

Analyse des mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules de cancer de la prostate in vitro Anh Thu Bui

▶ To cite this version:

Anh Thu Bui. Analyse des mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules de cancer de la prostate in vitro. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS434 . tel-01531827

HAL Id: tel-01531827 https://theses.hal.science/tel-01531827

Submitted on 2 Jun2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





NNT: 2016SACLS434

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 582 Cancérologie : biologie – médecine - santé

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Mme. Anh Thu BUI

Analyse des mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules de cancer de la prostate *in vitro*

Thèse présentée et soutenue à Cachan, le 23 novembre 2016 :

Composition du Jury :

| M. ACLOQUE Hervé | Chargé de recherche, INRA | Président du jury (Examinateur) |
|---------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|
| M. QUESNEL Bruno | Professeur, Inserm | Rapporteur |
| Mme. DI CLEMENTE Nathalie | Directeur de recherche, Université Paris 7 | Rapporteur |
| Mme. PRUNIER Céline | Chargé de recherche, Inserm | Examinatrice |
| M. DAUTRY François | Professeur, ENS Cachan | Examinateur |
| M. TCHENIO Thierry | Chargé de recherche, ENS Cachan | Directeur de thèse |

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, le Pr. Bruno Quesnel, le Dr. Nathalