supplementary Figure 15. Stable downregulation of CCR3 does not affect cell proliferation. 3×10^3 TRAMP-C1P3 cells transfected with either control vector (shCtrl) or sh directed against CCR3 (shm6CCR3) were plated in quadruplicate for each time point in 96 well plates. When all the cells were attached after 6 h, the number of viable cells was measured by MTT assay and the mean optical density obtained was set at 1 (t_0). Similar experiments were performed after 1, 2, 3 and 5 days and the values obtained were expressed as fold increase to control. Data are shown as mean $\pm$ s.e.m ($n=3$). No statistically significant differences were observed between the two cell lines. n stands for the number of replicated independent experiments.

AC	MW (KDa)	Description	Gene Name	NE	Score	PN	% Coverage
IPI00116264	14408.9	C-X-C motif chemokine 5	Cxcl5	3	97.92	4	41
IPI00131236	11276.86	C-C motif chemokine 7	Ccl7	4	163.94	5	34
IPI00121856	10532.69	Growth-regulated alpha protein	Cxcl1	3	88.07	3	50
IPI00108087	16543.55	C-C motif chemokine 2	Ccl2	2	34.80	3	32
IPI00125187	14203.99	C-C motif chemokine 9	Ccl9	3	93.68	3	28
IPI00108061	10310.55	Isoform Alpha of Stromal cell-derived factor 1	Cxcl12	4	62.88	2	42
IPI00311383	26938.25	Adiponectin	Adipoq	4	250.76	6	26
IPI00120465	13110.37	Resistin	Retn	2	91.85	3	29

Supplementary Table 1: CCL7 chemokine is the only ligand of CCR3 secreted by mature adipocytes. Results from proteome analysis of Ad-CM (mature adipocytes 3T3-F442A); 4 independent experiments. Chemokines (highlighted in green) identified by nanoLC-MS/MS are listed. Results obtained for adiponectin and resistin, two well-known adipokines, are also indicated. The number of experiments in which proteins have been identified (NE), the best score (score), the number of peptides (PN) and the average sequence coverage for each protein are indicated. The presence of chemokines and adipokines in the conditioned medium was confirmed by ELISA and multiplex analysis. Data obtained (mean of two independent experiments) are as following: CCL2 (6.3ng ml⁻¹ for 1x10⁵ cells), CCL7 (28.3ng ml⁻¹ for 1x10⁵ cells), CXCL1 (32.6ng ml⁻¹ for 1x10⁵ cells), CXCL12 (0.8ng ml⁻¹ for 1x10⁵ cells), Adiponectin (32ng ml⁻¹ for 1x10⁵ cells) and Resistin (1.7ng ml⁻¹ for 1x10⁵ cells). Moreover seeing that CCL5 (absent of our proteomic analysis) has been identified in the secretion of mammary adipocytes we have determined CCL5 concentration in Ad-CM by ELISA. The results showed that the level of CCL5 was almost undetectable (mean concentration 0.01ng ml⁻¹ for 1x10⁵ cells).

		CCR3			p-value
		low	moderate	high	
Gleason score, n (percentage per column)	Gleason <7	14 (66.7)	3 (11.1)	2 (4.6)	<0.001
	Gleason (3+4)	5 (23.7)	11 (40.7)	6 (14.0)	
	Gleason (4+3)	1 (4.8)	8 (29.7)	16 (37.2)	
	Gleason >7	1 (4.8)	5 (18.5)	19 (44.2)	

Supplementary Table 2: Immunohistochemical staining for CCR3, as well as hematoxylin counter-staining, was performed in normal epithelium (10 samples) and human prostate cancer tissues (91 tumors in duplicate). Two pathologists, who were blind to clinical data, independently scored CCR3 expression. The Gleason score characterizes the glandular architecture of the prostate based on a score that represents the level of cancer de-differentiation. The Gleason score is comprised of two numbers, each representing the most common Gleason patterns ranging from 1 to 5, where 1 represents a highly differentiated carcinoma and 5 represents an aggressive de-differentiated one. Therefore the highest Gleason score is 10 and the lowest 2. A related issue is the clinical usefulness of the percentage of high-grade carcinoma (Gleason patterns 4 and 5) in a tumor specimen. The correlation between CCR3 expression and Gleason score has been evaluated by Spearman rank correlation assuming a monotonic relation between considered variables.

		Variables	Percentage among the cohort
Size of the cohort		101	100
Age at surgery (Years) , median (extent)		63 (47-75)	
Body mass index (BMI) (Kg/m²) , median (extent)		26.1 (19-34)	
PSA before surgery (ng/mL) , median (extent)		7 (2-37)	
Last PSA dosage (ng/mL) , median (extent)		0 (0-4.02)	
Prostatectomy piece weight (g) , median (extent)		48 (22-93)	
Length of the monitoring (Days) , median (extent)		765 (62-1736)	
Post-surgical treatment , number of patients	Monitoring only	71	70.30
	Radiotherapy only	16	15.84
	Hormonotherapy only	7	6.93
	Radiotherapy and hormonotherapy	7	6.93
Post-surgery evolution , number of patients	Biochemical recurrence	14	13.86
	Surgical treatment failure ^a	30	29.70
	No relapse	71	70.30
	Death	1	0.99

Supplementary Table 3: All the patients included in the cohort underwent surgery for PCa between February 1st 2010 and December 1st 2011 at the Urology Department of Toulouse Hospital. Surgical treatment consisted of a robot-assisted radical prostatectomy, associated in some cases with lymphadenectomy (standard or extended). All patients included in the study had localized disease without metastasis at the time of the surgery. Biochemical recurrence was defined by two PSA readings >0.2ng ml⁻¹ according to the European Association of Urology guidelines. ^a defined by patients that exhibit either biochemical recurrence, locoregional recurrence or distant metastases, or by use of adjuvant radiation or hormonal deprivation therapy. Abbreviations used: BMI, Body Mass Index; PSA, Prostate Specific Antigen.

		Variables	Percentage among the cohort
Gleason score , number of patients	<7	18	17.82
	=7 (3+4)	39	38.62
	=7 (4+3)	36	35.64
	>7	8	7.92
Percentage of low differentiated contingent (grade 4 and 5) , median (extent)		40 (0-100)	
Tumor localization , number of patients	Transition zone	10	9.90
	Peripheral zone	91	90.10
pT stage , number of patients	pT2b	6	5.94
	pT2c	35	34.65
	pT3a	44	42.57
	pT3b	16	15.84
Positive surgical margins , number of patients		22	21.78
Lymphatic emboli , number of patients	No	93	92.08
	Yes	8	7.92
Bilateral lymphadenectomy , number of patients		79	79.21
Lymph node invasion , number of patients	Nx (No node dissection performed)	22	21.78
	N0	74	73.27
	N1	5	4.95
CCR3 expression (arbitrary units) , median (extent)		48.5 (11.4-94.7)	

Supplementary Table 4: Histological and immunohistochemical characteristics of the cohort.

The Gleason score has been defined in Supplementary Table 2. The pT staging represents the size of the tumor as determined from the prostatectomy specimen. In pT2 tumors, the tumor is confined to the prostate gland; pT2b tumors involve more than one half of a lobe and pT2c tumors involve both lobes, For pT3, the tumor extends through the prostate capsule; pT3a tumors exhibit unilateral or bilateral extension and pT3b tumors invade seminal vesicles.

Article 2

II. Le récepteur aux chimiokines CCR3 guide la dissémination osseuse du cancer de la prostate : implication des adipocytes médullaires.

(Guérard *et al*, manuscrit en préparation)

The chemokine receptor CCR3 is involved in the homing of prostate cancer cells to bone: implication of bone marrow adipocytes

Adrien Guérard¹, Victor Laurent^{1#}, Camille Attané^{1#}, Gaëlle Fromont-Hankard², David Estève¹, Denis Calise³, Julia Ghilodes⁴, Muriel Golzio¹, Edith Bonnelye⁵, Sophie Legonidec⁴, Philippe Valet⁴, Bernard Malavaud⁶, Nicolas Reina⁷ Catherine Muller¹.

¹ Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

² Service d'Anatomo-Pathologie, CHRU de Tours, 37044 Tours, France.

³ Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Université de Toulouse, INSERM, UPS, Toulouse, France

⁴ Département de Biostatistiques, Institut Universitaire du Cancer, 31059 Toulouse Cedex 9, France

⁵ Lyos, INSERM, UMR1033, 69008 Lyon, France.

⁶ Département d'Urologie, Institut Universitaire du Cancer, 31059 Toulouse Cedex 9, France

⁷ Service de Traumatologie et de Chirurgie Orthopédique, CHU de Toulouse – Purpan, 31059 Toulouse, France

equal contribution

Sent correspondence to : Pr Catherine Muller, IPBS CNRS UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex – Tel: 33-0688-22-77-78; Fax: 33-561-17-59-33; e-mail: muller@ipbs.fr

Key words: Prostate cancer, bone metastasis, adipocytes, bone marrow, medullary adipocytes, chemokine, obesity, aging, meta-analysis.

Abstract:

Bone metastasis remains the most frequent and the deadliest complication of prostate cancer (PCa). However, mechanisms leading to tumor cells bone homing remain poorly characterized. Here, we show that human bone marrow adipocytes (BMAd) take an important part in this process. Using *in vitro* migration assays, we demonstrated that the secretions of human BMAd are able to support the directed migration of PCa cells in a CCR3 dependent manner. This effect was amplified by obesity and aging, two clinical conditions known to promote aggressive and metastatic PCa, and this was due to an up-regulation of the secretion of the CCR3 ligand, CCL7. In vivo, down-regulation of CCR3 affects bone after injection of tumor cells within the circulation. In human tumors, a positive regulation of CCR3 gene expression is found in bone metastasis *versus* primary tumors. Furthermore, tumor macro-array analysis revealed that high expressing CCR3 cells are mostly found in bone compared to other metastatic sites. Thus, our study highlights for the first time the role of BMAd in the bone homing of PCa cells and the importance of the CCR3/CCL7 in this process. This study highlights the potential benefits of CCR3 antagonists in the treatment of PCa.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is a major healthcare problem, hitting the third rank in term of mortality by cancer in men and the first rank in term of incidence (Lee et al., 2017). Meta-analyses have shown consistent associations between obesity and more advanced stages of PCa as well as higher disease-related mortality (for review see (Nassar et al., 2018). We have recently shown that the adipose depot surrounding the prostate (Periprostatic adipose tissue, PPAT) favors the dissemination of the cancer cells outside of the prostate gland, a process amplified in obesity (Laurent et al., 2016). This process is dependent on the secretion of the chemokine CCL7 by adipocytes, which diffuses from PPAT to the peripheral zone of the prostate, stimulating the migration of CCR3 expressing tumor cells (Laurent et al., 2016). In human, expression of the CCR3 receptor is associated with the occurrence of aggressive disease with extended local dissemination and a higher risk of biochemical recurrence (Laurent et al., 2016).

Even if local dissemination is a crucial step in PCa progression, the prognosis of PCa is mainly determined by the presence of metastases, that will be, in about 80 percent of the time, in bones (Gandaglia et al., 2014). Mechanism(s) that govern(s) the specific homing of PCa cells to bone remain(s) only partially characterized and, to our knowledge, the role of adipocytes in this process has never been addressed. Bone is an adipocyte-rich organ and 50 to 70% of the adult bone marrow (BM) volume is composed of adipocytes (BMA_d) (Hardouin et al., 2016). As adipocytes from other depots, BMA_d are active secretory cells but their secretory profile and its functional implication, remain largely unexplored compared to other adipocytes from classical depots such as subcutaneous (SAT) or visceral adipose tissue (VAT) (Hardouin et al., 2016; Scheller et al., 2016). Experimental findings from animal models showed that BMA_d may act as negative (Naveiras et al., 2009) or positive (Zhou et al., 2017) regulators of hematopoiesis. BMA_d also display detrimental effects on bone formation throughout the release of paracrine factors that modulate osteoblast and/or osteoclast differentiation and function (Hardaway et al., 2015; Li et al., 2016). The number and size of adipocytes in the BM increase with obesity as well as during ageing, conditions compromising hematopoiesis as well as bone formation, ultimately leading to osteoporosis (Adler et al., 2014; Li et al., 2016). Obesity and ageing have been also associated with increased bone metastasis in PCa, highlighting a potential role of BMA_d in this process (Gong et al., 2007; Hardaway et al., 2014).

Tumor homing to bone is dependent on the ability of the cells that constitute the BM microenvironment to chemoattract the disseminating tumor cells (DTC) and to then ensure their fate (Weilbaecher et al., 2011). Multiple chemokines and their receptors have been implicated in PCa progression (Vindrieux et al., 2009) but the picture lacks clarity when the question of bone homing is raised (Park et al., 2018). In PCa, it has been suggested that

DTC can use the same physiological mechanisms as those used by hematopoietic stem cells (HSCs) homing to bone, involving primarily the CXCR4/CXCL12 axis (Weilbaecher et al., 2011). In animal models, metastatic PCa directly compete for the occupancy of the HSC niche during localization to the marrow (Shiozawa, 2011). In the BM microenvironment, CXCL12 is primarily expressed by perivascular mesenchymal stromal cells and at lower levels by endothelial cells and osteoblast (Morrison and Scadden, 2014). Pre-treatment of the PCa cell line with anti-CXCR4 antibodies decreases its ability to form bone metastasis in a mouse model (Sun et al., 2005). Moreover, *in vivo* treatment with CXCR4 antagonist (plerixaflor) reduce bone metastases after intracardiac injection of PCa tumor cells in mouse (Gravina GL Prostate 2015). At clinical levels, data are clearly lacking. A recent review of the literature suggest that the increased expression of CXCR4 in primary tumors is significantly associated with lymph nodes or bone metastasis occurrence in human (Chen and Zhong, 2015), Besides the CXCR4/CXCL12 axis, other studies have implicated the CCL2/CCR2 axis *in vitro* and in animal models, , although the experimental design used, more specifically addressed tumor growth into bones rather than homing from distant sites (Lu et al., 2009). The aim of our present study was therefore to determine if BMAd could play a role in the homing of PCa cells to bone, the mechanism(s) involved and if this process could be regulated by obesity and aging. Our results obtained both *in vitro* and *in vivo* (including human tumors) unravels a new role of fat cells in this process implicating the CCR3 receptor.

MATERIAL and METHODS

Cell lines and culture

The human PCa cell lines C4-2B (from DSMZ, Braunschweig, Germany) and PC-3 (ATCC® CRL-1435™) were provided by Dr Olivier Cuvillier ; IPBS, Toulouse, France). Cells were cultured in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% streptomycin and penicillin (Gibco). The murine PCa cell line RM1-BM (Power et al., 2009) was kindly provided by Dr Carl Power (Oncology research center, Randwick, Australia) and cultured in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FCS and 1% streptomycin and penicillin. All cell lines used in this study were grown in a humid atmosphere with 5% CO₂ at 37°C and were used within 2 months after thawing of frozen aliquots.

Human subcutaneous (SAT) and bone marrow adipocytes (BMAd) conditioned media preparation

Paired human SAT and BMAd were collected from patient undergoing hip replacement surgery in the orthopedic surgery unit from Purpan hospital (Toulouse, France). Briefly, SAT was collected from gluteo-femoral area at the incision site and bone marrow aspirate is collected from medullary canal prior to the insertion of the femoral insert. All patient gave their inform consent and the procedure is approved by the French ministry of education and research (declaration n° DC-2017-2914). BMAd were isolated by flotation and washed at least three times with DMEM supplemented with 1% BSA (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin and streptomycin (DMEM-BSA) to remove hematopoietic cells. SAT was cleaned of blood vessels and connective tissue and wash in DMEM-BSA. Conditioned media were obtained by incubating overnight 1g of SAT or BMAd (SAT-CM or BMAd-CM respectively) in DMEM 1% BSA in a humidified chamber with 5% CO₂ at 37°C and were stored at -80°C until use.

Boyden chamber migration assays

Cell migration assays were performed as previously described (Laurent et al., 2016) using SAT-CM or BMAd-CM diluted to half in DMEM 1% BSA. When indicated, cells were pre-incubated for 30 min at 37 °C with blocking mAbs (10 µg/ml) directed against CCR3, CXCR1, CXCR2, CXCR4 or control IgG or with pharmacological inhibitors against CCR1/CCR3, CCR2, CXCR1/2 or CXCR4 at doses defined in our precedent study (Laurent et al., 2016).

Mice and metastatic assay

C57BL/6J male mice obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France) were handled in accordance with the National Institute of Medical Research's principles and guidelines.

Metastatic assays were established in 18-week-old C57BL/6 mice fed with a ND by injecting either RM1-BM cells expressing control (Sh-Ctrl) or anti-CCR3 (Sh-CCR3) shRNA (obtained as previously described (Laurent et al., 2016)) directly into the left ventricle of the heart (detailed in online data supplements). Two weeks after surgery, bioluminescence was analyzed using a highly sensitive, cooled CCD camera mounted in a light-tight specimen box. Imaging and quantification of signals were controlled by the acquisition and analysis software Living Image® (Xenogen). Animals were given the substrate D-luciferin by intraperitoneal injection at 150 mg/kg in DPBS (Invitrogen), and anesthetized (1–3% isoflurane). Two to three mice were placed at the same time onto the warmed stage inside the light-tight camera box with continuous exposure to 1–2% isoflurane. The low levels of light emitted from the bioluminescent tumors were detected by the camera system and 5 pictures/minute were taken. We perform semi-quantitative measure where we put the same threshold of detection of bioluminescence in order to limit background noise and define positive signal. Then we performed a density integration-based quantification and compare it between different mice. Mice were then sacrificed, and several tissues were removed to take GFP picture. Isolated Tibiae were scanned using microcomputed tomography (Skyscan1076, Skyscan) with an 8.8 voxel size, and three-dimensional (3D) reconstructions were carried out with a dedicated visualization software (Amira 5.2, Visage Imaging Inc.). Using tomographic data, histomorphometric analyses were performed to calculate the bone volume/tissue volume (BV/TV) ratio.

Patients and PCa Tissue Micro Arrays (TMAs)

We used two TMAs to evaluate the expression of CCR3. Written informed consents were obtained for all patients in accordance of the requirements of the medical ethic committee. The first TMA includes 39 visceral, 24 lymph node (LN) and 78 bone metastases from 45 castration resistant PCa patients and has been provided by the Prostate Cancer Biorepository Network (www.prostatebiorepository.org). These samples were taken after patient death, during rapid autopsy allowing to obtain a large number of metastatic samples from the same patient. The second TMA was composed of samples from PCa patients treated at Tours University Hospital (Tours, France), and includes bone metastases from 13 patients and LN metastases from 11 patients. Using these two TMA, we could get 87 bone, 34 LN and 38 visceral metastases, as we could not analyse all samples due to loss of tissue core, core folding or non-interpretable staining. Immunohistochemistry was performed as previously described (Wang et al.,

2017) using the primary anti-CCR3 antibody (Abcam, reference ab32512) diluted to 1/100 and incubated overnight at 4°C. Two pathologists (pathology unit of Tours University Hospital) who were blind to clinical data, independently analysed CCR3 expression in human tumours as negative or positive staining.

in silico meta-analysis

The Oncomine database (Oncomine™ v4.5) was used to compare the expression of chemokine receptors in prostate tumors with its expression in bone metastases. We employed filters for selection of conditions and genes of interest (PCa ; metastasis vs. primary; genes) and we selected nine studies (table 1) including 249 primary sites and 28 bone metastases of interest for RNA analyses. Data were ordered by ‘overexpression’ and the threshold was adjusted to P-value < 0.0001; fold change: 2 and gene rank: top 10%. For each database, only genes that met the criteria for significance were reported.

Statistical analysis

The statistical significance of differences between distributions was evaluated with unpaired Mann Whitney’s tests or Kruskal Wallis for multiple statistical analyses toward a control. For the TMA analysis, both TMA were associated and distributions of CCR3 expression in the three sites (lymph node (LN), visceral (V) and bone metastasis (BM)) were compared using Chi2 distribution comparison. Statistical analysis was performed using STATA 12 software and GraphPad Prism software. All statistical tests were two-sided. P values below 0.05 (*), <0.01 (**) and <0.001 (***) were deemed as significant and ‘NS’ was used to denote not significant.

Results

Obesity and aging increase the ability of BMAd to promote the migration of cancer cells.

To study the chemoattractant potential of BMAd, conditioned-media were prepared from either BMAd or paired SAT obtained from male patients (age between 51 and 73 years and with body mass index (BMI) between 20 and 25 kg/m²). Directed migration assays were performed on several PCa cell lines with low (C4-2B) or high (PC-3) aggressiveness (Fig. 1A). The ability of BMAd to chemoattract tumor cells was at least equivalent or greater than the 10 % FCS positive control whereas SAT-CM was significantly less chemoattractant.

As obesity and aging has been associated to increased distant dissemination in PCa (Gong et al., 2007; Hardaway et al., 2014), similar experiments were performed with samples obtained from obese or aged patients. In obese conditions, the ability of BMAd-CM to chemoattract tumor cells was increased for C4-2B and PC3 by about 2.6 and 1.7-fold respectively as compared to the control group (Fig. 1B). A slight effect of obesity was observed with SAT-CM but this effect was less pronounced than with BMAd-CM (Supplementary Fig. 1A). Similarly, the chemoattractive potential of BMAd-CM from aged patients was increased in PCa cell lines as compared to the control group (Fig. 1C) with a lower effect observed with SAT-CM (Supplementary Fig. 1B).

CCR3 is an important driver in the directed migration of PCa cells towards BMAd-CM

As stated in the introduction, the clinical implication of chemokines receptor in prostate metastasis is not well defined. Before investigating the modulation of chemokine receptors expression and function *in vitro*, and considering the lack of data concerning the chemokine secretion by BM-Ad, we first search for their implication in the bone metastasis in human PCa. We used the cancer microarray database, Oncomine to identify expression microarray datasets that compared the expression of primary tumors *versus* distant bone metastases in order to create a specific cohort suitable for meta-analysis. According to previous data, on both local and distant dissemination, the expression pattern of CCR2, CCR3, CXCR2 and CXCR4 was investigated (Laurent et al., 2016). We identified 9 datasets, which contained the chosen chemokines receptor expression data that includes overall 286 samples with 249 primary tumors and 28 bone metastatic sites. Using this cohort, we showed that CCR2, CCR3 and CXCR2 RNA expression was up-regulated in bone metastatic sites compared to primary tumors whereas CXCR4 expression was down-regulated (Fig. 2A and B). Very interestingly, the highest difference was found for CCR3 expression. To investigate whether these receptors are involved in the chemoattractant potential of BMAd, both antagonists and blocking mAbs were used in the directed migration assays. UCB35625 is a dual inhibitor of CCR1/CCR3, but we have previously demonstrated that the PCa cell lines do not express the CCR1

receptor (Laurent et al., 2016). UCB35625 as well as CCR3 neutralizing mAb inhibit the migration of both PC3 and C4-2B cell lines by 40 to 60 % (Fig. 3A). By contrast, no significant effect was seen with antagonists or blocking mAbs directed against CCR2 (for which no commercial antibody was available), CXCR1, CXCR2 and CXCR4 (Fig. 3A). We then investigated the regulation of these effects by obesity and aging. Inhibition of CCR3 completely abrogated the increase of cell migration observed in obesity (Fig. 3B) and aging (Fig. 3C) in both PC3 and C4-2B cell lines. We have previously demonstrated that CCL7 is the main CCR3 ligand regulated by obesity in visceral adipose tissue (VAT) (Laurent et al., 2016). Similarly, CCL7 secretion is significantly enhanced in BMAd-CM from obese and aged patients (Fig. 3D). CCL7 secretion was lower in SAT and only regulated by obesity (Fig. 3D). These results suggest that obesity and aging increased the directed migration of PCa cells modulating the secretory pattern of adipocytes, this effect being mainly dependent on the CCR3/CCL7 axis.

CCR3 plays a role in bone metastasis *in vivo*.

In order to evaluate the *in vivo* relevance of our results, we used a murine PCa cell line, RM1-BM which is able to metastasize to multiple bony sites after intracardiac injection of immunocompetent C57BL/6 mice. RM1-BM cell line stably expressing short hairpin RNA against CCR3 (Sh-CCR3) showed 30% decreased of CCR3 expression at the cell surface compared to control (Sh-Ctrl) (Supplementary Fig. 2A and B) without changes of other chemokine receptors expression (Supplementary Fig. 2B). Migration of sh-CCR3 cells towards murine adipocyte conditioned media was decreased by 60 % compared to Sh-Ctrl and was not affected by the use of the CCR3 inhibitor UCB35625 or blocking antibody directed against CCR3 (Supplementary Fig. 2C). Sh-Ctrl and Sh-CCR3 cells were injected into the left ventricle of C57BL/6 mice. Upon introduction of Sh-Ctrl cells into the arterial circulation via intracardiac injection, tumors developed in multiple organs (brain, liver, kidneys) as well as to bones within two weeks of injection (Fig. 4A). In the absence of CCR3 (shCCR3), the rate and size of overall metastases dramatically decreased (Fig. 4A). The number of mice bearing metastases was 7/9 in control groups (78 %) only 2/9 (33%) in the mice injected with ShCCR3 cells. Accordingly, the density integration-based quantification showed a significant decrease of the signal in ShCCR3 versus Sh-Ctrl cells (fig. 4B). This decrease was further confirmed by the micro-CT analysis performed on isolated tibias. The significant increase of BV/TV ratio in Sh-CCR3 compared to Sh-Ctrl injected mice highlighted a decrease of osteolysis related to RM1-BM bone metastasis (fig. 4C).

Finally, to strengthen the clinical relevance of our results, we investigated CCR3 expression in different metastatic sites of PCa in two independent TMA. As shown in Fig. 5, the number of CCR3 positive tumors was significantly higher in bone *versus* visceral metastasis, whereas no significant differences were observed between lymph nodes

and bone sites. It is interesting to note that the majority of visceral metastases were negative for CCR3 expression.

Discussion

Our study highlights for the first time the role of BMAd in the bone homing of PCa cells and the importance of the CCR3 both *in vitro* and *in vivo* in this process. We first demonstrated that the BMAd secretions possess a strong ability to support the directed migration of PCa cells and that this effect was upregulated *in vitro* by obesity and aging. Secretion of chemokines has been shown to be upregulated in obesity mainly in VAT from obese animal models and humans (Makki et al., 2013). By contrast, the secretion profile of BMAd remains largely unexplored. Human adipocytes derived from *in vitro* differentiation of bone marrow stem cells (BMSCs) secrete the cytokines IL-6, MIP-1/CCL3, G-CSF, and GM-CSF (Corre et al., 2006). In mice, *in vitro* BMSC-derived adipocytes also produce CXCL1 and CXCL2, both ligands of the CXCR2 receptor (Hardaway et al., 2015). In both studies, the effect of obesity was not studied since *in vitro* models lack micro-environmental programming during differentiation. Fat tissue cytokines, including TNF α and IL-6, can increase with aging (Tchkonina, 2010) but the regulation of chemokine secretory profile with aging has not been studied in any fat depots to our knowledge. However, it is interesting to note that besides adipocytes, aging has already been shown to upregulate chemokine secretion in other cell type such as fibroblast (Bianchi-Frias et al., 2010; Nagineni et al., 2015) or lymphocyte (Chen et al., 2003). Since very little information was available on secreted chemokines, we choose to inhibit chemokine receptors known to be involved in PCa progression. Very interestingly, we first demonstrated using the Oncomine database that a set of chemokines receptor CCR2, CCR3 and CXCR2 RNA expression was up-regulated in bone metastatic sites compared to primary tumors whereas CXCR4 expression was down-regulated. Our results showing a decrease of CXCR4 expression in bone metastasis using Oncomine are in apparent contradiction with the study of Chen and Zhong (Chen and Zhong, 2015). Several reasons can account for these discrepancies. This study evaluates the expression levels of CXCR4 in primary tumors, which will further develop or not bone metastasis using therefore a correlative approach between CXCR4 expression and aggressiveness. In contrast, we choose to compare the expression of chemokine receptor between primary sites and metastatic sites, meaning that the tumor cells have been able to successfully invade the bone. Finally, the fact that we used normalized RNA chip analysis limit the inter-studies variation that could be observed in other meta-analysis. Among the receptors identified as up-regulated in human bone metastasis, CCR2, CCR3 and CXCR2 we demonstrated that the CCR3 is a master regulator of PCa cells migration towards BMAd-CM, using a set of using blocking mAbs and pharmacological inhibitors. The observed increase in migration associated with obesity and

aging is totally abrogated when CCR3 is inhibited, highlighting its key role in these altered conditions. As we previously described in PPAT (Laurent et al., 2016), CCL7, one of the ligand of CCR3, is likely to be involved in this effect since its secretion was enhanced in both conditions. The implication of CCR3 was further confirmed in mice in lean conditions by using the RM1-BM cell line that has been developed for its ability to metastasize to bone after intra-cardiac injection (Power et al., 2009). A global decrease in tumor burden was observed in mice injected with cells expressing ShCCR3 as compared to ShCtrl. Furthermore, using three-dimensional micro-computed tomographic reconstruction, which showed that tibiae of all the mice injected with the ShCCR3 cells had a larger bone volume than those injected with Sh Ctrl cells, assessing indirectly that the bone metastasis is affected *in vivo* by CCR3 depletion. Finally, a set of data performed in humans highlight the clinical relevance of our study. First, as stated before we observed an overexpression of CCR3 in bone metastasis *versus* primary tumors using the cancer microarray database Oncomine. Over-expression of CCR3 was also demonstrated using two independent TMA at protein levels in bone *versus* visceral metastasis of human PCa. Unfortunately, since the data used were not annotated in terms of metabolic parameters (even BMI), we were not able to demonstrate in human, the influence of obesity in this process.

By coupling these results to our previous study (Laurent et al., 2016), it appears that CCR3 is important throughout the development of PCa from local to distant dissemination. CCR3 appears to be a specific and interesting therapeutic target that could permit to limit the deadliest complication of prostate cancer, the bone metastasis, but also help in controlling further development of the disease. Therefore, our results suggest new strategies for the treatment of advanced PCa involving CCR3 antagonists, which are currently being developed for other diseases including asthma (Huber et al., 2008) . Moreover, our study suggests further investigation on the role of bone marrow adipocytes in cancer progression are clearly needed and especially their place in homing mechanisms and local progression of the bone lesions as they appear as important, but neglected, cells.

Bibliography:

- Adler, B.J., Kaushansky, K., and Rubin, C.T. (2014). Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche. *Nature Reviews Endocrinology* 10, 737-748.
- Chen, Q., and Zhong, T. (2015). The association of CXCR4 expression with clinicopathological significance and potential drug target in prostate cancer: a meta-analysis and literature review. *Drug Design, Development and Therapy*, 5115.
- Corre, J., Barreau, C., Cousin, B., Chavoin, J.-P., Caton, D., Fournial, G., Penicaud, L., Casteilla, L., and Laharrague, P. (2006). Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *Journal of Cellular Physiology* 208, 282-288.
- Gandaglia, G., Abdollah, F., Schiffmann, J., Trudeau, V., Shariat, S.F., Kim, S.P., Perrotte, P., Montorsi, F., Briganti, A., Trinh, Q.-D., *et al.* (2014). Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis. *The Prostate* 74, 210-216.
- Gong, Z., Agalliu, I., Lin, D.W., Stanford, J.L., and Kristal, A.R. (2007). Obesity is associated with increased risks of prostate cancer metastasis and death after initial cancer diagnosis in middle-aged men. *Cancer* 109, 1192-1202.
- Hardaway, A.L., Herroon, M.K., Rajagurubandara, E., and Podgorski, I. (2014). Bone marrow fat: linking adipocyte-induced inflammation with skeletal metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 33, 527-543.
- Hardaway, A.L., Herroon, M.K., Rajagurubandara, E., and Podgorski, I. (2015). Marrow adipocyte-derived CXCL1 and CXCL2 contribute to osteolysis in metastatic prostate cancer. *Clinical & Experimental Metastasis* 32, 353-368.
- Hardouin, P., Rharass, T., and Lucas, S. (2016). Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Frontiers in Endocrinology* 7.
- Huber, J., Kiefer, F.W., Zeyda, M., Ludvik, B., Silberhumer, G.R., Prager, G., Zlabinger, G.J., and Stulnig, T.M. (2008). CC Chemokine and CC Chemokine Receptor Profiles in Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Are Altered in Human Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93, 3215-3221.
- Laurent, V., Guérard, A., Mazerolles, C., Le Gonidec, S., Toulet, S., Nieto, L., Zaidi, F., Majed, B., Garandeau, D., Socrier, Y., *et al.* (2016). Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nature communications* 12.
- Lee, D.J., Mallin, K., Graves, A.J., Chang, S.S., Penson, D.F., Resnick, M.J., and Barocas, D.A. (2017). Recent Changes in Prostate Cancer Screening Practices and Epidemiology. *The Journal of Urology* 198, 1230-1240.
- Li, J., Liu, X., Zuo, B., and Zhang, L. (2016). The Role of Bone Marrow Microenvironment in Governing the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis. *Aging Dis* 7, 514-525.
- Liu, P., Liang, Y., Jiang, L., Wang, H., Wang, S., and Dong, J. (2018). CX3CL1/fractalkine enhances prostate cancer spinal metastasis by activating the Src/FAK pathway. *International journal of oncology* 53, 1544-1556.
- Lu, Y., Chen, Q., Corey, E., Xie, W., Fan, J., Mizokami, A., and Zhang, J. (2009). Activation of MCP-1/CCR2 axis promotes prostate cancer growth in bone. *Clinical & Experimental Metastasis* 26, 161-169.
- Lu, Y., Wang, J., Xu, Y., Koch, A.E., Cai, Z., Chen, X., Galson, D.L., Taichman, R.S., and Zhang, J. (2008). CXCL16 functions as a novel chemotactic factor for prostate cancer cells in vitro. *Molecular cancer research : MCR* 6, 546-554.
- Makki, K., Froguel, P., and Wolowczuk, I. (2013). Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflammation* 2013, 1-12.
- McCabe, N.P., Madajka, M., Vasanthi, A., and Byzova, T.V. (2008). Intraosseous injection of RM1 murine prostate cancer cells promotes rapid osteolysis and periosteal bone deposition. *Clinical & Experimental Metastasis* 25, 581-590.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327-334.
- Nassar, Z.D., Aref, A.T., Miladinovic, D., Mah, C.Y., Raj, G.V., Hoy, A.J., and Butler, L.M. (2018). Peri-prostatic adipose tissue: the metabolic microenvironment of prostate cancer. *BJU International* 121, 9-21.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460, 259-263.
- Park, S.H., Keller, E.T., and Shiozawa, Y. (2018). Bone Marrow Microenvironment as a Regulator and Therapeutic Target for Prostate Cancer Bone Metastasis. *Calcified tissue international* 102, 152-162.
- Power, C.A., Pwint, H., Chan, J., Cho, J., Yu, Y., Walsh, W., and Russell, P.J. (2009). A novel model of bone-metastatic prostate cancer in immunocompetent Mice. *The Prostate* 69, 1613-1623.
- Scheller, E.L., Cawthorn, W.P., Burr, A.A., Horowitz, M.C., and MacDougald, O.A. (2016). Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27, 392-403.
- Shiozawa (2011). Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest* 121, 1298-1312.

Shulby, S.A., Dolloff, N.G., Stearns, M.E., Meucci, O., and Fatatis, A. (2004). CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 4693-4698.

Sun, Y.-X., Schneider, A., Jung, Y., Wang, J., Dai, J., Wang, J., Cook, K., Osman, N.I., Koh-Paige, A.J., Shim, H., *et al.* (2005). Skeletal Localization and Neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 Axis Blocks Prostate Cancer Metastasis and Growth in Osseous Sites In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* 20, 318-329.

Tchkonina (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 9, 667–684.

Urata, S., Izumi, K., Hiratsuka, K., Maolake, A., Natsagdorj, A., Shigehara, K., Iwamoto, H., Kadomoto, S., Makino, T., Naito, R., *et al.* (2018). C-C motif ligand 5 promotes migration of prostate cancer cells in the prostate cancer bone metastasis microenvironment. *Cancer science* 109, 724-731.

Vindrieux, D., Escobar, P., and Lazennec, G. (2009). Emerging roles of chemokines in prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 16, 663-673.

Wang, Y.Y., Attané, C., Milhas, D., Dirat, B., Dauvillier, S., Guerard, A., Gilhodes, J., Lazar, I., Alet, N., Laurent, V., *et al.* (2017). Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight* 2.

Weilbaecher, K.N., Guise, T.A., and McCauley, L.K. (2011). Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature Reviews Cancer* 11, 411-425.

Xin, H., Cao, Y., Shao, M.L., Zhang, W., Zhang, C.B., Wang, J.T., Liang, L.C., Shao, W.W., Qi, Y.L., Li, Y., *et al.* (2018). Chemokine CXCL3 mediates prostate cancer cells proliferation, migration and gene expression changes in an autocrine/paracrine fashion. *International urology and nephrology* 50, 861-868.

Zhou, B.O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J.J., Naveiras, O., and Morrison, S.J. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nature Cell Biology* 19, 891-903.

Figure 1

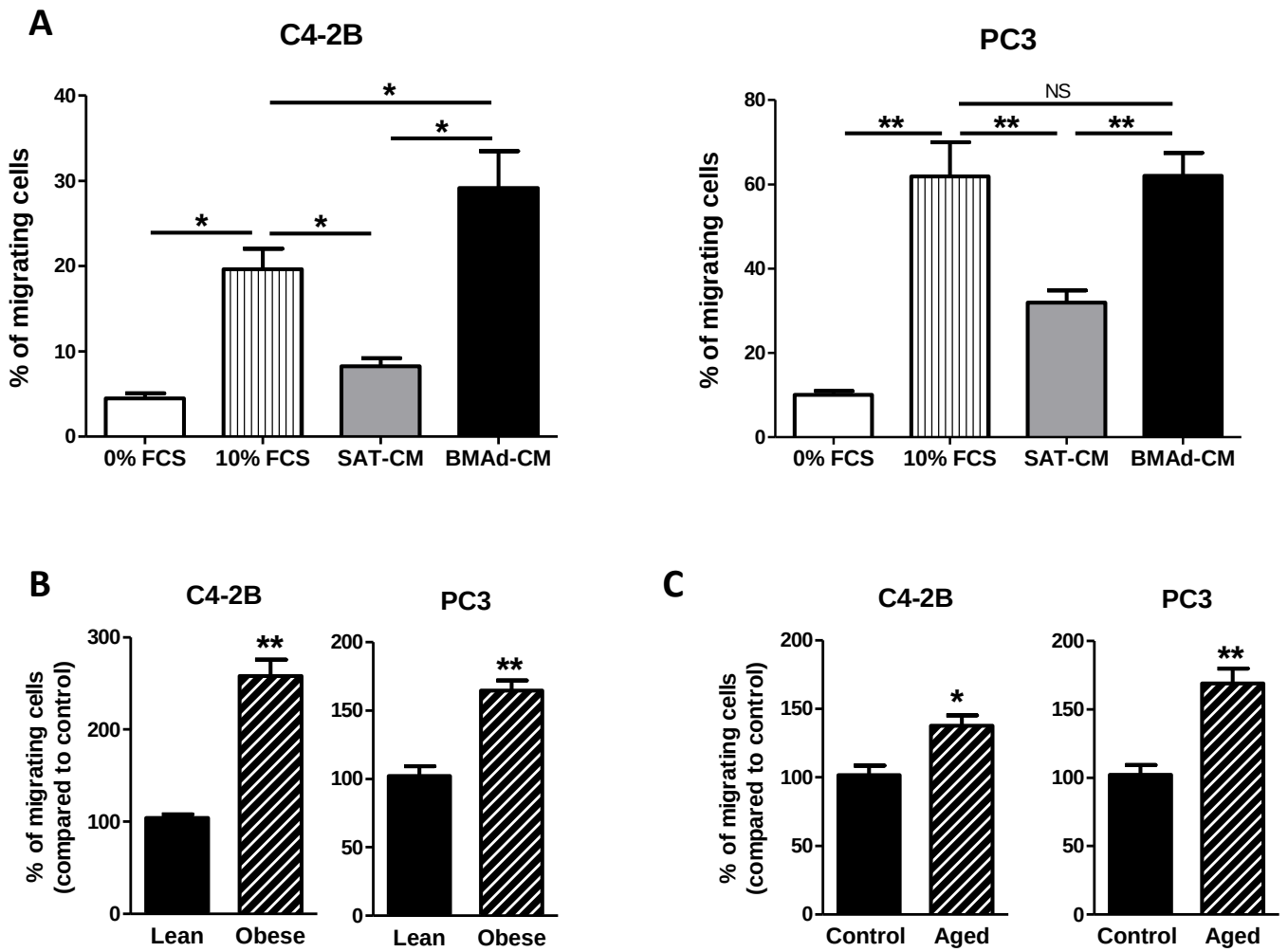
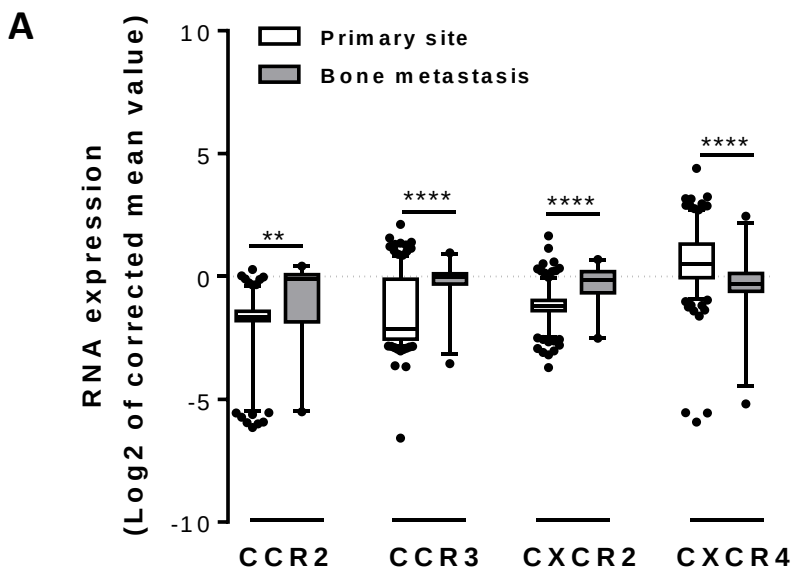


Figure 1. The chemotaxis of PCa cells towards BMAd-CM is enhanced by obesity and aging.

(A) *In vitro* migration of the indicated PCa cell lines towards a medium containing either 0% (used as a negative control), 10% FCS or towards SAT-CM or BMAd-CM (n=4/group). (B) *In vitro* migration of the indicated PCa cell lines towards BMAd-CM from lean (age: $62,8 \pm 6,9$ years, BMI: $21,4 \pm 3,3\text{kg/m}^2$) or obese (age: $63,3 \pm 10,1$ years, BMI: $33,3 \pm 2,3\text{kg/m}^2$) patients (n=5/group). (C) Similar experiments were performed with control (age: $60,2 \pm 5,2$ years, BMI: $22,1 \pm 3,5\text{kg/m}^2$) and aged (age: $75,7 \pm 5,7$ years, BMI: $23,3 \pm 4,3\text{kg/m}^2$) patients (n=5/group). Data are shown as mean $\pm$ sem. Statistically significant by Mann-Whitney's test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS, not significant.

Figure 2



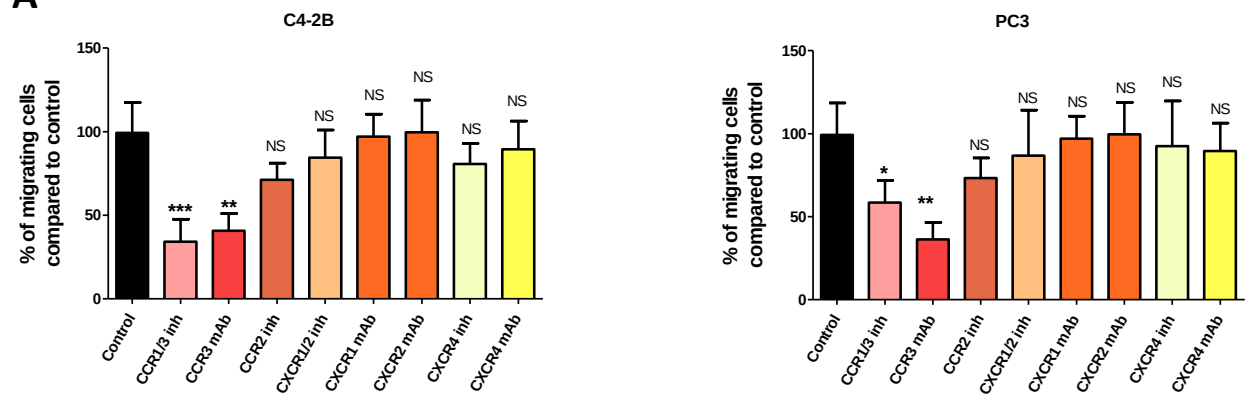
B

	Primary site (n= 249)	Bone (n= 28)	
CCR2 (n= 187) Median (Range) [Missing]	-1.6 (-6.2 ; 0.3) [82]	-0.1 (-5.5 ; 0.4) [8]	p < 0.01
CCR3 (n= 277) Median (Range) [Missing]	-2.1 (-6.6 ; 2.1) [0]	-0.0 (-3.5 ; 1.0) [0]	p < 0.0001
CXCR2 (n= 247) Median (Range) [Missing]	-1.2 (-3.7 ; 1.7) [22]	-0.1 (-2.5 ; 0.7) [8]	p < 0.0001
CXCR4 (n=252) Median (Range) [Missing]	0.5 (-5.9 ; 4.4) [20]	-0.3 (-5.2 ; 2.5) [5]	p < 0.0001

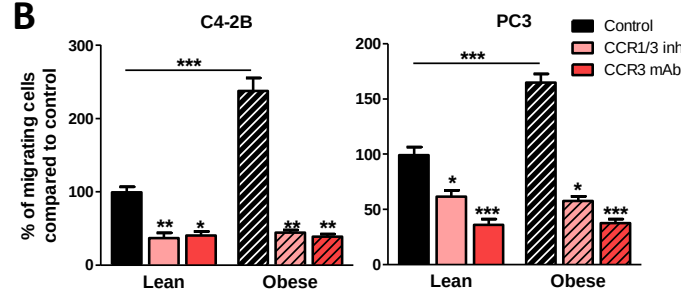
Figure 2. Overexpression of chemokine receptors in bone metastatic sites of human tumors. The cancer microarray database, Oncomine was used to compare the RNA expression of several chemokine receptors (CCR2, CCR3, CXCR2 and CXCR4) in patient samples collected from bone metastatic (grey squares) or primary sites (white squares) from nine different 9 data-set. Data were ordered by ‘over-expression’ and the threshold was adjusted to p-value <0,0001; fold change, 2 and gene rank, top 10%. Differences between the two independent groups were evaluated with Mann-Withney’s test : **p<0.01, **** p<0.0001.

Figure 3

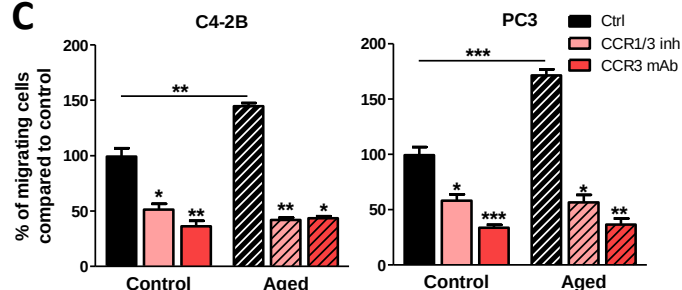
A



B



C



D

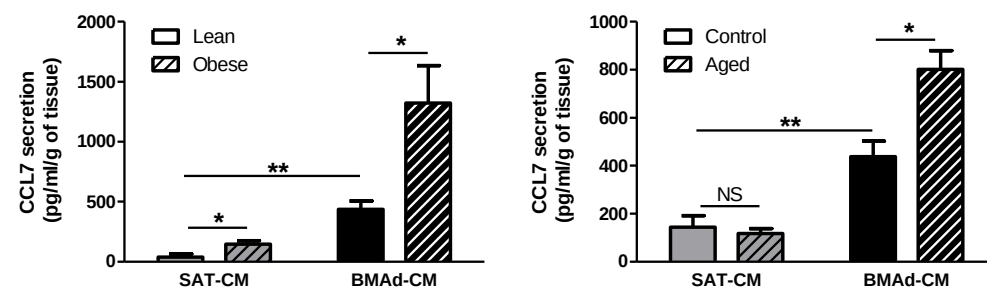


Figure 3 CCR3 is an important driver in the directed migration of prostate cancer cells towards BMAd-CM and its effect is majored in obesity and aging conditions. (A) *In vitro* migration of the indicated prostate cancer cell lines towards BM-Ad-CM treated or not with either pharmacological inhibitors against CCR1/CCR3 (UCB35625, 200nM), CCR2 (sc-202525, 25nM), CXCR1/2 (SB225002 inhibitor, 50nM) or CXCR4 (AMD3100, 100nM) or with mAbs against CCR1, CCR3, CXCR1, CXCR2 or CXCR4 (all used at 10μg/ml). Bar plots represent the percentage of migrating cells relative to the migration of untreated cells (set to 100%). Data are shown as mean ± sem (n=4-6). The statistical significance between means of migrating cells (in %) in treated *versus* control cells was evaluated with Kruskal-Wallis's test associated to a Dun's multiple comparison test. (B-C) Similar experiments were performed with the indicated cell lines towards BMAd-CM obtained either from lean/obese (B) or control/aged patients (C) in the presence of CCR3 inhibitors and blocking mAb. Data are shown as mean ± sem (n=4-9). (D) Secretion of CCL7 was evaluated by ELISA in SAT-CM or BMAd-CM either obtained from lean/obese or control/aged patients. Data are shown as mean ± sem (n= 3-5). The statistical significance between mean of migrating cells (with the control groups set at 100%) was evaluated by Mann-Whitney's test. *statistically significant by Mann-Whitney's test or Kruskal-Wallis test. * p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001, NS: not significant.

[illegible]

C

Dot plot showing the number of cells per field for h-Ctrl and CCR3 groups. The y-axis represents the number of cells per field, ranging from 25 to 45. The x-axis shows two groups: h-Ctrl and CCR3. The h-Ctrl group has a mean of approximately 35.5 cells per field, while the CCR3 group has a mean of approximately 40.5 cells per field. A horizontal bar with an asterisk (*) indicates a significant difference between the two groups.

Group	Number of cells per field (individual data points)	Mean ± SEM
h-Ctrl	30, 32, 35.5, 36, 38, 40	35.5 ± 1.5
CCR3	39.5, 40, 40.5, 41, 41.5, 42	40.5 ± 0.5

Figure 4: CCR3 controls bone homing of PCa cells *in vivo*. (A) Sh-Ctrl or Sh-CCR3 transfected RM1-BM cells were injected into the left ventricle of 18 week-old C57BL/6 mice (n=9 for each type of cells). Two weeks after, the presence of the tumor cells was monitored by bioluminescence on ventral face. Representative images of bioluminescence signals are shown. The color code is set up according to grey levels of bioluminescence signals (B) The intensity of the bioluminescent pixels was integrated in each injected mice. Each dot represents an isolated mice. (C) Micro-CT analysis were performed on tibias isolated from each mice and the bone volume over total volume (BV/TV) was calculated. Each dot represents the mean of the measurement of the two tibias from the same mice. *statistically significant by Mann-Whitney's test or Kruskal-Wallis test. * p<0.05.

Figure 5

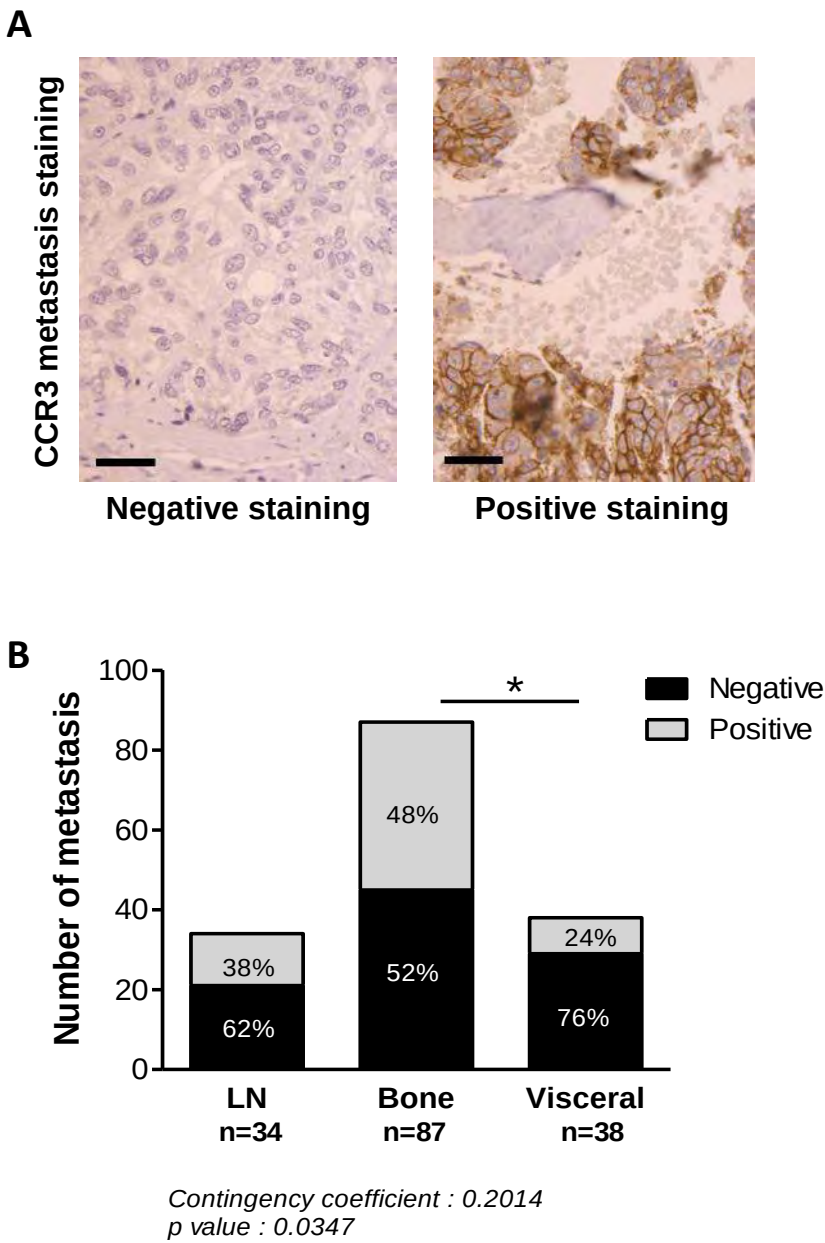
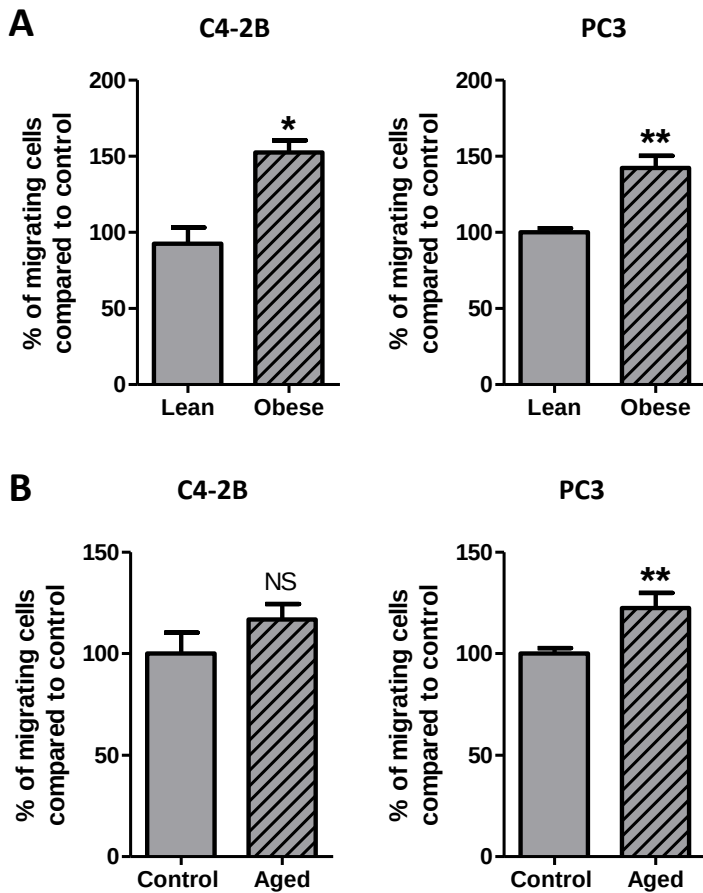


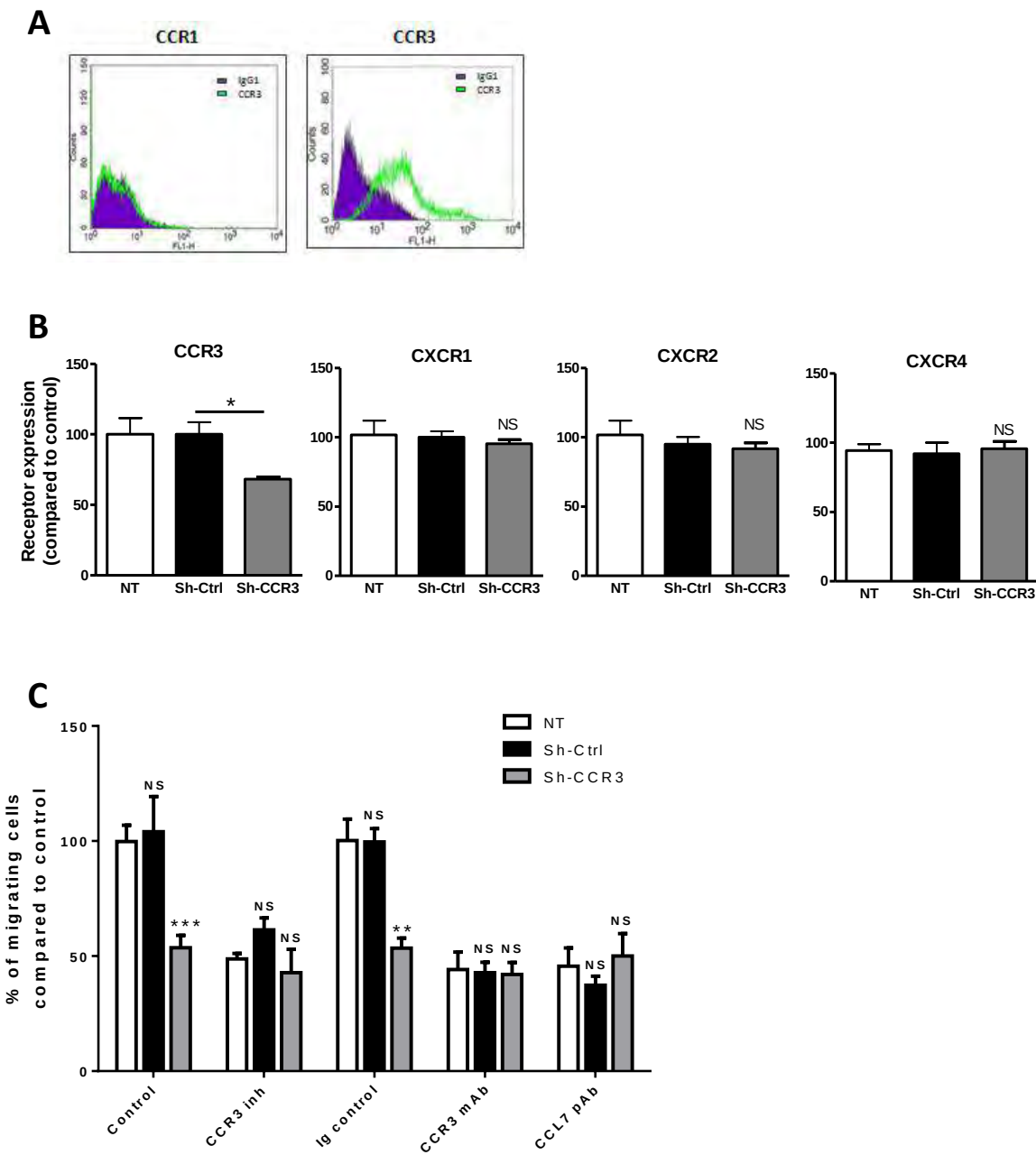
Figure 5: CCR3 is overexpressed in bone compared to visceral metastasis in human PCa. Metastatic prostate cancer samples coming from different sites (lymph nodes (LN), visceral or bone) were stained for CCR3, and categorized as positive or negative for CCR3 expression. **(A)** Representative examples of negative and positive staining in bone metastases are shown. Scale bars, XXXX. **(B)** Quantification of the number of metastasis negative or positive for CCR3 according to their anatomical location (LN (n=34), visceral (n=38) or bone (n=87). Percentage of each group is mentioned in each bar graph. Chi2 statistic test was performed (p=0,0347) and contingency coefficient was calculated (0,2014). Comparison between location was evaluated by fisher's exact post test (* p<0,05).

Supp. Figure 1



Supplementary Figure 1. Regulation of the chemotaxis of Human PCa cells towards SAT-CM by obesity and aging. (A) *In vitro* migration of the indicated prostate cancer cell lines towards conditioned medium SAT (SAT-CM) from lean (age: $62,8 \pm 6,9$ years, BMI: $21,4 \pm 3,3$ kg/m²) or obese (age: $63,3 \pm 10,1$ years, BMI: $33,3 \pm 2,3$ kg/m²) patients (n=5/group) (B) similar experiments were performed with control (age: $60,2 \pm 5,2$ years, BMI: $22,1 \pm 3,5$ kg/m²) and aged (age: $75,7 \pm 5,7$ years, BMI: $23,3 \pm 4,3$ kg/m²) patients (n=5/group). Data are shown as mean $\pm$ sem. The statistical significance of differences between mean of migrating cells (with the control groups set at 100%) was evaluated by Mann-Whitney's tests: * statistically significant by Mann-Whitney's test $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Supp. Figure 2



Supplementary Figure 2 Characterization of the RM1-BM cells depleted for CCR3 expression. (A) One representative experiment out of three showing the expression of CCR3 and CCR1 in RM1-BM cell line by flow cytometry analysis. (B) Quantification of three experiments showing CCR3, CXCR2, CXCR1 and CXCR4 expression detected by flow cytometry in RM1-BM non transfected (NT) or transfected by control (Sh-Ctrl) or anti-CCR3 (Sh-CCR3) shRNA. (C) *In vitro* migration of non transfected RM1-BM or RM1-BM transfected by control (Sh-Ctrl) or anti-CCR3 (Sh-CCR3) shRNA. Cells migrated towards murine adipocytes conditioned media as a chemoattractant and were treated or not with UCB35625 (200 nM), anti-CCR3, anti-CCL7 Abs, or control isotype (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. ($n=3$) and are expressed as the percentage of migrating cells relative to the migration of untreated cells (set to 100%). The statistical significance of differences between means of migrating cells in treated versus untreated cells was evaluated with Mann-Whitney's tests : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS stand for non-significant.

Revue 1

III. Dissémination du cancer de la prostate : un chemin pavé de gras

(Laurent *et al*, Médecine Science (Paris) Juin-Juillet 2016)

Dissémination locale du cancer de la prostate

Un chemin pavé de gras

Victor Laurent¹, Adrien Guérard¹, Aurélie Toulet¹, Philippe Valet², Bernard Malavaud³, Catherine Muller¹

Le pronostic du cancer de la prostate est aggravé par l'obésité

Malgré les progrès réalisés en termes de dépistage, de diagnostic et de traitement, le cancer de la prostate demeure, chez l'homme, le cancer le plus fréquent et occupe la deuxième place en termes de mortalité dans les pays développés. L'identification des facteurs de risque de développement de cette maladie, ainsi que des mécanismes impliqués, est un enjeu majeur dans la prise en charge de cette pathologie. La prévalence de l'obésité a plus que doublé au niveau mondial ces 30 dernières années et, si l'obésité n'augmente pas l'incidence du cancer de la prostate, elle est associée à l'apparition de cancers agressifs présentant une augmentation de la dissémination locale et à distance [1]. Comment expliquer ce lien ? Dans un contexte d'obésité, l'accumulation de tissu graisseux, en particulier au niveau viscéral,

s'accompagne d'une modification du taux circulant de nombreuses molécules biologiquement actives sécrétées par le tissu adipeux (TA). Ces molécules, appelées adipokines et dont font partie la leptine, l'adiponectine et certaines molécules pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL6) [2], sont susceptibles d'affecter le comportement des tumeurs [3] (→).

Dans le cancer de la prostate, aucune étude clinique robuste n'a associé les taux circulants de ces adipokines à l'apparition de cancers agressifs. Le mécanisme impliqué pourrait donc être de nature paracrine plus qu'endocrine. Ainsi, nos travaux associés à ceux d'autres équipes ont montré, en particulier dans le cancer du sein, le rôle déterminant que joue le tissu adipeux à proximité des tumeurs dans la progression tumorale (pour

(→) Voir la Synthèse de V. Laurent et al., m/s n° 4, avril 2014, page 398

¹ Institut de pharmacologie et de biologie structurale (IPBS), université de Toulouse, CNRS, UPS, 205, route de Narbonne, 31077 Toulouse, France ;

² Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC), université de Toulouse, Inserm, UPS, 1, avenue Jean Poulhès, 31077 Toulouse, France ;

³ Département d'urologie, institut universitaire du cancer, avenue Irène Joliot-Curie, 31059 Toulouse cedex 9, France. muller@ipbs.fr

revue voir [3]). Si la proximité entre la tumeur et le TA est évidente dans le sein, qu'en est-il pour la prostate ?

La prostate : une glande dans un « îlot » graisseux

La prostate est entourée d'un dépôt graisseux appelé tissu adipeux périprostatique (TAPP), que l'on peut aisément visualiser par imagerie (Figure 1). Ce tissu adipeux est classé comme un tissu adipeux viscéral (TAV) bien que très peu d'études aient réellement caractérisé ses capacités fonctionnelles et sécrétoires. Cliniquement, l'infiltration du TAPP par les cellules cancéreuses est considérée comme un facteur de mauvais pronostic [4] et des études cliniques émergentes suggèrent qu'il pourrait exister un lien entre l'abondance du TAPP et l'agressivité du cancer

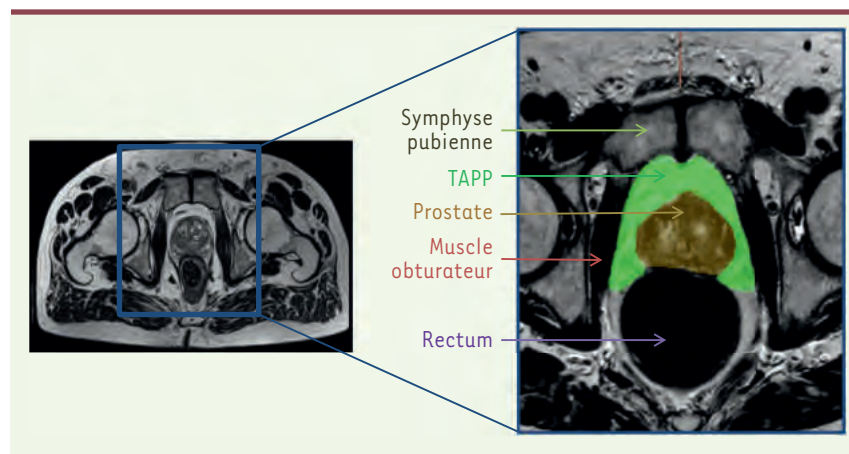


Figure 1. La prostate est entourée d'un dépôt graisseux : le tissu adipeux périprostatique. L'étude de l'anatomie de la prostate et des tissus environnants peut se faire par imagerie par résonance magnétique sur des coupes axiales. Sur cette coupe, on peut identifier un organe central : la prostate (zone jaune). Cet organe est entouré d'autres tissus, composés majoritairement par un dépôt adipeux, appelé tissu adipeux périprostatique (TAPP) (zone verte). Ce TAPP est limité par la symphyse pubienne en avant, le rectum en arrière et les muscles obturateurs latéralement. La prostate et

le TAPP sont facilement identifiables en imagerie, grâce à leurs coefficients d'atténuation différents qui permettent d'obtenir un signal propre à chacun de ces deux tissus.

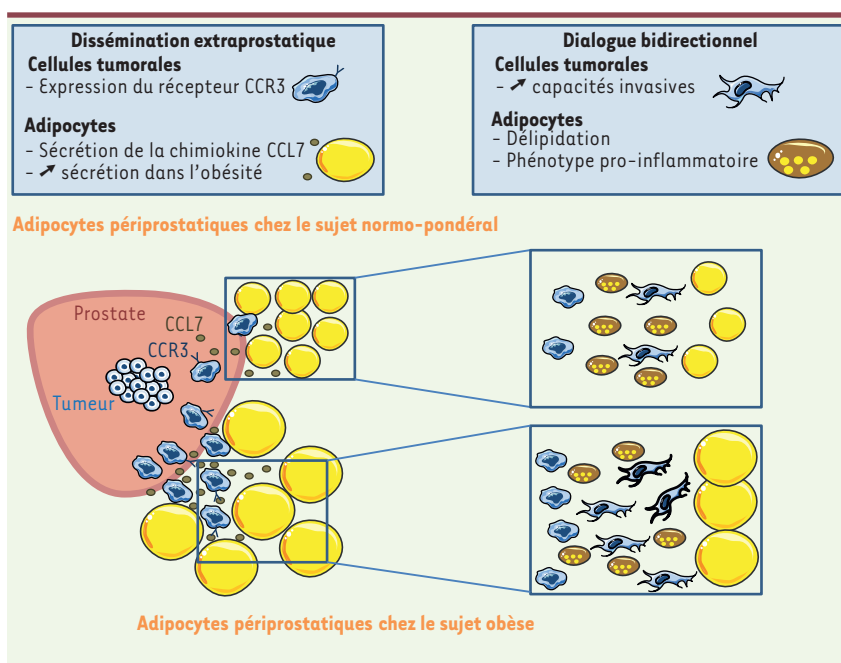


Figure 2. Rôle paracrine des adipocytes périprostatiques dans la dissémination locale du cancer de la prostate. Les adipocytes du TAPP sécrètent la chimiokine CCL7 qui va diffuser au travers de la capsule prostatique jusqu'à la tumeur. L'interaction de CCL7 avec son récepteur CCR3 exprimé à la surface des cellules tumorales va permettre la migration de ces dernières en dehors de la glande prostatique. Les adipocytes hypertrophiques sécrètent en plus grande quantité la chimiokine CCL7, aboutissant à une augmentation du chimiotactisme dépendant des adipocytes. Ce mécanisme permet d'expliquer pourquoi la dissémination extraprostatique est plus élevée chez le sujet obèse. Dans un second temps, après l'infiltration du TAPP par les cellules tumorales, un dialogue bidirectionnel entre les deux populations va se mettre en place. Sous l'influence des cellules tumorales,

le phénotype des adipocytes est profondément remanié. Ces derniers vont notamment présenter une délipidation importante et une sécrétion accrue de molécules pro-inflammatoires. Ces modifications vont avoir pour conséquence d'augmenter en retour les capacités invasives des cellules cancéreuses. CCL7 : chimiokine (C-C motif) ligand 7 ; CCR3 : chimiokine (C-C motif) receptor 3 ; TAPP : tissu adipeux périprostatique.

de la prostate [5]. Ces études, bien que préliminaires, renforcent l'idée d'un rôle paracrine du TAPP dans la progression du cancer de la prostate, rôle qui pourrait être amplifié dans un contexte d'obésité. Les sécrétions du TAPP semblent avoir un effet sur le comportement des cellules prostatiques en stimulant leur prolifération ainsi que leurs capacités migratoires et invasives et cet effet est régulé par l'obésité [6]. De façon très intéressante, cette influence est moins prononcée pour les sécrétions du TAV que pour celles du TAPP suggérant, pour ce dernier, un profil de sécrétion spécifique. Parmi les acteurs impliqués dans cet effet, on retrouve principalement l'IL6 et les métalloprotéases¹ 2 et 9 [6]. Les sécrétions du TAPP pourraient donc influencer les propriétés invasives des cellules tumorales bien que ce concept n'ait pas été validé *in vivo*. Dans ce contexte, nous avons émis une hypothèse originale sur

le rôle du TAPP. En effet, il est connu que le TA, et en particulier les adipocytes, sécrètent des chimiokines, petites molécules capables de stimuler la migration dirigée de nombreuses cellules [2]. La sécrétion de certaines chimiokines est augmentée dans l'obésité et participe à l'état sub-inflammatoire du TA en permettant le recrutement de cellules du système immunitaire [7]. Les récepteurs à chimiokines étant exprimés par les cellules cancéreuses [8], ce mécanisme pourrait expliquer comment le TAPP favorise une étape clé dans le cancer de la prostate, le franchissement de la capsule prostatique et donc l'envahissement local de la tumeur, l'obésité favorisant ce processus.

L'axe CCR3/CCL7 est déterminant pour la dissémination locale du cancer de la prostate dans un contexte d'obésité

Dans un premier temps, nous avons montré qu'*in vitro*, les sécrétions adipocytaires sont capables de favoriser la migration dirigée de lignées de cancer de la prostate et que cet effet est

amplifié par l'obésité. Cette migration dirigée dépend de l'axe CCR3 (chimiokine [C-C motif] receptor 3), exprimé par les cellules prostatiques, et son ligand CCL7/MCP3 (chimiokine [C-C motif] ligand 7, aussi appelé monocyte-specific chemokine 3) sécrété par les adipocytes. *In vitro*, l'effet de l'obésité est totalement aboli par des anticorps bloquants dirigés contre ces deux protéines. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*. En effet, l'injection en intra-prostatique de cellules tumorales n'exprimant plus CCR3 inhibe très fortement la progression tumorale, surtout chez les souris obèses, préservant le TAPP d'une infiltration tumorale. Enfin, chez les patients, l'expression de CCR3 (régulée par l'obésité) est corrélée à l'apparition de tumeurs agressives présentant une extension locale, et est associée à une résistance au traitement chirurgical et à une rechute biologique plus précoce [9]. Ce travail confirme ainsi que l'infiltration des cellules cancéreuses prostatiques dans le TAPP environnant est sous le contrôle

¹ Famille d'enzymes de la classe des peptidases dont le nom vient de la présence d'un ion métallique dans leur site actif.



des sécrétions de ce dernier et que cet effet est amplifié dans l'obésité.

Conclusions et perspectives

Ce travail met en exergue un nouveau rôle du tissu adipeux dans la progression tumorale. Ce mécanisme, impliquant la migration dirigée dans l'envahissement local, pourrait être étendu à d'autres tumeurs qui présentent un TA de proximité, comme par exemple le cancer du sein, du côlon, du pancréas ou le mélanome. Il est intéressant de signaler que l'axe CCR3/CCL7 semble spécifique du cancer de la prostate [9] et que, si les adipocytes sont effectivement capables d'attirer de très nombreux types de cellules tumorales, les couples récepteurs à chimiokines/chimiokines impliqués restent à identifier et pourraient être différents pour chaque type de tumeur. Dans le cancer de la prostate, l'inhibition de CCR3 pourrait présenter un intérêt thérapeutique. En effet, bloquer l'infiltration du TAPP est d'autant plus important qu'une fois les cellules cancéreuses présentes dans le TA, un dialogue bidirectionnel s'instaure entre celles-ci et les adipocytes, favorisant ainsi l'invasion tumorale (et donc le processus

métastatique) via la capacité des adipocytes à (1) sécréter des molécules pro-inflammatoires, (2) sécréter des protéines de la matrice extracellulaire, (3) remodeler la matrice extracellulaire, mais également (4) modifier le métabolisme des cellules tumorales (pour revue voir [3]) (Figure 2). Notre étude est une des premières à montrer le rôle de CCR3 dans le cancer. Jusqu'alors, ce récepteur, fortement exprimé par les polynucléaires éosinophiles et basophiles, a surtout été impliqué dans des maladies inflammatoires allergiques telles que l'asthme [10]. Des inhibiteurs de CCR3 étant en cours de développement dans cette indication, leur efficacité dans le cancer de la prostate, en particulier chez le sujet obèse, serait intéressante à évaluer. ♦

Dissemination of prostate cancer: a way paved of fat

REMERCIEMENTS

Les travaux réalisés dans nos équipes ont bénéficié du soutien financier de l'INCA (INCA PL 2010-214, PV et CM), de la Ligue Régionale Midi-Pyrénées Contre le Cancer (CM), de la Fondation de France (PV et CM) et de l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs Prostatiques ARTP (CM). Victor Laurent a bénéficié d'une bourse de thèse de l'ARC.

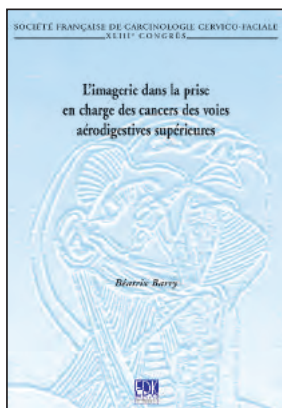
LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Parker AS, Thiel DD, Bergstralh E, et al. Obese men have more advanced and more aggressive prostate cancer at time of surgery than non-obese men after adjusting for screening PSA level and age: results from two independent nested case-control studies. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013 ; 16 : 352-6.
2. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011 ; 11 : 85-97.
3. Laurent V, Nieto L, Valet P, Muller C. Tissu adipeux et cancer. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 398-404.
4. Kapoor J, Namdarian B, Pedersen J, et al. Extraprostatic extension into periprostatic fat is a more important determinant of prostate cancer recurrence than an invasive phenotype. *J Urol* 2013 ; 190 : 2061-6.
5. van Roermund JG, Hinnen KA, Tolman CJ, et al. Periprostatic fat correlates with tumour aggressiveness in prostate cancer patients. *BJU Int* 2011 ; 107 : 1775-9.
6. Ribeiro R, Monteiro C, Cunha V, et al. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *J Exp Clin Cancer Res* 2012 ; 31 : 32.
7. Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T. Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Biomolecules* 2015 ; 5 : 1563-79.
8. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004 ; 4 : 540-50.
9. Laurent V, Guérard A, Mazerolles C, et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 10230.
10. Garcia G, Godot V, Humbert M. New chemokine targets for asthma therapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005 ; 5 : 155-60.

Bon de commande



À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex

Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 43 29 32 62 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **L'imagerie dans la prise en charge des cancers des voies aérodigestives supérieures** : 35 € + 3 € de port = **38 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de **EDK**

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai ainsi pu identifier un axe chimiorécepteur/chimiokine innovant : l'axe CCR3/CCL7. Cet axe est ainsi responsable à la fois de dissémination locale et de la dissémination métastatique osseuse. Cet axe nous a aussi permis de relier les tissus adipeux au développement du cancer de la prostate. En effet, le récepteur CCR3 est exprimé par les cellules tumorales prostatiques et le ligand CCL7 est sécrété par le TAPP et les adipocytes médullaires, respectivement dans le cas de la dissémination locale et de la dissémination à distance. Par ailleurs, j'ai aussi pu montrer que l'obésité renforce la dissémination locale du cancer de la prostate à cause d'une augmentation de la sécrétion de CCL7 par le TAPP aboutissant au renforcement de l'axe CCR3/CCL7. La même constatation a pu être faite dans la dissémination métastatique osseuse chez les patients obèses ou âgés. En effet, ces deux conditions augmentent la sécrétion de CCL7 par les adipocytes médullaires et favorisent la migration à distance des cellules tumorales prostatiques par renforcement de l'axe CCR3/CCL7.

I. Dissémination locale et rôle du tissu adipeux périprostatique :

D'un point de vue anatomique, la prostate est entourée par des dépôts de tissus adipeux périprostatiques dont elle n'est séparée que par une simple barrière de collagène, la capsule prostatique⁵⁰. Ces dépôts adipeux périprostatiques font partie des premiers tissus envahis lors de la dissémination locale du cancer de la prostate⁹. Si on prend en compte le fait que l'invasion du TAPP est un facteur de mauvais pronostic clinique⁹, il semble probable que ce tissu adipeux joue un rôle dans la dissémination locale du cancer de la prostate et le franchissement de la barrière. Par ailleurs, le tissu adipeux, bien loin d'être un tissu de stockage inactif, est capable de sécréter de nombreuses cytokines et chimiokines regroupées sous le nom générique d'adipokines³. Les chimiokines sont un sous-groupe de cytokines capables d'induire la migration dirigée de différentes cellules dont les cellules tumorales⁴⁸⁸. C'est pourquoi, au cours de nos travaux, nous avons émis l'hypothèse que les chimiokines sécrétées par le tissu adipeux périprostatique sont capables d'attirer les cellules tumorales prostatiques et de favoriser leur dissémination locale au sein des tissus environnants. En étudiant les chimiokines sécrétées par le TAPP, nous avons pu montrer qu'un axe en particulier joue un rôle important dans la migration induite par les sécrétions adipocytaires. Il s'agit de l'axe CCL7/CCR3. On observe ainsi un gradient croissant de CCL7 du centre de la prostate vers le TAPP, amenant les cellules tumorales à disséminer localement et à franchir la barrière prostatique. De façon intéressante, les adipocytes sont les seules cellules à sécréter cette chimiokine dans le tissu adipeux. Par ailleurs, les cellules tumorales elles-mêmes, ne sécrètent pas la chimiokine CCL7. Les adipocytes restent donc la source principale de CCL7 dans le microenvironnement étudié. Cet

axe CCL7/CCR3 est principalement impliqué dans le recrutement des éosinophiles et n'avait été décrit auparavant dans le contexte oncologique que lors d'une étude portant sur les carcinomes buccaux⁴⁴. L'implication de l'axe CCR3/CCL7 dans la migration des cellules tumorales semble néanmoins spécifique aux cellules tumorales prostatiques. Nos expériences sur d'autres types de cancers montrent que la migration induite par les sécrétions du tissu adipeux sont dépendantes d'autres récepteurs comme CXCR2 et CXCR4 dont l'inhibition permet de bloquer la migration des cellules tumorales mammaires, pancréatiques, du colon et de mélanome (résultats non montrés). Afin de confirmer ces observations et de vérifier leur implication dans les tumeurs humaines, il pourrait être intéressant de réaliser une étude histologique poussée utilisant des coupes de tumeurs invasives de différents cancers, en analysant le niveau d'expression de plusieurs récepteurs aux chimiokines au front invasif et au centre de la tumeur de différents cancers. Nous pourrions ainsi observer les récepteurs spécifiquement renforcés en contact avec le tissu adipeux dans les différents cancers. Ces récepteurs pourraient être comparés en fonction de leur grade et/ou de leur dissémination métastatique. Ce type d'étude nous permettrait de cartographier le profil de dépendance de chaque cancer vis-à-vis des axes chimiokines/chimiorécepteurs et leur influence dans l'invasion locale.

Par ailleurs, nous nous sommes aussi intéressés à la place de l'obésité dans ce phénomène. En effet, l'obésité est non seulement une modification pathologique du tissu adipeux mais aussi un facteur de mauvais pronostic important du cancer de la prostate qui n'a pas d'influence sur son incidence mais en augmente fortement l'agressivité¹⁴. Notre étude apporte pour la première fois une explication mécanistique à ce phénomène puisque nous avons pu montrer que les sécrétions issues d'adipocytes obèses sont plus chimioattractantes que celles des sujets normopondéraux. Par ailleurs, l'axe CCL7/CCR3 est entièrement responsable de l'effet de l'obésité sur l'invasion tumorale puisque son inhibition invalide cet effet.

In vivo, on observe, là aussi, l'implication majeure de CCR3 dans la dissémination et la croissance tumorale puisque son invalidation empêche le développement de la tumeur suite à une injection intraprostatique d'une lignée tumorale syngénique. Par ailleurs on y observe aussi l'effet de l'obésité avec un accroissement de la croissance tumorale chez les souris nourries par un régime riche en lipide (HFD). L'effet de l'obésité est aussi dépendant de CCR3 *in vivo* puisque l'on perd totalement cette amplification suite à une invalidation de CCR3. Cet effet n'est pas consécutif à une altération de la prolifération cellulaire puisque la lignée contrôle et la lignée invalidée pour CCR3 présentent des courbes de prolifération identiques. Néanmoins,

un rôle de CCR3 dans la résistance à l'apoptose n'est pas à exclure. En effet, il a été montré que CCR3 peut générer un effet protecteur contre l'apoptose dans certains types cellulaires^{425,489}

Chez l'Homme, une étude réalisée sur une collection originale annotée contenant 103 tumeurs (collaboration Dr Catherine Mazerolles, IUCT-oncopole CHU Toulouse) a montré que CCR3 est exprimé dans les tumeurs prostatiques et non dans l'épithélium prostatique sain. De plus, une forte expression de CCR3 dans la tumeur est associée à un haut score de Gleason, ainsi qu'à un pourcentage de contingent indifférencié élevé (% de Gleason élevé dans la tumeur), à une localisation périphérique, à un stade pTNM supérieur à pT3 et enfin à la rechute biologique. De manière intéressante, l'ensemble de ces critères correspond à des tumeurs agressives et de mauvais pronostics. Néanmoins, nous n'avons pas pu étudier le lien entre l'expression de CCR3, le développement tumoral et l'obésité car notre étude comporte à l'heure actuelle très peu de patients obèses (moins de 10% des patients) et les rares patients obèses intégrés dans cette étude possèdent par ailleurs un IMC peu élevé et une obésité qui reste donc modérée (IMC compris entre 30 et 35). Cependant, il est important de préciser que les caractéristiques sur le plan de l'obésité sont un parfait reflet de celles trouvées en région Midi-Pyrénées, zone géographique dans laquelle a été créé cette cohorte. Afin de réellement conclure sur un effet clinique de CCR3 sur le cancer de la prostate dans un contexte d'obésité, il serait donc nécessaire de réaliser le même type d'expérience mais en incluant un plus grand pourcentage de patients obèses avec un IMC supérieur à 35, comme dans les études épidémiologiques portant sur l'agressivité du cancer de la prostate liée à l'obésité. Du fait de notre récente collaboration avec le réseau du Prostate Biorepository, nous pourrions imaginer utiliser leurs ressources afin de réaliser cette étude. Ce réseau étant situé aux Etats-Unis, où le taux d'obésité ainsi que les IMC des patients obèses sont particulièrement élevés. Une telle étude permettrait aussi de faire une vraie discrimination entre les patients normopondéraux et obèses.

Ces premiers travaux réalisés au cours de mon travail de thèse nous ont aussi permis de soulever la question de la place du TAPP dans le cancer de la prostate. Au cours des dernières années une nouvelle notion est apparue, reliant l'agressivité tumorale à ce tissu : il s'agit de la notion de densité ou d'abondance du TAPP. Ainsi, au cours d'études anatomiques et grâce à des mesures IRM, il a pu être montré que non seulement les volumes des dépôts de TAPP sont variables d'un patient à l'autre mais qu'ils sont en outre corrélés à l'apparition de cancer de la prostate plus agressifs et ceci indépendamment de l'IMC du patient⁴⁹⁰⁻⁴⁹². Par ailleurs, lors d'expériences préliminaires, nous avons pu observer que ce tissu adipeux se comporte comme un dépôt de tissu adipeux ectopique et évolue indépendamment de l'IMC, sans corrélation avec

l'obésité. Il semble par contre évoluer avec l'âge du patient et plus un patient vieillit et plus ce dépôt augmente en taille (données non montrées). Ces observations nous amènent naturellement à penser qu'il serait intéressant de réaliser une nouvelle cohorte clinique en classant les tumeurs issues de patients non par rapport à leur IMC mais par rapport au volume de leur TAPP mesuré par IRM. Ce type d'étude nous permettrait de voir si l'axe CCR3/CCL7 que nous avons identifié ou d'autres fonctions de ce TAPP présentent un lien clinique avec le développement des cancers de la prostate chez les patients à fort volume de TAPP. Par ailleurs, ce tissu semblant être fortement influencé par le vieillissement. Il serait donc intéressant d'étudier les modifications du TAPP chez les patients âgés aussi bien en termes de volume que de phénotype. En effet, comme nous l'avons expliqué précédemment, le vieillissement est un facteur de risque important du cancer de la prostate, agissant aussi bien au niveau de l'incidence de ce cancer qu'au niveau de son agressivité^{15,160}. Il serait donc particulièrement pertinent de s'intéresser aux modifications de ce TAPP liées à l'âge afin d'identifier des facteurs pouvant influencer le développement de tumeurs prostatiques et pouvant donc être de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes. Par ailleurs, si certaines fonctions ou caractéristiques du TAPP se retrouvent corrélées à l'incidence ou au pronostic du cancer de la prostate, il serait intéressant d'étudier son impact d'un point de vue clinique : résistance au traitement, rechute ... Ceci permettrait alors d'évaluer l'intérêt d'une mesure de volume de TAPP au cours d'une IRM pelvienne (un examen simple et réalisé en routine) dans les choix de prise en charge d'un patient atteint de cancer de la prostate.

Enfin on peut aussi se poser la question d'une éventuelle modification des capacités invasives des cellules tumorales suite à l'infiltration du TAPP. En effet, comme nous avons pu le montrer précédemment, l'invasion du TAPP est un facteur de mauvais pronostic clinique⁹. On peut donc supposer que les adipocytes du TAPP pourraient être des acteurs clés dans l'initiation de la dissémination métastatique. Au cours d'expériences menées lors de mes travaux de thèse, nous avons pu voir que les cellules tumorales situées au front invasif et envahissant le TAPP expriment plus fortement le récepteur CCR3 que les cellules se trouvant au centre de la tumeur. Par ailleurs, au cours d'expériences de co-culture *in vitro* où nous avons cultivé des adipocytes du TAPP et des cellules tumorales prostatiques, nous avons pu observer une surexpression du récepteur CCR3. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de modifications des autres récepteurs aux chimiokines connus dans l'invasion tels que CXCR2, CXCR1 ou CXCR4 (résultats non montrés). Ces cellules co-cultivées au préalable avec les adipocytes de TAPP présentent par ailleurs une augmentation de leur capacité à migrer contre les sécrétions des

adipocytes médullaires sous la dépendance de l'axe CCR3/CCL7, suggérant une augmentation de leurs capacités à générer des métastases (résultats non montrés). Il semblerait donc que l'invasion du TAPP soit un passage essentiel dans l'éducation des cellules tumorales prostatiques afin de favoriser leur dissémination métastatique. La raison de la surexpression de ce récepteur reste encore inconnue mais plusieurs mécanismes peuvent être supposés, tels que la sécrétion par le tissu adipeux de cytokines comme le TGF β ⁴⁹³, le TNF α ⁴⁹⁴ ou certaines interleukines (IL-2 ou IL-4)⁴⁹⁵, ou encore une sécrétion accrue du ligand de CCR3 lui-même (CCL7), comme cela a pu être montré dans l'axe CXCR4/CXCL12 où le ligand est capable d'induire la surexpression de son récepteur associé⁴⁹⁶. D'autres facteurs métaboliques peuvent induire la surexpression d'un récepteur. Ainsi, les ROS sont capables d'augmenter l'expression de certains récepteurs aux chimiokines^{497,498}. Ceci est en accord avec des résultats obtenus récemment au sein de notre équipe. En effet, nous avons pu montrer que les cellules tumorales invasives dans le TAPP sont capables de capter des lipides qui vont induire l'activation de la NOX5. Cette dernière va augmenter les taux de ROS intracellulaires, aboutissant à l'augmentation des capacités invasives des cellules tumorales⁴⁹⁹. Cette induction de ROS pourrait ainsi être à l'origine de la surexpression de CCR3 dans les cellules tumorales prostatiques invasives.

II. Dissémination métastatique et rôle des adipocytes médullaires :

Au-delà de la dissémination locale, nous nous sommes aussi intéressés à la place des adipocytes médullaires dans la dissémination métastatique. Pour cela nous avons mis en place une collection originale d'échantillons biologiques de moelle osseuse humaine en collaboration avec le service de chirurgie orthopédique de l'hôpital Toulouse Purpan (CHU-Toulouse). Cette collection unique nous a permis d'observer que les cellules tumorales prostatiques sont attirées par les sécrétions des adipocytes médullaires issus de la moelle jaune (partie riche en lipide) résultant de mécanismes de migration dirigée. Cet effet est spécifique des adipocytes médullaires puisqu'il n'est pas retrouvé avec les tissus adipeux sous-cutanés issus des mêmes patients. Cette observation est en accord avec la clinique puisque les métastases osseuses du cancer de la prostate disséminent majoritairement dans des zones contenant de la moelle osseuse jaune. Cet effet chimioattractant des adipocytes médullaires est par ailleurs amplifié par les deux facteurs d'agressivité que nous avons déjà associés au tissu adipeux : l'obésité et le vieillissement. Nous avons étudié l'implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans la dissémination à distance des cellules tumorales par deux types d'expériences. Tout d'abord en réalisant une étude *in silico*. Pour cela, nous avons extrait des études génomiques et des

études d'expressions en ARN issues de la base de données Oncomine, puis nous avons comparé l'expression de différents récepteurs d'importance majeure dans la dissémination du cancer de la prostate (CCR2, CXCR2, CXCR4 et CCR3) entre les tumeurs primaires et les sites métastatiques osseux. Il en ressort que CCR3 reste le récepteur le plus significativement et le plus fortement amplifié lors de la dissémination métastatique osseuse du cancer de la prostate. On trouve ensuite les récepteurs CCR2 et CXCR2 alors que CXCR4 voit son expression diminuée dans le contexte métastatique osseux. Cette étude est particulièrement innovante car il s'agit, à notre connaissance, de la première méta-étude comparant l'expression des récepteurs aux chimiokines entre site primaire et métastases. Une autre méta-étude avait déjà auparavant souligné l'importance de CXCR4 dans le processus métastatique⁴³⁵. Néanmoins cette étude ne comparait que l'expression du récepteur au sein des tumeurs primaires issues de patients présentant ou non des métastases osseuses. De ce fait, les cellules tumorales étudiées n'avaient pas effectué leur migration métastatique et n'avaient donc pas subi les modifications phénotypiques associées. Il paraît donc probable que l'expression de CXCR4 dans les tumeurs primaires soit un facteur d'agressivité et de dissémination métastatique mais qu'au cours de la dissémination osseuse, ce récepteur soit moins impliqué et que la cellule tumorale perde son expression au profit d'autres récepteurs plus importants comme CCR3. Nous avons ensuite étudié l'activité des différents récepteurs et leur implication dans les mécanismes de migrations dirigées en utilisant soit des inhibiteurs pharmacologiques, soit des anticorps bloquants. Il en ressort que l'axe CCR3/CCL7 est là aussi l'axe majeur impliqué dans ce mécanisme. Par ailleurs, cet effet semble particulièrement important dans l'obésité ou le vieillissement puisque son inhibition invalide totalement l'effet pro-migratoire des sécrétions des adipocytes médullaires de patients obèses ou âgés, ramenant les taux de migration à un état basal. Il apparaît donc que les augmentations de migration induites par ces deux facteurs de risque sont entièrement dépendantes de l'axe CCR3/CCL7. Plus précisément cet effet est lié à une augmentation de la sécrétion de CCL7 dans le contexte de l'obésité ou du vieillissement. Nous avons ensuite confirmé ces résultats *in vivo* où l'injection intracardiaque de cellules invalidées ou non pour CCR3 a permis de montrer que l'absence de CCR3 permet d'empêcher la formation de métastases osseuses mais n'a pas d'influence sur la nidation des autres sites métastatiques viscéraux. Par ailleurs, l'invalidation de CCR3 bloque même l'effet pro-métastatique de l'obésité puisque malgré l'augmentation globale du taux de métastases viscérales chez les souris ayant suivi un régime riche en lipides (HFD), les cellules invalidées pour CCR3 sont incapables de former spécifiquement des métastases osseuses. Notre étude a donc permis pour la première fois de mettre en avant un rôle majeur des adipocytes médullaires dans la dissémination

métastatique osseuse. Cet effet est d'autant plus intéressant qu'il est spécifique des adipocytes médullaires et de la métastase osseuse. Ce mécanisme semble essentiel et modulé chez les patients âgés et obèses ce qui peut ainsi expliquer le plus fort taux métastatique et le mauvais pronostic des cancers de la prostate chez ces patients^{15,160,252}. Cette importance de l'axe CCR3/CCL7 dans la dissémination osseuse du cancer de la prostate a pu être confirmé chez l'homme grâce à nos expériences immunohistochimiques sur les TMA obtenus du Prostate Biorepository Network et du CHU de Tours. Par ces expériences, nous avons pu voir que les métastases osseuses exprimaient plus fortement CCR3 que tous les autres types de métastases viscérales.

Il semblerait intéressant d'élargir cette étude à d'autres cancers métastasant à l'os comme le cancer du sein et du poumon. En effet, lors de la première étude nous avons pu montrer que la migration des cellules tumorales mammaires contre les sécrétions adipocytaires dépendait majoritairement des récepteurs CXCR2 et CXCR4. Cependant l'obésité, tout comme le vieillissement, n'induit pas d'augmentation de la sécrétion des chimiokines associées à ces récepteurs. Il paraît donc nécessaire de réaliser des expériences de migration de ces cellules tumorales contre le milieu conditionné d'adipocytes médullaires issu de patients obèses ou âgés afin de voir si les récepteurs CXCR2 et CXCR4 sont toujours les récepteurs principaux, s'ils sont remplacés par un autre, ou même si la migration métastatique osseuse est dépendante de plusieurs axes dans ces cancers.

Notre étude a pour la première fois montré le rôle majeur des adipocytes médullaires et de leurs sécrétions dans la migration dirigée des cellules tumorales vers leur site métastatique. D'autres études ont montré leur influence sur le développement local de la métastase osseuse^{12,13,64}. Les adipocytes médullaires apparaissent comme des cellules de toute première importance dans de nombreux mécanismes. Néanmoins, ce sous-type d'adipocyte ayant longtemps été négligé, on ne connaît que peu de choses sur l'ensemble de leurs fonctions et sur leur phénotype. Par ailleurs, la plupart des études portent à l'heure actuelle sur des modèles issus de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses médullaires²⁶⁸. Le phénotype de ces cellules semble donc assez différent de celui des adipocytes médullaires matures humains. A l'aide de notre collection d'échantillons humains, il nous paraît donc nécessaire d'effectuer une caractérisation extensive des adipocytes médullaires aussi bien d'un point de vue protéique, que génomique ou lipidique. Une meilleure compréhension de ces cellules ainsi qu'une connaissance précise de leur phénotype nous permettrait probablement d'identifier des fonctions ou des sécrétions pouvant agir sur les cellules tumorales localement ou à distance.

Ceci nous permettrait d'explorer un nouveau champ de connaissance avec de nouveaux mécanismes de dialogues et de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles contre la métastase osseuse.

Après nous être intéressés à la dissémination locale, puis à la dissémination métastatique, il serait particulièrement intéressant d'étudier l'effet des adipocytes médullaires sur la progression locale de la métastase osseuse. Certaines études ont déjà montré que des changements de métabolisme induits dans les cellules tumorales par les adipocytes pouvaient favoriser la croissance de la métastase osseuse^{12,13}. Néanmoins, au-delà de la croissance, d'autres mécanismes sont particulièrement importants dans le développement de la métastase osseuse comme le remaniement osseux. En effet, la métastase osseuse ne peut progresser que si sa croissance est associée à un remaniement de la structure osseuse⁵⁰⁰. Dans le cas du cancer de la prostate, la métastase est dite mixte ou ostéocondensante. Dans ce cas la structure osseuse est remaniée et hyper-dense au niveau du site métastatique⁵⁰⁰. Ce mécanisme s'accompagne à la fois d'une activité ostéoclastique de destruction⁵⁰¹ mais aussi et surtout une action ostéoblastique de production d'os⁵⁰². Des études ont déjà montré que les cellules tumorales peuvent interagir avec les ostéoclastes afin de favoriser la dégradation osseuse⁶⁴ et que les cellules tumorales prostatiques humaines sont elles-mêmes capables d'avoir une activité ostéoblastique à travers un phénomène dit d'« osteomimicry »⁶⁶. Néanmoins des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe (résultats non montrés) nous ont permis d'observer grâce à un marquage à l'alizarine une production de matrice osseuse calcique par les adipocytes suite à la co-culture avec des cellules tumorales prostatiques humaines. Les adipocytes partageant leur lignée d'origine avec celle des ostéoblastes, il serait donc possible d'observer une transdifférentiation des adipocytes en ostéoblastes qui pourrait participer au remaniement osseux lors du développement de la métastase osseuse. Cet effet, semble d'autant plus probable que nos études de spectrométrie de masse sur les adipocytes co-cultivés avec des cellules tumorales (résultats non-montrés) ont montré la perte de certains marqueurs nécessaires à la différenciation adipocytaire. Par exemple, on observe ainsi dans ces cellules une diminution de la chémérine, une protéine dont la perte est associée à une transdifférenciation des adipocytes vers les ostéoblastes⁵⁰³.

Enfin, des études récentes se sont intéressées au développement séquentiel des métastases du cancer de la prostate et ont pu montrer que la métastase osseuse est non seulement une métastase fréquemment retrouvée comme métastase initiale, mais aussi que les autres métastases peuvent dériver non pas de cellules de la tumeur primaire mais de cellules ayant déjà métastasé à

l'os^{69,504}. Il serait donc intéressant d'étudier si par co-culture et dialogue avec les adipocytes médullaires, les cellules tumorales se retrouvent influencées et si ces modifications favorisent aussi leur dissémination vers les sites métastatiques suivants.

III. L'axe CCR3/CCL7 : un nouvel axe thérapeutique dans le cancer de la prostate ?

A travers ces deux études portant sur la place du tissu adipeux dans la dissémination locale et la dissémination métastatique osseuse du cancer de la prostate, nous avons pu mettre en évidence un axe majeur : l'axe CCR3/CCL7. Le récepteur CCR3 est ainsi particulièrement important dans la dissémination du cancer de la prostate au niveau local mais aussi à distance avec la métastase osseuse. Il s'agit donc d'une cible thérapeutique particulièrement intéressante pouvant agir sur différentes étapes de la progression tumorale. Pour cela, nous pourrions tester *in vitro* et *in vivo* des inhibiteurs pharmacologiques de CCR3 créés pour une utilisation chez l'homme. Des inhibiteurs de ce types sont déjà testés en clinique et utilisés dans le traitement de l'asthme grave^{505,506}. Si ces inhibiteurs s'avèrent efficaces pour traiter le cancer de la prostate, il pourrait être intéressant d'envisager un repositionnement de ce médicament pour un usage dans le traitement du cancer de la prostate. Ce traitement pourrait agir sur les tumeurs locales et prévenir la transition vers un stade localement avancé, mais il pourrait aussi agir sur la dissémination vers le site osseux et sur le développement de la métastase osseuse qui reste encore la complication la plus grave et la plus mortelle de ce cancer.

Concernant la chimiokine CCL7, le ligand de CCR3 identifié dans l'axe étudié, il nous paraît nécessaire d'approfondir nos travaux sur son implication dans les effets de cet axe sur la migration dirigée. En effet, seules nos études *in vitro* ont pu montrer l'importance de CCL7 dans ce mécanisme. Il serait donc intéressant de confirmer son implication *in vivo* grâce à un modèle KO pour CCL7 spécifique du tissu adipeux. Pour cela, il nous faudrait créer un modèle de KO transitoire de CCL7 à l'aide d'un système cre/loxP⁴⁴⁴. Dans ce modèle des souris homozygotes CCL7 loxP pourraient être croisées avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du gène promoteur Ap2/FABP4 spécifiques des adipocytes. Ce système nous permettrait d'obtenir un KO spécifique du tissu adipeux et donc du tissu adipeux périprostatique. Nous pourrions alors réaliser une injection intraprostatique de cellules TRAMP-C1P3 et voir si l'inactivation de CCL7 diminue l'invasion locale et le franchissement de la barrière prostatique. Il pourrait aussi être intéressant d'y étudier l'effet de l'obésité, à la condition que ces souris soient sensibles au régime HFD. Concernant les adipocytes

médullaires, l'expression de FABP4 restant discutée et nécessitant d'être confirmée, on ne peut pas être certain que le modèle créé précédemment invaliderait la sécrétion de CCL7 par ces adipocytes. Il serait donc nécessaire de caractériser les adipocytes médullaires de façon plus extensive afin de trouver un gène assez spécifiquement exprimé dans le tissu adipeux médullaire pour servir de promoteur à la recombinaison et bloquer la sécrétion de CCL7. Il serait ensuite intéressant d'observer la formation ou non de métastases osseuses suite à l'injection intracardiaque de cellules tumorales RM1-BM, ainsi que la formation des autres métastases. Ces résultats nous permettraient de confirmer l'importance de CCL7 dans ce mécanisme.

L'étude de la réelle implication de CCL7 *in vivo* est importante dans la compréhension du mécanisme de dissémination mais aussi pour une utilisation thérapeutique. En effet, CCR3 est un RCPG⁴⁰⁶ et bien que les inhibiteurs d'un RCPG soient faciles à créer et relativement efficaces, ils n'en restent pas moins sensibles à la chimiorésistance. En effet, ces récepteurs sont particulièrement sensibles aux mécanismes de désensibilisation et de recyclage du récepteur inactivant ainsi l'effet du traitement inhibiteur⁵⁰⁷. Par ailleurs, s'agissant d'une cellule tumorale, d'autres mécanismes d'adaptation et de résistance peuvent rentrer en ligne de compte, tels que l'activation constitutionnelle du récepteur qui est très fréquente dans ce type de cellules⁵⁰⁸. Si les traitements anti-CCR3 se révèlent efficaces dans le traitement des cancers de la prostate chez l'homme, il sera alors particulièrement important de comprendre l'implication des différents acteurs dans cet axe chimiorécepteur/chimiokine afin de trouver des traitements synergiques ou pouvant agir au-delà des résistances. On pourrait par exemple imaginer un traitement anti-CCL7 avec le même mécanisme d'action que celui de l'éta nercept⁵⁰⁹ contre le TNF- α . Il s'agirait alors d'un récepteur leurre couplé à un fragment Fc d'anticorps qui capturerait la chimiokine, la rendant indisponible pour les cellules tumorales. Ce type de molécule thérapeutique, bien que beaucoup plus difficile à mettre en place et créer qu'un inhibiteur pharmacologique classique, présente l'avantage d'être beaucoup moins sensible aux mécanismes de résistances classiques.

Enfin, comme expliqué précédemment, des études récentes nous indiquent que la métastase osseuse est bien souvent la première métastase développée et que ces cellules métastatiques osseuses peuvent être à l'origine des autres métastases et disséminer vers les autres sites^{69,504}. De ce fait, il apparaît intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition pharmacologique de CCR3 sur le développement des autres métastases au-delà de l'implantation de la métastase osseuse. Pour cela nous pourrions injecter des cellules RM1-BM invalidées ou non pour CCR3 en intratibiale chez des souris C57/BL6 et suivre le développement de métastases extra-osseuses. S'il s'avérait

que l'invalidation de CCR3 empêche le développement extra-osseux, cela signifierait que ce récepteur joue aussi un rôle dans la redissémination des cellules métastatiques osseuses et pourrait donc servir à traiter les tumeurs prostatiques agressives afin de limiter l'extension à d'autres organes. Par ailleurs, il pourrait être aussi intéressant de suivre le développement de tumeurs prostatiques *in vivo* depuis le stade local jusqu'au stade métastatique en invalidant CCR3 dans les cellules tumorales ou en utilisant un inhibiteur pharmacologique de CCR3 à différents moments-clés. Nous pourrions ainsi évaluer l'impact global d'un tel traitement sur le développement du cancer de la prostate et de ses métastases.

Conclusion générale :

Nos travaux ont permis d'identifier un mécanisme essentiel impliquant le tissu adipeux dans la dissémination à distance du cancer de la prostate. Nous avons ainsi pu montrer que dans un premier temps la chimiokine CCL7 pouvait être sécrétée par le TAPP et interagir avec le récepteur CCR3 présent à la surface des cellules tumorales prostatiques. Cette interaction va ainsi permettre aux cellules tumorales de migrer suivant le gradient de CCL7 depuis la tumeur prostatique vers le TAPP en franchissant la barrière prostatique. Ce mécanisme favorise ainsi de favoriser le passage du stade local au stade localement invasif du cancer de la prostate. Au-delà de la dissémination locale, nous avons aussi pu mettre en avant l'implication d'un autre tissu adipeux, le tissu adipeux médullaire dans la dissémination métastatique osseuse du cancer de la prostate. Les adipocytes médullaires sont eux aussi capables de sécréter la chimiokine CCL7 et d'induire la migration dirigée des cellules tumorales vers l'os, par l'intermédiaire de leur récepteur CCR3. Ce phénomène est spécifique du tissu adipeux médullaire et de la métastase osseuse puisque nous avons pu montrer *in vivo* qu'il n'influence pas le développement des autres sites métastatiques. Nous avons par ailleurs pu montrer que cet axe aussi bien au niveau local que métastatique, pouvait être amplifié par l'obésité avec une augmentation de la sécrétion de CCL7 par le TAPP ou par les adipocytes médullaires. Dans le cas de la dissémination à distance, nous avons aussi pu mettre en avant un rôle du vieillissement sur la sécrétion de CCL7 qui se retrouve aussi augmentée dans ces conditions. Nous avons ainsi pu confirmer ces résultats aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ou sur des tumeurs de patients. L'invalidation de CCR3 peut ainsi empêcher *in vivo* le développement local de tumeurs prostatiques mais aussi la nidation osseuse des cellules tumorales et le développement de métastases. Notre étude est la première à mettre en avant le rôle des chimiokines du tissu adipeux dans la dissémination locale et à distance. Mais il s'agit aussi de la première étude montrant la place du TAPP dans l'invasion locale et le rôle des adipocytes médullaires dans la

dissémination métastatique. Cet axe CCR3/CCL7 apparaît comme un axe thérapeutique potentiel particulièrement intéressant puisqu'il pourrait permettre d'agir sur les différentes étapes de la progression tumorale aussi bien dans les stades locaux que dans le développement de métastases. Notre équipe a ainsi breveté l'utilisation d'inhibiteur de l'axe CCR3/CCL7 dans le traitement du cancer de la prostate afin de pouvoir en développer une utilisation thérapeutique. Ce travail souligne ainsi plusieurs axes innovants, confirmant la place du tissu adipeux dans le microenvironnement tumoral du cancer de la prostate et apportant une explication mécanistique aux implications pathologiques de l'obésité et du vieillissement (Figure 26).

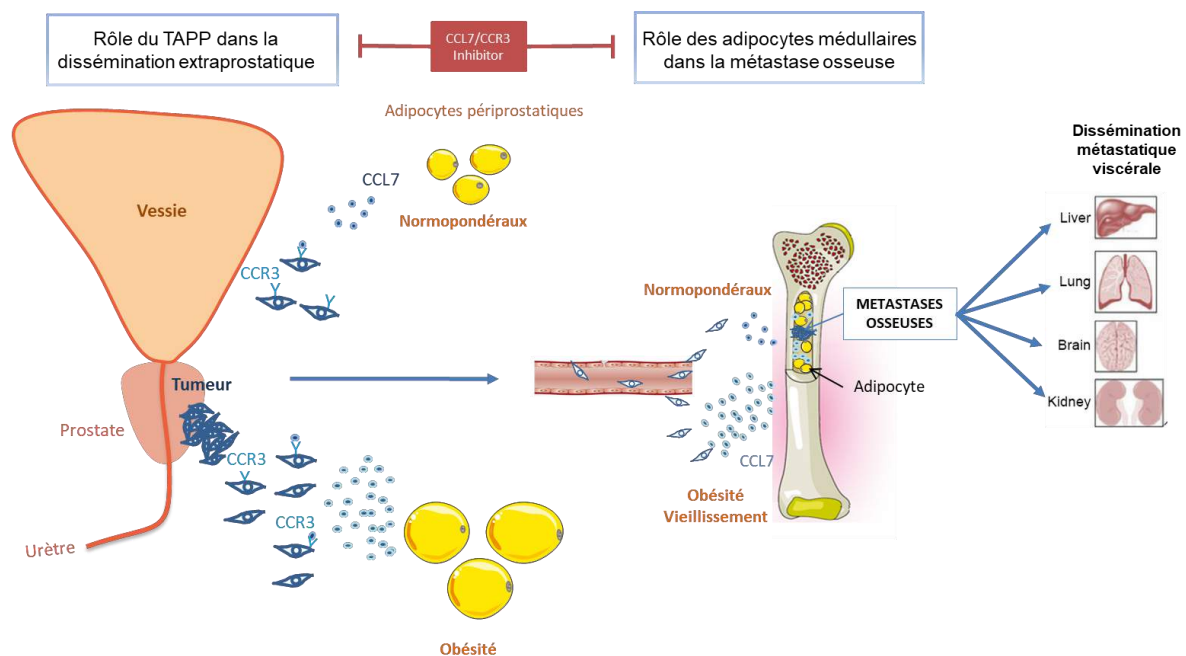


Figure 26 : Dissémination locale et métastatique du cancer de la prostate et rôles du tissu adipeux périprostatique et des adipocytes médullaires.

REFERENCES

1. Balkwill, F. R., Capasso, M. & Hagemann, T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* **125**, 5591–5596 (2012).
2. Kushihiro, K., Chu, R. A., Verma, A. & Núñez, N. P. Adipocytes Promote B16BL6 Melanoma Cell Invasion and the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* **5**, 73–82 (2012).
3. Dirat, B. *et al.* Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* **71**, 2455–2465 (2011).
4. Bochet, L. *et al.* Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* **73**, 5657–5668 (2013).
5. Wang, Y.-Y. *et al.* Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett.* **324**, 142–151 (2012).
6. Nieman, K. M. *et al.* Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* **17**, 1498–1503 (2011).
7. Zhang, Q., Sun, L.-J., Yang, Z.-G., Zhang, G.-M. & Huo, R.-C. Influence of adipocytokines in periprostatic adipose tissue on prostate cancer aggressiveness. *Cytokine* **85**, 148–156 (2016).
8. Ribeiro, R. *et al.* Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **31**, 32 (2012).
9. Kapoor, J. *et al.* Extraprostatic extension into periprostatic fat is a more important determinant of prostate cancer recurrence than an invasive phenotype. *J. Urol.* **190**, 2061–2066 (2013).
10. Morris, E. V. & Edwards, C. M. The role of bone marrow adipocytes in bone metastasis. *J. Bone Oncol.* **5**, 121–123 (2016).
11. Rosen, C. J., Ackert-Bicknell, C., Rodriguez, J. P. & Pino, A. M. Marrow Fat and the Bone Microenvironment: Developmental, Functional, and Pathological Implications. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **19**, 109–124 (2009).
12. Diedrich, J. D. *et al.* Bone marrow adipocytes promote the Warburg phenotype in metastatic prostate tumors via HIF-1 α activation. *Oncotarget* **7**, 64854–64877 (2016).
13. Herroon, M. K. *et al.* Bone marrow adipocytes promote tumor growth in bone via FABP4-dependent mechanisms. *Oncotarget* **4**, 2108–2123 (2013).
14. Bandini, M., Gandaglia, G. & Briganti, A. Obesity and prostate cancer. *Curr. Opin. Urol.* (2017). doi:10.1097/MOU.0000000000000424
15. Bechis, S. K., Carroll, P. R. & Cooperberg, M. R. Impact of Age at Diagnosis on Prostate Cancer Treatment and Survival. *J. Clin. Oncol.* **29**, 235–241 (2011).
16. Hayward, S. W. & Cunha, G. R. THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. *Radiol. Clin. North Am.* **38**, 1–14 (2000).
17. Coakley, F. V. & Hricak, H. RADIOLOGIC ANATOMY OF THE PROSTATE GLAND: A CLINICAL APPROACH. *Radiol. Clin. North Am.* **38**, 15–30 (2000).
18. Lepor, H. Pathophysiology of Benign Prostatic Hyperplasia in the Aging Male Population. *Rev Urol.* 2005; 7(Suppl 4): S3–S12.
19. Wu, F. C. W. *et al.* Identification of Late-Onset Hypogonadism in Middle-Aged and Elderly Men. *N. Engl. J. Med.* **363**, 123–135 (2010).
20. Cunha, G. R. & Ricke, W. A. A historical perspective on the role of stroma in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Differ. Res. Biol. Divers.* **82**, 168–172 (2011).
21. Selman, S. H. The McNeal Prostate: A Review. *Urology* **78**, 1224–1228 (2011).
22. McNeal, J. E. The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate* **2**, 35–49 (1981).
23. McNeal, J. E. Anatomy of the prostate: An historical survey of divergent views. *The Prostate* **1**, 3–13 (1980).
24. Wendell-Smith, C. Terminology of the prostate and related structures. *Clin. Anat.* **13**, 207–213 (2000).
25. Myers, R. P. Structure of the adult prostate from a clinician's standpoint. *Clin. Anat.* **13**, 214–215 (2000).

26. Krušlin, B., Ulamec, M. & Tomas, D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **15**, 1–8 (2015).
27. Grossfeld, G.D. et al. The role of stroma in prostatic carcinogenesis. *Differentiation*. 2002 Dec;70(9-10):473-85.
28. Vander Griend, D. J. et al. The Role of CD133 in Normal Human Prostate Stem Cells and Malignant Cancer-Initiating Cells. *Cancer Res.* **68**, 9703–9711 (2008).
29. Wong, Y. C. & Wang, Y. Z. Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development. *Int. Rev. Cytol.* **199**, 65–116 (2000).
30. Aumüller, G. Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. *The Prostate* **4**, 195–214 (1983).
31. Aumüller, G., Seitz, J. & Bischof, W. Immunohistochemical study on the initiation of acid phosphatase secretion in the human prostate. Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases IV. *J. Androl.* **4**, 183–191 (1983).
32. pmhdev. How does the prostate work? *PubMed Health* (2016).
33. Bianco, F.J. Jr. et al. Radical prostatectomy: Long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function ('trifecta') *Urology*. Nov;66(5 Suppl):83-94.
34. Brawer, M. K. Prostatic intraepithelial neoplasia: an overview. *Rev. Urol.* **7 Suppl 3**, S11-18 (2005).
35. Bostwick, DG. et al. Prostatic Intra-Epithelial Neoplasia and Early Invasion in Prostate Cancer. 1987 Feb 15;59(4):788-94. - Wiley Online Library.
Available at: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19870215\)59:4%3C788::AID-CNCR2820590421%3E3.0.CO;2-I/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19870215)59:4%3C788::AID-CNCR2820590421%3E3.0.CO;2-I/full).
36. Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
37. Bouchardy, C. et al. Recent trends in prostate cancer mortality show a continuous decrease in several countries. *Int. J. Cancer* **123**, 421–429 (2008).
38. Rébillard, X. et al. [Projected incidence and mortality from urologic cancer in France in 2010.]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* **20 Suppl 4**, S211-214 (2010).
39. Ferlay, J., Parkin, D. M. & Steliarova-Foucher, E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990 46**, 765–781 (2010).
40. McNeal, J. E., Villers, A. A., Redwine, E. A., Freiha, F. S. & Stamey, T. A. Histologic differentiation, cancer volume, and pelvic lymph node metastasis in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* **66**, 1225–1233 (1990).
41. Bouchardy, C. et al. Recent trends in prostate cancer mortality show a continuous decrease in several countries. *Int. J. Cancer* **123**, 421–429 (2008).
42. Abbas, F., Civantos, F., Benedetto, P. & Soloway, M. S. Small cell carcinoma of the bladder and prostate. *Urology* **46**, 617–630 (1995).
43. Wang, W. et al. Small cell carcinoma of the prostate. A morphologic and immunohistochemical study of 95 cases. *Am J Surg Pathol*. 2008 Jan;32(1):65-71.
44. Munoz, F. et al. Squamous cell carcinoma of the prostate: long-term survival after combined chemo-radiation. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* **2**, 15 (2007).
45. Malik, R. D. et al. Squamous Cell Carcinoma of the Prostate. *Rev. Urol.* **13**, 56–60 (2011).
46. Gaudin, P. B., Rosai, J. & Epstein, J. I. Sarcomas and related proliferative lesions of specialized prostatic stroma: a clinicopathologic study of 22 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **22**, 148–162 (1998).
47. Rojas-Jiménez, A., Otero-Garcia, M. & Mateos-Martin, A. Stromal prostatic sarcoma: a rare tumor with rare clinical and imaging presentation. *J. Radiol. Case Rep.* **7**, 24–31 (2013).
48. Esrig, D. et al. Transitional cell carcinoma involving the prostate with a proposed staging classification for stromal invasion. *J. Urol.* **156**, 1071–1076 (1996).
49. Moul, J. W. The Evolving Definition of Advanced Prostate Cancer. *Rev. Urol.* **6**, S10–S17 (2004).
50. Kiyoshima, K. et al. Anatomical features of periprostatic tissue and its surroundings: a histological analysis of 79 radical retropubic prostatectomy specimens. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **34**, 463–468 (2004).

51. Potter, S. R., Epstein, J. I. & Partin, A. W. Seminal Vesicle Invasion by Prostate Cancer: Prognostic Significance and Therapeutic Implications. *Rev. Urol.* **2**, 190–195 (2000).
52. Hunter, K. W., Crawford, N. P. & Alsarraj, J. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res. BCR* **10**, S2 (2008).
53. Steeg, P. S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 55–63 (2003).
54. Datta, K., Muders, M., Zhang, H. & Tindall, D. J. Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. *Future Oncol. Lond. Engl.* **6**, 823–836 (2010).
55. Wong, S. Y. & Hynes, R. O. Lymphatic or Hematogenous Dissemination: How Does a Metastatic Tumor Cell Decide? *Cell Cycle Georget. Tex* **5**, 812–817 (2006).
56. Karaman, S. & Detmar, M. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J. Clin. Invest.* **124**, 922–928 (2014).
57. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
58. Hart, I. R. ‘Seed and soil’ revisited: mechanisms of site-specific metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **1**, 5–16 (1982).
59. Bubendorf, L. *et al.* Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1,589 patients. *Hum. Pathol.* **31**, 578–583 (2000).
60. Conti, G. *et al.* Prostate cancer metastases to bone: observational study for the evaluation of clinical presentation, course and treatment patterns. Presentation of the METAURO protocol and of patient baseline features. *Arch. Ital. Urol. Androl. Organo Uff. Soc. Ital. Ecogr. Urol. E Nefrol.* **80**, 59–64 (2008).
61. Gandaglia, G. *et al.* Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis. *The Prostate* **74**, 210–216 (2014).
62. Forest, A. E., Shiozawa, Y., Pienta, K. J. & Taichman, R. S. *The Hematopoietic Stem Cell Niche and Bone Metastasis*. (Landes Bioscience, 2013).
63. Ortiz, A. & Lin, S.-H. Osteolytic and osteoblastic bone metastases: two extremes of the same spectrum? *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* **192**, 225–233 (2012).
64. Mizutani, K. *et al.* The Chemokine CCL2 Increases Prostate Tumor Growth and Bone Metastasis through Macrophage and Osteoclast Recruitment. *Neoplasia N. Y. N* **11**, 1235–1242 (2009).
65. Patel, L. R., Camacho, D. F., Shiozawa, Y., Pienta, K. J. & Taichman, R. S. Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future Oncol. Lond. Engl.* **7**, 1285–1297 (2011).
66. Jadaan, D. Y., Jadaan, M. M. & McCabe, J. P. Cellular Plasticity in Prostate Cancer Bone Metastasis. *Prostate Cancer* **2015**, (2015).
67. Gundem, G. *et al.* The Evolutionary History of Lethal Metastatic Prostate Cancer. *Nature* **520**, 353–357 (2015).
68. Shen, M. M. Cancer: The complex seeds of metastasis. *Nature* **520**, 298–299 (2015).
69. Hong, M. K. H. *et al.* Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nat. Commun.* **6**, ncomms7605 (2015).
70. Gundem, G. *et al.* The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* **520**, 353–357 (2015).
71. WANG, C.-Y., WU, G.-Y., SHEN, M.-J., CUI, K.-W. & SHEN, Y. Comparison of distribution characteristics of metastatic bone lesions between breast and prostate carcinomas. *Oncol. Lett.* **5**, 391–397 (2013).
72. Kakhki, V. R. D., Anvari, K., Sadeghi, R., Mahmoudian, A.-S. & Torabian-Kakhki, M. Pattern and distribution of bone metastases in common malignant tumors. *Nucl. Med. Rev.* **16**, 66–69 (2013).
73. Małkiewicz, A. & Dziedzic, M. Bone marrow reconversion – imaging of physiological changes in bone marrow. *Pol. J. Radiol.* **77**, 45–50 (2012).
74. Wedin, R. & Bauer, H. C. F. Surgical treatment of skeletal metastatic lesions of the proximal femur. *Bone Jt. J.* **87-B**, 1653–1657 (2005).

422. Kim, J. & Bae, J.-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm.* **2016**, (2016).
423. Tazzyman, S., Lewis, C. E. & Murdoch, C. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**, 222–231 (2009).
424. Guo, F. *et al.* CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene* **35**, 816–826 (2016).
425. Chow, M. T. & Luster, A. D. Chemokines in Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 1125–1131 (2014).
426. Sarvaiya, P. J., Guo, D., Ulasov, I., Gabikian, P. & Lesniak, M. S. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* **4**, 2171–2185 (2013).
427. Zhang, S. *et al.* Chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 expression are associated with perineural invasion of prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **27**, 62 (2008).
428. Wang, J. *et al.* The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* **283**, 4283–4294 (2008).
429. Uehara, H. *et al.* Expression of interleukin-8 gene in radical prostatectomy specimens is associated with advanced pathologic stage. *The Prostate* **64**, 40–49 (2005).
430. Murphy, C. *et al.* Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 4117–4127 (2005).
431. Lu, Y. *et al.* CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J. Cell. Biochem.* **101**, 676–685 (2007).
432. Lim, S. Y., Yuzhalin, A. E., Gordon-Weeks, A. N. & Muschel, R. J. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget* **7**, 28697–28710 (2016).
433. Mazzucchelli, L. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in prostatic hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **149**, 501–509 (1996).
434. Lu, Y. *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 mediates prostate cancer-induced bone resorption. *Cancer Res.* **67**, 3646–3653 (2007).
435. Chen, Q. & Zhong, T. The association of CXCR4 expression with clinicopathological significance and potential drug target in prostate cancer: a meta-analysis and literature review. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 5115–5122 (2015).
436. Weilbaecher, K. N., Guise, T. A. & McCauley, L. K. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 411–425 (2011).
437. Liu, Q. *et al.* The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **31**, 61–71 (2016).
438. Wilson, C. *et al.* Constitutive and Treatment-Induced CXCL8-Signalling Selectively Modulates the Efficacy of Anti-Metabolite Therapeutics in Metastatic Prostate Cancer. *PLoS ONE* **7**, (2012).
439. Huang, J. *et al.* Differential expression of interleukin-8 and its receptors in the neuroendocrine and non-neuroendocrine compartments of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* **166**, 1807–1815 (2005).
440. Lehrer, S., Diamond, E. J., Mamkin, B., Stone, N. N. & Stock, R. G. Serum interleukin-8 is elevated in men with prostate cancer and bone metastases. *Technol. Cancer Res. Treat.* **3**, 411 (2004).
441. Veltri RW. *et al.* Interleukin-8 serum levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology.* 1999 Jan;53(1):139-47.
442. Salazar, N., Castellan, M., Shirodkar, S. S. & Lokeshwar, B. L. Chemokines and Chemokine Receptors as Promoters of Prostate Cancer Growth and Progression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **23**, 77–91 (2013).
443. Lu, Y. *et al.* Activation of MCP-1/CCR2 axis promotes prostate cancer growth in bone. *Clin. Exp. Metastasis* **26**, 161–169 (2009).
444. Huang, D. R., Wang, J., Kivisakk, P., Rollins, B. J. & Ransohoff, R. M. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **193**, 713–726 (2001).

96. Hövels, A. M. *et al.* The diagnostic accuracy of CT and MRI in the staging of pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Clin. Radiol.* **63**, 387–395 (2008).
97. Shen, G., Deng, H., Hu, S. & Jia, Z. Comparison of choline-PET/CT, MRI, SPECT, and bone scintigraphy in the diagnosis of bone metastases in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Skeletal Radiol.* **43**, 1503–1513 (2014).
98. Kurhanewicz, J. & Vigneron, D. B. ADVANCES IN MR SPECTROSCOPY OF THE PROSTATE. *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.* **16**, 697–x (2008).
99. Sankineni, S., Osman, M. & Choyke, P. L. Functional MRI in Prostate Cancer Detection. *BioMed Res. Int.* **2014**, (2014).
100. Nanni, C. *et al.* 18F-Fluciclovine PET/CT for the Detection of Prostate Cancer Relapse: A Comparison to 11C-Choline PET/CT. *Clin. Nucl. Med.* **40**, e386-391 (2015).
101. Rauscher, I. *et al.* 68Ga-PSMA ligand PET/CT in patients with prostate cancer: How we review and report. *Cancer Imaging* **16**, (2016).
102. Cook, G. J. R., Azad, G. & Padhani, A. R. Bone imaging in prostate cancer: the evolving roles of nuclear medicine and radiology. *Clin. Transl. Imaging* **4**, 439–447 (2016).
103. Schröder, F. H. *et al.* The TNM classification of prostate cancer. *The Prostate* **21**, 129–138 (1992).
104. Sobin, L. H. & Fleming, I. D. TNM classification of malignant tumors, fifth edition (1997). *Cancer* **80**, 1803–1804 (1997).
105. Gleason, D. F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* **50**, 125–128 (1966).
106. Phillips, J. L. *et al.* Patterns, art, and context: Donald Floyd Gleason and the development of the Gleason grading system. *Urology*. 2009 Sep;74(3):497-503. doi: 10.1016/j.urology.2009.01.012. Epub 2009 Apr 18.
107. Lepor, H. & Donin, N. M. Gleason 6 prostate cancer: serious malignancy or toothless lion? *Oncol. Williston Park N* **28**, 16–22 (2014).
108. Chan, T. Y., Partin, A. W., Walsh, P. C. & Epstein, J. I. Prognostic significance of Gleason score 3+4 versus Gleason score 4+3 tumor at radical prostatectomy. *Urology* **56**, 823–827 (2000).
109. D’Amico, A. V. *et al.* Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* **280**, 969–974 (1998).
110. D’Amico, A. V. *et al.* Biochemical outcome after radical prostatectomy or external beam radiation therapy for patients with clinically localized prostate carcinoma in the prostate specific antigen era. *Cancer* **95**, 281–286 (2002).
111. Dall’Era, M. A. *et al.* Active Surveillance for Prostate Cancer: A Systematic Review of the Literature. *Eur. Urol.* **62**, 976–983 (2012).
112. Klotz, L. Active Surveillance for Prostate Cancer: For Whom? *J. Clin. Oncol.* **23**, 8165–8169 (2005).
113. Tosoian, J. J. *et al.* Active Surveillance Program for Prostate Cancer: An Update of the Johns Hopkins Experience. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2185–2190 (2011).
114. Bill-Axelson, A. *et al.* Radical Prostatectomy or Watchful Waiting in Early Prostate Cancer *N Engl J Med.* 2014 Mar 6;370(10):932-42. doi: 10.1056/NEJMoa1311593.
115. Heidenreich, A., Ohlmann, C. H. & Polyakov, S. Anatomical extent of pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy. *Eur. Urol.* **52**, 29–37 (2007).
116. Touijer, K. *et al.* Standard versus limited pelvic lymph node dissection for prostate cancer in patients with a predicted probability of nodal metastasis greater than 1%. *J. Urol.* **178**, 120–124 (2007).
117. Cellini, N. *et al.* Lymphatic drainage and CTV in carcinoma of the prostate. *Rays* **28**, 337–341 (2003).
118. Fowler, F. J. *et al.* Effect of radical prostatectomy for prostate cancer on patient quality of life: results from a medicare survey. *Urology* **45**, 1007–1015 (1995).
119. Abdollah, F. *et al.* Impact of Adjuvant Radiotherapy on Survival of Patients With Node-Positive Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **32**, 3939–3947 (2014).
120. Sountoulides, P., Koletsas, N., Kikidakis, D., Paschalidis, K. & Sofikitis, N. Secondary malignancies following radiotherapy for prostate cancer. *Ther. Adv. Urol.* **2**, 119–125 (2010).

121. Davis, E. J., Beebe-Dimmer, J. L., Yee, C. L. & Cooney, K. A. Risk of second primary tumors in men diagnosed with prostate cancer: A population-based cohort study. *Cancer* **120**, 2735–2741 (2014).
122. POLLACK, A. *et al.* Prostate Cancer Radiotherapy Dose Response: An Update of the Fox Chase Experience. *J. Urol.* **171**, 1132–1136 (2004).
123. Izawa, J. I. Salvage radiotherapy after radical prostatectomy. *Can. Urol. Assoc. J.* **3**, 245–250 (2009).
124. Stephenson, A. J. & Eastham, J. A. Role of salvage radical prostatectomy for recurrent prostate cancer after radiation therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 8198–8203 (2005).
125. Lee, A. K. Radiation therapy combined with hormone therapy for prostate cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* **16**, 20–28 (2006).
126. Lee, I. & Sandler, H. Hormone therapy and radiotherapy for intermediate risk prostate cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* **18**, 7–14 (2008).
127. Hennequin, C. *et al.* [Prostate brachytherapy: indications and outcomes]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* **23**, 378–385 (2013).
128. Mohammed, A. *et al.* Cryotherapy and its applications in the management of urologic malignancies: A review of its use in prostate and renal cancers - Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. *JUrol Oncol.* 2014 Jan;32(1):39.e19-27. doi: 10.1016/j.urolonc.2013.04.004. Epub 2013 Jun 18.
129. Crouzet, S. *et al.* Whole-gland ablation of localized prostate cancer with high-intensity focused ultrasound: oncologic outcomes and morbidity in 1002 patients. *Eur. Urol.* **65**, 907–914 (2014).
130. Ganzer, R. *et al.* Fourteen-year oncological and functional outcomes of high-intensity focused ultrasound in localized prostate cancer. *BJU Int.* 2013 Aug;112(3):322-9. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11715.x. Epub 2013 Jan 28
131. Recine, F. & Sternberg, C. N. Hormonal therapy and chemotherapy in hormone-naïve and castration resistant prostate cancer. *Transl. Androl. Urol.* **4**, 355–364 (2015).
132. Fizazi, K. *et al.* Androgen deprivation therapy plus docetaxel and estramustine versus androgen deprivation therapy alone for high-risk localised prostate cancer (GETUG 12): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **16**, 787–794 (2015).
133. Tannock, I. F. *et al.* Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1502–1512 (2004).
134. de Bono, J. S. *et al.* Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet Lond. Engl.* **376**, 1147–1154 (2010).
135. Oefelein, M. G., Feng, A., Scolieri, M. J., Ricchiutti, D. & Resnick, M. I. Reassessment of the definition of castrate levels of testosterone: implications for clinical decision making. *Urology* **56**, 1021–1024 (2000).
136. Kunath, F. *et al.* Non-steroidal antiandrogen monotherapy compared with luteinising hormone-releasing hormone agonists or surgical castration monotherapy for advanced prostate cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD009266 (2014). doi:10.1002/14651858.CD009266.pub2
137. Karim, F. *et al.* LATITUDE: A phase III, double-blind, randomized trial of androgen deprivation therapy with abiraterone acetate plus prednisone or placebos in newly diagnosed high-risk metastatic hormone-naïve prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*: Vol 35, No 15
138. James, N. D. *et al.* Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *N. Engl. J. Med.* (2017). doi:10.1056/NEJMoa1702900
139. Hellerstedt, B. A. & Pienta, K. J. The Current State of Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *CA. Cancer J. Clin.* **52**, 154–179 (2002).
140. Fizazi, K. *et al.* Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet Lond. Engl.* **377**, 813–822 (2011).

141. Parker, C. *et al.* Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 213–223 (2013).
142. Sartor, O. *et al.* Effect of radium-223 dichloride on symptomatic skeletal events in patients with castration-resistant prostate cancer and bone metastases: results from a phase 3, double-blind, randomised trial. *Lancet Oncol.* **15**, 738–746 (2014).
143. Olive, D., Thi, S. le, Xerri, L., Hirsch, I. & Nunès, J. A. Rôle de CTLA-4 dans la cosignalisation négative du système immunitaire. *médecine/sciences* **27**, 842–849 (2011).
144. Wolchok, J. D. & Saenger, Y. The Mechanism of Anti-CTLA-4 Activity and the Negative Regulation of T-Cell Activation. *The Oncologist* **13**, 2–9 (2008).
145. Kwon, ED. *et al.* Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after osetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Jun;15(7):700-12
146. Boussiotis, V. A. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1767–1778 (2016).
147. Graff, J. N. *et al.* Early evidence of anti-PD-1 activity in enzalutamide-resistant prostate cancer. *Oncotarget* **7**, 52810–52817 (2016).
148. Ouzaid. I. *et al.* Sipuleucel-T : un vaccin contre le cancer de la prostate : « mode d'emploi » pour les urologues
Progrès en Urologie Volume 21, Issue 9, October 2011, Pages 595-598
149. Kolonel, L. N., Nomura, A. M. & Cooney, R. V. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 414–428 (1999).
150. Gao, X., LaValley, M. P. & Tucker, K. L. Prospective studies of dairy product and calcium intakes and prostate cancer risk: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1768–1777 (2005).
151. Rodriguez, C. *et al.* Calcium, dairy products, and risk of prostate cancer in a prospective cohort of United States men. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **12**, 597–603 (2003).
152. Ragin, C. *et al.* Farming, reported pesticide use, and prostate cancer. *Am. J. Mens Health* **7**, 102–109 (2013).
153. Mink, P. J., Adami, H.-O., Trichopoulos, D., Britton, N. L. & Mandel, J. S. Pesticides and prostate cancer: a review of epidemiologic studies with specific agricultural exposure information. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* **17**, 97–110 (2008).
154. Blanchet, P. *et al.* Pesticides et cancer de la prostate : Pesticides and prostate cancer.
Progrès en Urologie - FMC
Volume 18, Issue 3, September 2008, Pages F19-F21
155. Doolan, G., Benke, G. & Giles, G. An update on occupation and prostate cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **15**, 501–516 (2014).
156. Mullins, J. K. & Loeb, S. Environmental exposures and prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **30**, 216–219 (2012).
157. The Cancer Connection to Mercury, Toxic Metals, and Dental Cavitations, with Information on Cancer Treatment. *DAMS - Dental Amalgam Mercury Solutions*
158. Tarapore, P. *et al.* Exposure to bisphenol A correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro. *PLoS One* **9**, e90332 (2014).
159. Leitzmann, M. F. & Rohrmann, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin. Epidemiol.* **4**, 1–11 (2012).
160. Herold, D. M., Hanlon, A. L., Movsas, B. & Hanks, G. E. Age-related prostate cancer metastases. *Urology* **51**, 985–990 (1998).
161. Brenner, H. & Arndt, V. Recent increase in cancer survival according to age: higher survival in all age groups, but widening age gradient. *Cancer Causes Control CCC* **15**, 903–910 (2004).
162. ZHANG, X. *et al.* Impact of obesity upon prostate cancer-associated mortality: A meta-analysis of 17 cohort studies. *Oncol. Lett.* **9**, 1307–1312 (2015).

163. Ribeiro, R. *et al.* Obesity and prostate cancer: gene expression signature of human periprostatic adipose tissue. *BMC Med.* **10**, 108 (2012).
164. Amundadottir, L. T. *et al.* A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat. Genet.* **38**, 652–658 (2006).
165. Chen, Y. & Sawyers, C. L. Coordinate transcriptional regulation by ERG and androgen receptor in fusion-positive prostate cancers. *Cancer Cell* **17**, 415–416 (2010).
166. Tomlins, S. A. *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310**, 644–648 (2005).
167. *Obesity Epidemiology.* (Oxford University Press, 2008).
168. Guh, D. P. *et al.* The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* **9**, 88 (2009).
169. Jung, U. J. & Choi, M.-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 6184–6223 (2014).
170. Organization, W. H. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic.* (World Health Organization, 2017).
171. Tominaga, K. The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiol. Aging Age Relat. Dis.* **5**, (2015).
172. Lin, L. *et al.* Ghrelin receptor regulates adipose tissue inflammation in aging. *Aging* **8**, 178–191 (2016).
173. Langin, D. In and Out: Adipose Tissue Lipid Turnover in Obesity and Dyslipidemia. *Cell Metab.* **14**, 569–570 (2011).
174. Wu, D. *et al.* Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 4829–4839 (2007).
175. Tzanetakou, I. P., Katsilambros, N. L., Benetos, A., Mikhailidis, D. P. & Perrea, D. N. ‘Is obesity linked to aging?’ *Ageing Res. Rev.* **11**, 220–229 (2012).
176. Frayn, K. N. & Karpe, F. Regulation of human subcutaneous adipose tissue blood flow. *Int. J. Obes.* **2005** **38**, 1019–1026 (2014).
177. Ma, X., Lee, P., Chisholm, D. J. & James, D. E. Control of Adipocyte Differentiation in Different Fat Depots; Implications for Pathophysiology or Therapy. *Front. Endocrinol.* **6**, (2015).
178. Kras, K. M., Hausman, D. B., Hausman, G. J. & Martin, R. J. Adipocyte development is dependent upon stem cell recruitment and proliferation of preadipocytes. *Obes. Res.* **7**, 491–497 (1999).
179. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. & Bieback, K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *STEM CELLS* **24**, 1294–1301 (2006).
180. Wagner, W. *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* **33**, 1402–1416 (2005).
181. Lee, R. H. *et al.* Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. *Cell. Physiol. Biochem.* **14**, 311–324 (2004).
182. Nombela-Arrieta, C., Ritz, J. & Silberstein, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 126–131 (2011).
183. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 1293–1307 (2000).
184. Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885–896 (2006).
185. Alrcon, C. *et al.* Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF- β Pathways.
Volume 139, Issue 4, 13 November 2009, Pages 757-769
186. Morrison, R. F. & Farmer, S. R. Role of PPAR γ in Regulating a Cascade Expression of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 17088–17097 (1999).

187. Shao, D. & Lazar, M. A. Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , CCAAT/ Enhancer-binding Protein α , and Cell Cycle Status Regulate the Commitment to Adipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* **272**, 21473–21478 (1997).
188. Zuo, Y. et al. Activation of CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) α Expression by C/EBP β during Adipogenesis Requires a Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ -associated Repression of HDAC1 at the C/ebp α Gene Promoter
J Biol Chem. 1997 Aug 22;272(34):21473-8.
189. Shi, Y. et al. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Jul;297(1):E10-8. doi: 10.1152/ajpendo.90949.2008.
190. Langin, D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol. Res.* **53**, 482–491 (2006).
191. Zhang, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
192. Zhang, F., Chen, Y., Heiman, M. & DiMarchi, R. Leptin: Structure, Function and Biology. *Vitam. Horm.* **71**, 345–372 (2005).
193. Khan, M. & Joseph, F. Adipose Tissue and Adipokines: The Association with and Application of Adipokines in Obesity. *Scientifica* **2014**, e328592 (2014).
194. Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 911–919; quiz 920 (2005).
195. Aherne, W. & Hull, D. Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. *J. Pathol. Bacteriol.* **91**, 223–234 (1966).
196. Smith, R. E. & Horwitz, B. A. Brown fat and thermogenesis. *Physiol. Rev.* **49**, 330–425 (1969).
197. Symonds, M. E., Pope, M. & Budge, H. The Ontogeny of Brown Adipose Tissue. *Annu. Rev. Nutr.* **35**, 295–320 (2015).
198. Sacks, H. & Symonds, M. E. Anatomical Locations of Human Brown Adipose Tissue. *Diabetes* **62**, 1783–1790 (2013).
199. Heaton, J. M. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J. Anat.* **112**, 35–39 (1972).
200. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
201. Tseng, Y.-H. et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000–1004 (2008).
202. Seale, P. et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961–967 (2008).
203. Becerril S. et al. Role of PRDM16 in the activation of brown fat programming. Relevance to the development of obesity. *Histol Histopathol.* 2013 Nov;28(11):1411-25. doi: 10.14670/HH-28.1411. Epub 2013 Jun 17
204. Bianco, A. C. & Silva, J. E. Nuclear 3,5,3'-Triiodothyronine (T3) in Brown Adipose Tissue: Receptor Occupancy and Sources of T3 as Determined by in Vivo Techniques. *Endocrinology* **120**, 55–62 (1987).
205. Fasshauer, M. et al. Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 319–329 (2001).
206. Tseng, Y.-H., Kriauciunas, K. M., Kokkotou, E. & Kahn, C. R. Differential Roles of Insulin Receptor Substrates in Brown Adipocyte Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1918–1929 (2004).
207. Connolly, E., Nedergaard, J. & Cannon, B. Shivering and Nonshivering Thermogenesis in Birds: A Mammalian View. in *Physiology of Cold Adaptation in Birds* (eds. Bech, C. & Reinertsen, R. E.) 37–48 (Springer US, 1989). doi:10.1007/978-1-4757-0031-2_4
208. Ouellet, V. et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest.* **122**, 545–552 (2012).
209. Power, G. G. Biology of temperature: the mammalian fetus. *J. Dev. Physiol.* **12**, 295–304 (1989).
210. Rothwell, N. J. & Stock, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281**, 31–35 (1979).

211. Rothwell NJ, et al. Luxuskonsumtion, Diet-Induced Thermogenesis and Brown Fat: The Case in Favour. *Clin Sci (Lond)*. 1983 Jan;64(1):19-23.
212. Huttunen, P., Hirvonen, J. & Kinnula, V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur. J. Appl. Physiol.* **46**, 339–345 (1981).
213. Le Blanc J. et al, Mechanisms of adaptation to cold. *Int J Sports Med*. 1992 Oct;13 Suppl 1:S169-72.
214. Jastroch, M. *et al*. Seasonal Control of Mammalian Energy Balance: Recent Advances in the Understanding of Daily Torpor and Hibernation. *J. Neuroendocrinol.* **28**, (2016).
215. Yoneshiro, T. *et al*. Brown adipose tissue is involved in the seasonal variation of cold-induced thermogenesis in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* ajpregu.00057.2015 (2016). doi:10.1152/ajpregu.00057.2015
216. Bertholet, A. M. & Kirichok, Y. UCP1: A transporter for H(+) and fatty acid anions. *Biochimie* **134**, 28–34 (2017).
217. Liu, X. *et al*. Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology* **156**, 2461–2469 (2015).
218. Tran, T. T. & Kahn, C. R. Transplantation of Adipose Tissue and Adipose-Derived Stem Cells as a Tool to Study Metabolic Physiology and for Treatment of Disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **6**, 195–213 (2010).
219. Beijer, E. *et al*. A role of active brown adipose tissue in cancer cachexia? *Oncol. Rev.* **6**, (2012).
220. Shellock, F. G., Riedinger, M. S. & Fishbein, M. C. Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **111**, 82–85 (1986).
221. Wang, G.-X., Zhao, X.-Y. & Lin, J. D. The brown fat secretome: metabolic functions beyond thermogenesis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **26**, 231–237 (2015).
222. Poher, A.-L., Altirriba, J., Veyrat-Durebex, C. & Rohner-Jeanrenaud, F. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. *Front. Physiol.* **6**, (2015).
223. Nedergaard, J. & Cannon, B. How brown is brown fat? It depends where you look. *Nat. Med.* **19**, 540–541 (2013).
224. Lidell, M. E. *et al*. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat. Med.* **19**, 631–634 (2013).
225. Wu, J. *et al*. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–376 (2012).
226. Cedikova, M. *et al*. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
227. Long, J. Z. *et al*. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* **19**, 810–820 (2014).
228. Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. New powers of brown fat: fighting the metabolic syndrome. *Cell Metab.* **13**, 238–240 (2011).
229. Cereiyo, R., Giralt, M. & Villarroya, F. Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Ann. Med.* **47**, 169–177 (2015).
230. Sanchez-Gurmaches, J. *et al*. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab.* **16**, 348–362 (2012).
231. Villarroya F. *et al*. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology: Nature Research*. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Jan;13(1):26-35. doi: 10.1038/nrendo.2016.136. Epub 2016 Sep 12.
232. Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G. & Cinti, S. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur. J. Endocrinol.* **170**, R159–R171 (2014).
233. Valencak, T. G., Osterrieder, A. & Schulz, T. J. Sex matters: The effects of biological sex on adipose tissue biology and energy metabolism. *Redox Biol.* **12**, 806–813 (2017).

234. Magi-Galluzzi, C. *et al.* International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 3: extraprostatic extension, lymphovascular invasion and locally advanced disease. *Mod. Pathol.* **24**, 26–38 (2011).
235. van Roermund, J. G. H. *et al.* Periprostatic fat correlates with tumour aggressiveness in prostate cancer patients. *BJU Int.* **107**, 1775–1779 (2011).
236. Taussky, D. *et al.* Changes in periprostatic adipose tissue induced by 5 α -reductase inhibitors. *Andrology* **5**, 511–515 (2017).
237. Toren, P. & Venkateswaran, V. Periprostatic adipose tissue and prostate cancer progression: new insights into the tumor microenvironment. *Clin. Genitourin. Cancer* **12**, 21–26 (2014).
238. Careaga, V. P. *et al.* Fatty Acid Composition of Human Periprostatic Adipose Tissue from Argentine Patients and Its Relationship to Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia. *Res. Cancer Tumor* **4**, 1–6 (2015).
239. Iordanescu, G. *et al.* MRS measured fatty acid composition of periprostatic adipose tissue correlates with pathological measures of prostate cancer aggressiveness. *J. Magn. Reson. Imaging* **42**, 651–657 (2015).
240. Obesity and prostate cancer: gene expression signature of human periprostatic adipose tissue | BMC Medicine
241. Mori, S., Kiuchi, S., Ouchi, A., Hase, T. & Murase, T. Characteristic Expression of Extracellular Matrix in Subcutaneous Adipose Tissue Development and Adipogenesis; Comparison with Visceral Adipose Tissue. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 825–833 (2014).
242. Attané, C., Estève, D., Chaoui, K., Lacovoni, J., Corre, J., Moutahir, M., Valet, P., Sciltz, O., Reyna, N. & Muller, C. Yellow adipocytes comprise a new adipocyte sub-type present in human bone marrow. *BioRxiv*, May 19, 2019
243. Scheller, E. L., Cawthorn, W. P., Burr, A. A., Horowitz, M. C. & MacDougald, O. A. Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 392–403 (2016).
244. Hardouin, P., Rharass, T. & Lucas, S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front. Endocrinol.* **7**, (2016).
245. Yang, M., Büsche, G., Ganser, A. & Li, Z. Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects. *Ann. Hematol.* **92**, 587–594 (2013).
246. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* **106**, 1901–1910 (2005).
247. Bianco, P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood* **117**, 5281–5288 (2011).
248. Targeting the Molecular and Cellular Interactions of the Bone Marrow Niche in Immunologic Disease (PDF Download Available). *ResearchGate* doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11882-013-0402-8>
249. Mendelson, A. & Frenette, P. S. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* **20**, 833–846 (2014).
250. Anthony, B. & Link, D. C. Regulation of Hematopoietic Stem Cells by Bone Marrow Stromal Cells. *Trends Immunol.* **35**, 32–37 (2014).
251. Calvi, L. M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841–846 (2003).
252. Adler, B. J., Kaushansky, K. & Rubin, C. T. Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 737–748 (2014).
253. Justesen, J. *et al.* Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* **2**, 165–171 (2001).
254. Chen, Q. *et al.* Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.* **23**, 1128–1139 (2016).

255. Wang, C. *et al.* Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts and Adipocytes and its Role in Treatment of Osteoporosis. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **22**, 226–233 (2016).
256. Yue, R., Zhou, B. O., Shimada, I. S., Zhao, Z. & Morrison, S. J. Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell* **18**, 782–796 (2016).
257. Laharrague, P. *et al.* High concentration of leptin stimulates myeloid differentiation from human bone marrow CD34+ progenitors: potential involvement in leukocytosis of obese subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **24**, 1212–1216 (2000).
258. Laharrague, P. *et al.* High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **12**, 747–752 (1998).
259. Tian, Y., Xu, Y., Fu, Q. & He, M. Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation in a Wnt/ β -catenin-dependent manner. *Mol. Cell. Biochem.* **355**, 211–216 (2011).
260. Gimble, J. M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1087–1094 (1996).
261. Krings, A. *et al.* Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes. *Bone* **50**, 546–552 (2012).
262. Crossno, J. T., Majka, S. M., Grazia, T., Gill, R. G. & Klemm, D. J. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow–derived circulating progenitor cells. *J. Clin. Invest.* **116**, 3220–3228 (2006).
263. MacKay, D. L., Tesar, P. J., Liang, L.-N. & Haynesworth, S. E. Characterizing medullary and human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *J. Cell. Physiol.* **207**, 722–728 (2006).
264. Naveiras, O. *et al.* Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259–263 (2009).
265. Takeshita, S., Fumoto, T., Naoe, Y. & Ikeda, K. Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. *J. Biol. Chem.* **289**, 16699–16710 (2014).
266. Holt, V., Caplan, A. I. & Haynesworth, S. E. Identification of a Subpopulation of Marrow MSC-Derived Medullary Adipocytes That Express Osteoclast-Regulating Molecules: Marrow Adipocytes Express Osteoclast Mediators. *PLoS ONE* **9**, (2014).
267. Styner, M. *et al.* Exercise Decreases Marrow Adipose Tissue Through β -Oxidation in Obese Running Mice. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* (2017). doi:10.1002/jbmr.3159
268. Herroon MK. *et al.* New 3D-Culture Approaches to Study Interactions of Bone Marrow Adipocytes with Metastatic Prostate cancer cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016 Jul 6;7:84. doi: 10.3389/fendo.2016.00084. eCollection 2016.
269. Devlin, M. J. *et al.* Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 2078–2088 (2010).
270. Miller, K. N. *et al.* Aging and caloric restriction impact adipose tissue, adiponectin, and circulating lipids. *Aging Cell* **16**, 497–507 (2017).
271. Blackburn, H. & Jacobs, D. Commentary: Origins and evolution of body mass index (BMI): continuing saga. *Int. J. Epidemiol.* **43**, 665–669 (2014).
272. Spiegelman, B. M. & Flier, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531–543 (2001).
273. Arner, P. *et al.* Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature* **478**, 110–113 (2011).
274. Marrades, M. P., González-Muniesa, P., Martínez, J. A. & Moreno-Aliaga, M. J. A dysregulation in CES1, APOE and other lipid metabolism-related genes is associated to cardiovascular risk factors linked to obesity. *Obes. Facts* **3**, 312–318 (2010).
275. Karpe, F. & Pinnick, K. E. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue—link to whole-body phenotypes. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 90–100 (2015).

276. Jo, J. *et al.* Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput. Biol.* **5**, (2009).
277. Monteiro, R. & Azevedo, I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators Inflamm.* **2010**, (2010).
278. Murano, I. *et al.* Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J. Lipid Res.* **49**, 1562–1568 (2008).
279. Sacks, H. & Symonds, M. E. Anatomical Locations of Human Brown Adipose Tissue. *Diabetes* **62**, 1783–1790 (2013).
280. Saito, M. Brown Adipose Tissue as a Regulator of Energy Expenditure and Body Fat in Humans. *Diabetes Metab. J.* **37**, 22–29 (2013).
281. Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **19**, 1252–1263 (2013).
282. Tiberi, D., Gruszczynski, N., Meissner, A., Delouya, G. & Taussky, D. Influence of body mass index and periprostatic fat on rectal dosimetry in permanent seed prostate brachytherapy. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* **9**, 93 (2014).
283. Colman, R. J. *et al.* Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. *Science* **325**, 201–204 (2009).
284. Grymala, K. *et al.* Positive effects of prolonged caloric restriction on the population of very small embryonic-like stem cells – hematopoietic and ovarian implications. *J. Ovarian Res.* **7**, 68 (2014).
285. Wang, J. *et al.* Caloric restriction attenuates β -amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **19**, 659–661 (2005).
286. Holtkamp, K., Hebebrand, J. & Herpertz-Dahlmann, B. The contribution of anxiety and food restriction on physical activity levels in acute anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* **36**, 163–171 (2004).
287. Benson, J; *et al.* Inadequate Nutrition and Chronic Calorie Restriction in Adolescent Ballerinas: The Physician and Sportsmedicine
Vol 13, 1985 - Issue 10
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00913847.1985.11708902>.
288. Smink, F. R. E., van Hoeken, D. & Hoek, H. W. Epidemiology of Eating Disorders: Incidence, Prevalence and Mortality Rates. *Curr. Psychiatry Rep.* **14**, 406–414 (2012).
289. El Ghoch, M., Calugi, S., Lamburghini, S. & Dalle Grave, R. Anorexia Nervosa and Body Fat Distribution: A Systematic Review. *Nutrients* **6**, 3895–3912 (2014).
290. Bredella, M. A. *et al.* Young Women with Cold-Activated Brown Adipose Tissue Have Higher Bone Mineral Density and Lower Pref-1 than Women without Brown Adipose Tissue: A Study in Women with Anorexia Nervosa, Women Recovered from Anorexia Nervosa, and Normal-Weight Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E584–E590 (2012).
291. Pasanisi, F. *et al.* Evidence of Brown Fat Activity in Constitutional Leanness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1214–1218 (2013).
292. Lidell, M. E. & Enerbäck, S. Brown adipose tissue and bone. *Int. J. Obes. Suppl.* **5**, S23–S27 (2015).
293. Misra, M. & Klibanski, A. Anorexia Nervosa, Obesity and Bone Metabolism. *Pediatr. Endocrinol. Rev. PER* **11**, 21–33 (2013).
294. Bowles, B. C. & Williamson, B. P. Pregnancy and lactation following anorexia and bulimia. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs. JOGNN* **19**, 243–248 (1990).
295. Hoffman, E. R., Zerwas, S. C. & Bulik, C. M. Reproductive issues in anorexia nervosa. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* **6**, 403–414 (2011).
296. Torgersen, L. *et al.* Breastfeeding practice in mothers with eating disorders. *Matern. Child. Nutr.* **6**, 243–252 (2010).
297. Ecklund, K. *et al.* Bone marrow changes in adolescent girls with anorexia nervosa. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 298–304 (2010).
298. Tchkonja, T. *et al.* Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* **9**, 667–684 (2010).
299. Picard, F. & Guarente, L. Molecular links between aging and adipose tissue. *Int. J. Obes.* **29**, S36–S39 (2005).

300. Garg, S. K., Delaney, C., Shi, H. & Yung, R. Changes in adipose tissue macrophages and T cells during aging. *Crit. Rev. Immunol.* **34**, 1–14 (2014).
301. Vergoni, B. *et al.* DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes. *Diabetes* **65**, 3062–3074 (2016).
302. Minamino, T. *et al.* A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* **15**, 1082–1087 (2009).
303. Muñoz-Espín, D. & Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 482–496 (2014).
304. Vergoni, B. *et al.* DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes. *Diabetes* **65**, 3062–3074 (2016).
305. Gong, H. *et al.* Age-dependent tissue expression patterns of Sirt1 in senescence-accelerated mice. *Mol. Med. Rep.* **10**, 3296–3302 (2014).
306. Picard, F. *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature* **429**, 771–776 (2004).
307. Chalkiadaki, A. & Guarente, L. High-Fat Diet Triggers Inflammation-Induced Cleavage of SIRT1 in Adipose Tissue To Promote Metabolic Dysfunction. *Cell Metab.* **16**, 180–188 (2012).
308. Gao, Z. *et al.* Sirtuin 1 (SIRT1) protein degradation in response to persistent c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation contributes to hepatic steatosis in obesity. *J. Biol. Chem.* **286**, 22227–22234 (2011).
309. Xu, C. *et al.* Calorie Restriction Prevents Metabolic Aging Caused by Abnormal SIRT1 Function in Adipose Tissues. *Diabetes* **64**, 1576–1590 (2015).
310. Duteil, D. *et al.* Lsd1 prevents age-programed loss of beige adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 5265–5270 (2017).
311. Justesen, J. *et al.* Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* **2**, 165–171 (2001).
312. Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 772–783 (2006).
313. Markowski, D. N. *et al.* HMGA2 expression in white adipose tissue linking cellular senescence with diabetes. *Genes Nutr.* **8**, 449–456 (2013).
314. Mbeunkui, F. & Johann, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **63**, 571–582 (2009).
315. Pattabiraman, DR. *et al.* Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jul; 13(7): 497–512. doi: 10.1038/nrd4253
316. Quante, M. *et al.* Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell* **19**, 257–272 (2011).
317. Butler, J. M., Kobayashi, H. & Rafii, S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 138–146 (2010).
318. Weis, S. M. & Cheresh, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.* **17**, 1359–1370 (2011).
319. DeNardo, DG. *et al.* CD4⁺ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages *Cancer Cell.* 2009 Aug 4;16(2):91-102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.018.
320. Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 295–307 (2006).
321. Restifo, N. P., Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 269–281 (2012).
322. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* **14**, 1014–1022 (2013).
323. Liu, Q., Liao, Q. & Zhao, Y. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) facilitate distant metastasis of malignancies by shielding circulating tumor cells (CTC) from immune surveillance. *Med. Hypotheses* **87**, 34–39 (2016).

324. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 71–78 (2004).
325. Lu, P., Weaver, V. M. & Werb, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* **196**, 395–406 (2012).
326. Oskarsson, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *The Breast* **22**, S66–S72 (2013).
327. Guaita-Esteruelas, S., Gumà, J., Masana, L. & Borràs, J. The peritumoural adipose tissue microenvironment and cancer. The roles of fatty acid binding protein 4 and fatty acid binding protein 5. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2017). doi:10.1016/j.mce.2017.02.002
328. Wang, Y. Y. *et al.* Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight* **2**, (2017).
329. Amemori, S. *et al.* Adipocytes and preadipocytes promote the proliferation of colon cancer cells in vitro. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G923–929 (2007).
330. Schwartz, B. & Yehuda-Shnaidman, E. Putative Role of Adipose Tissue in Growth and Metabolism of Colon Cancer Cells. *Front. Oncol.* **4**, (2014).
331. Venning, F. A., Wullkopf, L. & Erler, J. T. Targeting ECM Disrupts Cancer Progression. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
332. Bulun, S. E., Chen, D., Moy, I., Brooks, D. C. & Zhao, H. Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **23**, 83–89 (2012).
333. Calle, E. E. & Kaaks, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 579–591 (2004).
334. Stephenson, G. D. & Rose, D. P. Breast cancer and obesity: an update. *Nutr. Cancer* **45**, 1–16 (2003).
335. Bracci, P. M. Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol. Carcinog.* **51**, 53–63 (2012).
336. Frezza, E. E., Wachtel, M. S. & Chiriva-Internati, M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut* **55**, 285–291 (2006).
337. Finley, D. S. *et al.* Periprostatic Adipose Tissue as a Modulator of Prostate Cancer Aggressiveness. *J. Urol.* **182**, 1621–1627 (2009).
338. Holmes, D. Adipose tissue: Adipocyte exosomes drive melanoma progression. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 436–436 (2016).
339. Lazar, I. *et al.* Adipocyte Exosomes Promote Melanoma Aggressiveness through Fatty Acid Oxidation: A Novel Mechanism Linking Obesity and Cancer. *Cancer Res.* **76**, 4051–4057 (2016).
340. Chi, M. *et al.* Adipocytes contribute to resistance of human melanoma cells to chemotherapy and targeted therapy. *Curr. Med. Chem.* **21**, 1255–1267 (2014).
341. Savoia, P. *et al.* Skin metastases of malignant melanoma: a clinical and prognostic survey. *Melanoma Res.* **19**, 321–326 (2009).
342. Fujisaki, K. *et al.* Cancer-mediated adipose reversion promotes cancer cell migration via IL-6 and MCP-1. *Breast Cancer Res. Treat.* **150**, 255–263 (2015).
343. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
344. Notarnicola, M., Miccolis, A., Tutino, V., Lorusso, D. & Caruso, M. G. Low levels of lipogenic enzymes in peritumoral adipose tissue of colorectal cancer patients. *Lipids* **47**, 59–63 (2012).
345. Kushiro, K. *et al.* Adipocytes Promote B16BL6 Melanoma Cell Invasion and the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Microenviron.* 2012 Apr; 5(1): 73–82. Published online 2011 Sep 3.
346. Park, J., Euhus, D. M. & Scherer, P. E. Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. *Endocr. Rev.* **32**, 550–570 (2011).
347. Duong, M. N. *et al.* The fat and the bad: Mature adipocytes, key actors in tumor progression and resistance. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.18038
348. Scheller, E. L., Burr, A. A., MacDougald, O. A. & Cawthorn, W. P. Inside out: Bone marrow adipose tissue as a source of circulating adiponectin. *Adipocyte* **5**, 251–269 (2016).

349. Smitka K, et al. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. *Prague Med Rep.* 2015;116(2):87-111. doi: 10.14712/23362936.2015.49.
350. Garofalo, C. & Surmacz, E. Leptin and cancer. *J. Cell. Physiol.* **207**, 12–22 (2006).
351. Howard, J. M., Pidgeon, G. P. & Reynolds, J. V. Leptin and gastro-intestinal malignancies. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **11**, 863–874 (2010).
352. Schäffler, A., Schölmerich, J. & Buechler, C. Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **3**, 345–354 (2007).
353. Friedman, J. M. & Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763–770 (1998).
354. Yu, Z. et al. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Feb;98(6):e14359. doi
355. Saxena, N. K. et al. Adiponectin Modulates C-Jun N-Terminal Kinase and Mammalian Target of Rapamycin and inhibits hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **139**, 1762–1773.e5 (2010).
356. Kelesidis, I., Kelesidis, T. & Mantzoros, C. S. Adiponectin and cancer: a systematic review. *Br. J. Cancer* **94**, 1221–1225 (2006).
357. Kurmasheva, R. T. & Houghton, P. J. IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1766**, 1–22 (2006).
358. Denduluri, S. K. et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. *Genes Dis.* **2**, 13–25 (2015).
359. Vigneri, P. G. et al. The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
360. Weroha, S. J. & Haluska, P. IGF System in Cancer. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **41**, 335–350 (2012).
361. Pollak, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 915–928 (2008).
362. Rahimi, N., Saulnier, R., Nakamura, T., Park, M. & Elliott, B. Role of hepatocyte growth factor in breast cancer: a novel mitogenic factor secreted by adipocytes. *DNA Cell Biol.* **13**, 1189–1197 (1994).
363. Takayama, H. et al. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 701–706 (1997).
364. Kim, H. J. et al. Expression of resistin in the prostate and its stimulatory effect on prostate cancer cell proliferation. *BJU Int.* **108**, E77-83 (2011).
365. Sun, C.-A. et al. Adipocytokine resistin and breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 869–876 (2010).
366. Simpson, E. R. & Zhao, Y. Estrogen biosynthesis in adipose. Significance in breast cancer development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **784**, 18–26 (1996).
367. Agarwal, V. R., Bulun, S. E., Leitch, M., Rohrich, R. & Simpson, E. R. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 3843–3849 (1996).
368. Heldring, N. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* **87**, 905–931 (2007).
369. Wang, X., Simpson, E. R. & Brown, K. A. Aromatase overexpression in dysfunctional adipose tissue links obesity to postmenopausal breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **153**, 35–44 (2015).
370. Orgel, E. & Mittelman, S. D. The Links Between Insulin Resistance, Diabetes, and Cancer. *Curr. Diab. Rep.* **13**, 213–222 (2013).
371. Djiogue S. et al. Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs. *Endocr Relat Cancer*. 2013 Jan 7;20(1):R1-R17. doi: 10.1530/ERC-12-0324. Print 2013 Feb.

372. Considine, R. V. *et al.* Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292–295 (1996).
373. Arita Y. *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr 2;257(1):79-83.
374. Hefetz-Sela, S. & Scherer, P. E. Adipocytes: impact on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* **138**, 197–210 (2013).
375. Bell, L. N. *et al.* Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**, E843-848 (2006).
376. Steppan, C. M. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307–312 (2001).
377. Cohen, P. G. Aromatase, adiposity, aging and disease. The hypogonadal-metabolic-atherogenic-disease and aging connection. *Med. Hypotheses* **56**, 702–708 (2001).
378. Cleland, W. H., Mendelson, C. R. & Simpson, E. R. Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **60**, 174–177 (1985).
379. Divella, R., De Luca, R., Abbate, I., Naglieri, E. & Daniele, A. Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation. *J. Cancer* **7**, 2346–2359 (2016).
380. Coppack, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* **60**, 349–356 (2001).
381. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867 (2002).
382. Ye, J. Adipose Tissue Vascularization: Its Role in Chronic Inflammation. *Curr. Diab. Rep.* **11**, 203–210 (2011).
383. Kzhyshkowska, J., Gudima, A., Moganti, K., Gratchev, A. & Orekhov, A. Perspectives for Monocyte/Macrophage-Based Diagnostics of Chronic Inflammation. *Transfus. Med. Hemotherapy* **43**, 66–77 (2016).
384. Kang, Y. E. *et al.* The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS ONE* **11**, (2016).
385. Arendt, L. M. *et al.* Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. *Cancer Res.* **73**, 6080–6093 (2013).
386. Howe, L. R., Subbaramaiah, K., Hudis, C. A. & Dannenberg, A. J. Molecular Pathways: Adipose Inflammation as a Mediator of Obesity-Associated Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, 6074–6083 (2013).
387. Reunanen, N. & Kähäri, V. *Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion.* (Landes Bioscience, 2013).
388. Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **10**, 415–433 (2000).
389. Mendonsa, A. M. *et al.* Host and tumor derived MMP13 regulate extravasation and establishment of colorectal metastases in the liver. *Mol. Cancer* **14**, (2015).
390. Motrescu, E. R. *et al.* Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene* **27**, 6347–6355 (2008).
391. Andarawewa, K. L. *et al.* Stromelysin-3 Is a Potent Negative Regulator of Adipogenesis Participating to Cancer Cell-Adipocyte Interaction/Crosstalk at the Tumor Invasive Front. *Cancer Res.* **65**, 10862–10871 (2005).
392. Muir, L. A. *et al.* Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obes. Silver Spring Md* **24**, 597–605 (2016).
393. Ueha, S., Shand, F. H. W. & Matsushima, K. Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Inflammation-Associated Organ Fibrosis. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
394. Ye, J. Hypoxia in obesity - from bench to bedside. *J. Transl. Med.* **10**, A20 (2012).
395. Henrichot, E. *et al.* Production of Chemokines by Perivascular Adipose Tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2594–2599 (2005).
396. Huber, J. *et al.* CC Chemokine and CC Chemokine Receptor Profiles in Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Are Altered in Human Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3215–3221 (2008).

397. Khalid, A. *et al.* Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer. *Mini Rev. Med. Chem.* **15**, 1063–1072 (2015).
398. D'Esposito, V. *et al.* Adipose microenvironment promotes triple negative breast cancer cell invasiveness and dissemination by producing CCL5. *Oncotarget* **7**, 24495–24509 (2016).
399. Soria, G. & Ben-Baruch, A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett.* **267**, 271–285 (2008).
400. Xu, L., Kitade, H., Ni, Y. & Ota, T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules* **5**, 1563–1579 (2015).
401. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–891 (2012).
402. Costa-Silva, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **17**, 816–826 (2015).
403. Azmi, A. S., Bao, B. & Sarkar, F. H. Exosomes in Cancer Development, Metastasis and Drug Resistance: A Comprehensive Review. *Cancer Metastasis Rev.* **32**, (2013).
404. WEIDLE, H. U., BIRZELE, F., KOLLMORGEN, G. & RÜGER, R. The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* **14**, 1–16 (2016).
405. Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines. *Immunity* **12**, 121–127 (2000).
406. Lodowski, D. T. & Palczewski, K. Chemokine receptors and other GPCRs. *Curr. Opin. HIV AIDS* **4**, 88–95 (2009).
407. Wu, Y. & Yoder, A. Chemokine Coreceptor Signaling in HIV-1 Infection and Pathogenesis. *PLOS Pathog.* **5**, e1000520 (2009).
408. Wu, D. Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis. *Cell Res.* **15**, 52–56 (2005).
409. Wang, Y., Chen, C.-L. & Iijima, M. Signaling Mechanisms for Chemotaxis. *Dev. Growth Differ.* **53**, 495–502 (2011).
410. Müller, A. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50–56 (2001).
411. Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS. CXCR4 and cancers
Pathol Int. 2010 Jul;60(7):497-505. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02548.x.
412. Wang, J. *et al.* Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 502–512 (2008).
413. Ghadjar, P., Rubie, C., Aebersold, D. M. & Keilholz, U. The chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in human malignancy with focus on colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **125**, 741–745 (2009).
414. Murakami T. *et al.* Immune Evasion by Murine Melanoma Mediated through CC Chemokine Receptor
J Exp Med. 2003 Nov 3; 198(9): 1337–1347. doi: 10.1084/jem.20030593
415. Darash-Yahana M. *et al.* The Chemokine CXCL16 and Its Receptor, CXCR6, as Markers and Promoters of inflammation-associated cancers.
PLoS One. 2009 Aug 19;4(8):e6695. doi: 10.1371/journal.pone.0006695.
416. Singh, S., Nannuru, K. C., Sadanandam, A., Varney, M. L. & Singh, R. K. CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumourigenesis, growth and invasion. *Br. J. Cancer* **100**, 1638–1646 (2009).
417. Kitadai, Y. *et al.* Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 2735–2740 (2000).
418. Messmer, D. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells receive RAF-dependent survival signals in response to CXCL12 that are sensitive to inhibition by sorafenib. *Blood* **117**, 882–889 (2011).
419. Lu, P. *et al.* Potential interaction between CCR1 and its ligand, CCL3, induced by endogenously produced interleukin-1 in human hepatomas. *Am. J. Pathol.* **162**, 1249–1258 (2003).
420. Mehrad, B., Keane, M. P. & Strieter, R. M. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **97**, 755–762 (2007).
421. Surmi, B. K. & Hasty, A. H. The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue. *Vascul. Pharmacol.* **52**, 27–36 (2010).

422. Kim, J. & Bae, J.-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm.* **2016**, (2016).
423. Tazzyman, S., Lewis, C. E. & Murdoch, C. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**, 222–231 (2009).
424. Guo, F. *et al.* CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene* **35**, 816–826 (2016).
425. Chow, M. T. & Luster, A. D. Chemokines in Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 1125–1131 (2014).
426. Sarvaiya, P. J., Guo, D., Ulasov, I., Gabikian, P. & Lesniak, M. S. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* **4**, 2171–2185 (2013).
427. Zhang, S. *et al.* Chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 expression are associated with perineural invasion of prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **27**, 62 (2008).
428. Wang, J. *et al.* The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* **283**, 4283–4294 (2008).
429. Uehara, H. *et al.* Expression of interleukin-8 gene in radical prostatectomy specimens is associated with advanced pathologic stage. *The Prostate* **64**, 40–49 (2005).
430. Murphy, C. *et al.* Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 4117–4127 (2005).
431. Lu, Y. *et al.* CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J. Cell. Biochem.* **101**, 676–685 (2007).
432. Lim, S. Y., Yuzhalin, A. E., Gordon-Weeks, A. N. & Muschel, R. J. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget* **7**, 28697–28710 (2016).
433. Mazzucchelli, L. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in prostatic hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **149**, 501–509 (1996).
434. Lu, Y. *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 mediates prostate cancer-induced bone resorption. *Cancer Res.* **67**, 3646–3653 (2007).
435. Chen, Q. & Zhong, T. The association of CXCR4 expression with clinicopathological significance and potential drug target in prostate cancer: a meta-analysis and literature review. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 5115–5122 (2015).
436. Weilbaecher, K. N., Guise, T. A. & McCauley, L. K. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 411–425 (2011).
437. Liu, Q. *et al.* The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **31**, 61–71 (2016).
438. Wilson, C. *et al.* Constitutive and Treatment-Induced CXCL8-Signalling Selectively Modulates the Efficacy of Anti-Metabolite Therapeutics in Metastatic Prostate Cancer. *PLoS ONE* **7**, (2012).
439. Huang, J. *et al.* Differential expression of interleukin-8 and its receptors in the neuroendocrine and non-neuroendocrine compartments of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* **166**, 1807–1815 (2005).
440. Lehrer, S., Diamond, E. J., Mamkin, B., Stone, N. N. & Stock, R. G. Serum interleukin-8 is elevated in men with prostate cancer and bone metastases. *Technol. Cancer Res. Treat.* **3**, 411 (2004).
441. Veltri RW. *et al.* Interleukin-8 serum levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology*. 1999 Jan;53(1):139-47.
442. Salazar, N., Castellan, M., Shirodkar, S. S. & Lokeshwar, B. L. Chemokines and Chemokine Receptors as Promoters of Prostate Cancer Growth and Progression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **23**, 77–91 (2013).
443. Lu, Y. *et al.* Activation of MCP-1/CCR2 axis promotes prostate cancer growth in bone. *Clin. Exp. Metastasis* **26**, 161–169 (2009).
444. Huang, D. R., Wang, J., Kivisakk, P., Rollins, B. J. & Ransohoff, R. M. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **193**, 713–726 (2001).

445. Loberg, R. D. *et al.* CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia N. Y. N* **8**, 578–586 (2006).
446. Lee, D. J. *et al.* Recent changes in prostate cancer screening practices and prostate cancer epidemiology. *J. Urol.* (2017). doi:10.1016/j.juro.2017.05.074
447. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 85–97 (2011).
448. Laurent, V. *et al.* Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat. Commun.* **7**, 10230 (2016).
449. Li, J., Liu, X., Zuo, B. & Zhang, L. The Role of Bone Marrow Microenvironment in Governing the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis. *Aging Dis.* **7**, 514–525 (2016).
450. Gong, Z., Agalliu, I., Lin, D. W., Stanford, J. L. & Kristal, A. R. Obesity is associated with increased risks of prostate cancer metastasis and death after initial cancer diagnosis in middle-aged men. *Cancer* **109**, 1192–1202 (2007).
451. Hardaway, A. L., Herroon, M. K., Rajagurubandara, E. & Podgorski, I. Bone marrow fat: linking adipocyte-induced inflammation with skeletal metastases. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 527–543 (2014).
452. Jin, Y. *et al.* Changes of plasma cytokines and chemokines expression level in nasopharyngeal carcinoma patients after treatment with definitive intensity-modulated radiotherapy (IMRT). *PLOS ONE* **12**, e0172264 (2017).
453. Shiozawa, Y. *et al.* Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J. Clin. Invest.* **121**, 1298–1312 (2011).
454. Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327–334 (2014).
455. Sun, Y.-X. *et al.* Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **20**, 318–329 (2005).
456. Weiss, R. J., Forsberg, J. A. & Wedin, R. Surgery of skeletal metastases in 306 patients with prostate cancer. *Acta Orthop.* **83**, 74–79 (2012).
457. Baum, T. *et al.* Does vertebral bone marrow fat content correlate with abdominal adipose tissue, lumbar spine bone mineral density, and blood biomarkers in women with type 2 diabetes mellitus? *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **35**, 117–124 (2012).
458. Patsch, J. M. *et al.* Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **28**, 1721–1728 (2013).
459. Makki, K., Froguel, P. & Wolowczuk, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* **2013**, 139239 (2013).
460. Corre, J. *et al.* Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J. Cell. Physiol.* **208**, 282–288 (2006).
461. Nagineni, C. N. *et al.* Inflammatory Cytokines Induce Expression of Chemokines by Human Retinal Cells: Role in Chemokine Receptor Mediated Age-related Macular Degeneration. *Aging Dis.* **6**, 444–455 (2015).
462. Bianchi-Frias, D. *et al.* The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PloS One* **5**, (2010).
463. Chen, J. *et al.* Aging is associated with increased T-cell chemokine expression in C57BL/6 mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **58**, 975–983 (2003).
464. Power, C. A. *et al.* A novel model of bone-metastatic prostate cancer in immunocompetent mice. *The Prostate* **69**, 1613–1623 (2009).
465. Lecka-Czernik, B., Stechschulte, L. A., Czernik, P. J. & Dowling, A. R. High bone mass in adult mice with diet-induced obesity results from a combination of initial increase in bone mass followed by attenuation in bone formation; implications for high bone mass and decreased bone quality in obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **410**, 35–41 (2015).
466. Schwartz, A. V. Marrow fat and bone: review of clinical findings. *Front. Endocrinol.* **6**, 40(2015).

467. Ambrosi, T. H. *et al.* Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell* **20**, 771–784.e6 (2017).
468. McCabe, N. P., Madajka, M., Vasanji, A. & Byzova, T. V. Intraosseous injection of RM1 murine prostate cancer cells promotes rapid osteolysis and periosteal bone deposition. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 581–590 (2008).
469. White, J. R. *et al.* Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J. Biol. Chem.* **273**, 10095–10098 (1998).
470. Fricker, S. P. *et al.* Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 588–596 (2006).
471. Cherney, R. J. *et al.* Discovery of disubstituted cyclohexanes as a new class of CC chemokine receptor 2 antagonists. *J. Med. Chem.* **51**, 721–724 (2008).
472. Sabroe, I. *et al.* A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. *J. Biol. Chem.* **275**, 25985–25992 (2000).
473. Horoszewicz, J. S. *et al.* The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog. Clin. Biol. Res.* **37**, 115–132 (1980).
474. Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H. & Paulson, D. F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer* **21**, 274–281 (1978).
475. Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. & Jones, L. W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17**, 16–23 (1979).
476. Thalmann GN. *et al.* Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res.* 1994 May 15;54(10):2577-81.
477. Baley, P. A., Yoshida, K., Qian, W., Sehgal, I. & Thompson, T. C. Progression to androgen insensitivity in a novel in vitro mouse model for prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**, 403–413 (1995).
478. Grasso, C. S. *et al.* The Mutational Landscape of Lethal Castrate Resistant Prostate Cancer. *Nature* **487**, 239–243 (2012).
479. Grasso, C. S. *et al.* Integrative molecular profiling of routine clinical prostate cancer specimens. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **26**, 1110–1118 (2015).
480. Holzbeierlein, J. *et al.* Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am. J. Pathol.* **164**, 217–227 (2004).
481. LaTulippe, E. *et al.* Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res.* **62**, 4499–4506 (2002).
482. Liu, X. *et al.* Systematic dissection of phenotypic, functional, and tumorigenic heterogeneity of human prostate cancer cells. *Oncotarget* **6**, 23959–23986 (2015).
483. Ramaswamy, S. *et al.* Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15149–15154 (2001).
484. Taylor, B. S. *et al.* Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* **18**, 11–22 (2010).
485. Taylor, B. S. *et al.* Functional copy-number alterations in cancer. *PLoS One* **3**, e3179 (2008).
486. Tamura, K. *et al.* Molecular features of hormone-refractory prostate cancer cells by genome-wide gene expression profiles. *Cancer Res.* **67**, 5117–5125 (2007).
487. Liu, W. *et al.* Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nat. Med.* **15**, 559–565 (2009).
488. Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 540–550 (2004).
489. Zhu, X.-H. *et al.* Downregulation of mouse CCR3 by lentiviral shRNA inhibits proliferation and induces apoptosis of mouse eosinophils. *Mol. Med. Rep.* **15**, 696–702 (2017).

490. van Roermund, J. G. H. *et al.* Periprostatic fat correlates with tumour aggressiveness in prostate cancer patients. *BJU Int.* **107**, 1775–1779 (2011).
491. Woo, S., Cho, J. Y., Kim, S. Y. & Kim, S. H. Periprostatic fat thickness on MRI: correlation with Gleason score in prostate cancer. *AJR Am. J. Roentgenol.* **204**, W43-47 (2015).
492. Venkatasubramanian, P. N. *et al.* Periprostatic adipose tissue from obese prostate cancer patients promotes tumor and endothelial cell proliferation: a functional and MR imaging pilot study. *The Prostate* **74**, 326–335 (2014).
493. Zhao, X. *et al.* Transforming growth factor-beta1 upregulates the expression of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) in human breast cancer MCF-7 cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **31**, 347–354 (2010).
494. Kulbe, H., Hagemann, T., Szlosarek, P. W., Balkwill, F. R. & Wilson, J. L. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. *Cancer Res.* **65**, 10355–10362 (2005).
495. Qiuping, Z. *et al.* Selectively increased expression and functions of chemokine receptor CCR9 on CD4+ T cells from patients with T-cell lineage acute lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* **63**, 6469–6477 (2003).
496. Kukreja, P., Abdel-Mageed, A. B., Mondal, D., Liu, K. & Agrawal, K. C. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res.* **65**, 9891–9898 (2005).
497. Sannohe, S. *et al.* Upregulated response to chemokines in oxidative metabolism of eosinophils in asthma and allergic rhinitis. *Eur. Respir. J.* **21**, 925–931 (2003).
498. Chetram, M. A. & Hinton, C. V. ROS-mediated regulation of CXCR4 in cancer. *Front. Biol.* **8**, (2013).
499. Laurent, V. *et al.* Periprostatic Adipose Tissue Favors Prostate Cancer Cell Invasion in an Obesity-Dependent Manner: Role of Oxidative Stress. *Mol. Cancer Res.* **17**(3):821-835 (2019)
500. Keller, E. T. & Chung, L. W. K. *The Biology of Skeletal Metastases*. (Springer Science & Business Media, 2012).
501. Watanabe, K. *et al.* The MET/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)-targeted Tyrosine Kinase Inhibitor Also Attenuates FMS-dependent Osteoclast Differentiation and Bone Destruction Induced by Prostate Cancer. *J. Biol. Chem.* **291**, 20891–20899 (2016).
502. Jeong, H. M., Cho, S. W. & Park, S. I. Osteoblasts Are the Centerpiece of the Metastatic Bone Microenvironment. *Endocrinol. Metab. Seoul Korea* **31**, 485–492 (2016).
503. Muruganandan S. *et al.* Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells. - *Bone Miner Res.* 2010 Feb;25(2):222-34.
504. Gundem, G. *et al.* The Evolutionary History of Lethal Metastatic Prostate Cancer. *Nature* **520**, 353–357 (2015).
505. Willems, L. I. & Ijzerman, A. P. Small molecule antagonists for chemokine CCR3 receptors. *Med. Res. Rev.* **30**, 778–817 (2010).
506. Erin, E. M., Williams, T. J., Barnes, P. J. & Hansel, T. T. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **1**, 201–214 (2002).
507. Kelly, E. *et al.* Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol.* 2008 Mar;153 Suppl 1:S379-88. Epub 2007 Dec 3.
508. Gatti, L. & Zunino, F. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol. Med.* **111**, 127–148 (2005).
509. Azevedo, V. F., Galli, N., Kleinfelder, A., D'Ippolito, J. & Urbano, P. C. M. Etanercept biosimilars. *Rheumatol. Int.* **35**, 197–209 (2015).

Title: Role of adipocytes in local and metastatic dissemination of prostate cancer

ABSTRACT in English:

Prostate is surrounded by periprostatic adipose tissue (PPAT), only separated by a thin layer of collagen called prostatic barrier. Infiltration through PPAT and prostatic barrier crossing by tumor cells are known as major histological and clinical bad prognosis factors. These observations suggest a key role of PPAT (and mainly adipocytes) in prostate cancer development and invasiveness. First, we identified a chemokine secreted by adipocytes (CCL7) and its associated receptor (CCR3) that contribute to local dissemination of prostate cancer cell and lead them to leave the prostate. Thus, using *in vitro* and *in vivo* approach, we showed that the inhibition of CCR3/CCL7 axis decreases local dissemination of prostate cancer with an enhanced effect in obesity context. Moreover, CCR3 expression has been associated to tumor aggressiveness and relapse on patient samples. Beyond local dissemination, bone metastasis is one of the major and deadliest complication of prostate cancer, with only few treatments available. Regarding results obtained in our first work on local dissemination, we focused on medullary adipocytes contained in bone marrow and study whether or not they could chemoattract prostate cancer cells just as PPAT in local dissemination. Using medullary adipocytes samples from patients and *in vivo* approach, we showed that medullary adipocytes expressed a unique phenotype different from PPAT adipocytes and that they secrete high level of CCL7. This chemokine will lead to directed migration of prostate cancer cells towards bone metastatic site through CCR3/CCL7 axis. By inhibiting this axis, we observed a specific inhibition of bone metastases formation both *in vitro* and *in vivo*, highlighting the therapeutic potential of this axis. We confirmed the main impact of CCR3/CCL7 axis in prostate cancer metastases, using clinical meta-analysis and studies on tumors from patients. Finally, we showed that physiopathological modifications of adipocytes, such as obesity and aging, which are both considered as prostate cancer bad prognosis factors, increase the chemoattraction of prostate cancer cells induced by medullary adipocytes secretions. As a conclusion, our results highlight that periprostatic adipocytes and medullary adipocytes can influence prostate cancer progression by secreting chemokines and leading to prostatic barrier crossing and bone metastatic dissemination. These mechanisms are enhanced in obesity and aging context. This allow us to suggest a new molecular mechanisms enhancing cancer aggressiveness. Thus, our work allowed us to identify CCR3/CCL7 axis as a major axis in the dissemination of prostate cancer induced by adipocytes secretions, acting on both local and metastatic level.

Keywords: Prostate cancer, bone metastasis, adipocyte, bone marrow, medullary adipocytes, chemokines, obesity, aging

Titre: Rôle des adipocytes dans la dissémination locale et à distance du cancer de la prostate

RESUME en français

La prostate est entourée de tissu adipeux périprostatique (TAPP), séparée de celui-ci uniquement par une fine barrière de collagène appelée la capsule prostatique. En clinique, l'infiltration du TAPP par des cellules tumorales est l'un des principaux critères histologiques de mauvais pronostic suggérant que le TAPP (en particulier les adipocytes) pourrait être un acteur clé de l'agressivité du cancer de la prostate. Dans un premier temps, nous avons identifié une chimiokine adipocytaire (CCL7) et un de ses récepteur (CCR3) qui contribuent à la dissémination des cellules cancéreuses à l'extérieur de la prostate. En effet, à travers des approches in vitro et in vivo, nous avons montré que l'inhibition de l'axe CCR3/CCL7 diminue la dissémination locale du cancer de la prostate avec un effet plus prononcé en conditions d'obésité. De plus, l'expression de ce récepteur est associée à l'agressivité tumorale et à la rechute chez les patients. Au-delà de la dissémination locale, une des complications du cancer de la prostate les plus graves et les plus dures à traiter reste la dissémination métastatique osseuse. Fort des résultats obtenus dans la première partie de notre travail, nous avons voulu savoir si les adipocytes médullaires présents au niveau du site métastatique osseux étaient capable d'attirer les cellules tumorales par les mêmes mécanismes que le TAPP. En utilisant des échantillons d'adipocytes médullaires issus de patients lors d'approches in vitro, nous avons pu montrer que les adipocytes médullaires présentent un phénotype différent de ceux du TAPP et qu'ils sécrètent la chimiokine CCL7 en quantité bien plus élevée. Cette dernière va ainsi induire la migration des cellules tumorales prostatiques vers le site osseux suivant un axe CCR3/CCL7. En inhibant cet axe, nous avons pu montrer in vivo et in vitro le potentiel de cet axe comme cible thérapeutique, puisqu'il nous a permis d'empêcher spécifiquement la formation de métastases osseuses. Nous avons pu confirmer l'importance de l'axe CCR3/CCL7 dans le cancer de la prostate métastatique par des méta-analyses cliniques et des études sur des tumeurs de patients. Enfin, nous avons pu montrer que les modifications physiopathologiques des adipocytes comme l'obésité et le vieillissement tous deux considérés comme des facteurs de risque du cancer de la prostate, augmentent fortement la migration induite par les adipocytes médullaires. En conclusion, nos résultats montrent que les adipocytes périprostatiques et médullaires sont capables d'influencer la progression du cancer de la prostate en favorisant, via la sécrétion de chimiokines, le franchissement de la capsule prostatique puis la dissémination métastatique osseuse. L'ensemble de ces mécanismes est amplifié en conditions d'obésité ou de vieillissement ce qui permet de proposer de nouveaux mécanismes moléculaires à l'émergence de cancers plus agressifs chez ces patients. Ainsi notre travail a permis d'identifier l'axe CCR3/CCL7 comme un axe majeur dans la dissémination du cancer de la prostate induite par le tissu adipeux, intervenant aussi bien au niveau local qu'au niveau métastatique

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Cancérologie

MOTS-CLES : cancer de la prostate, métastase osseuse, adipocytes, moelle osseuse, adipocytes médullaires, chimiokine, obésité, vieillissement.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale)
205 route de Narbonne
31400 Toulouse

Directeur de thèse (Nom et Prénom): Pr Catherine Muller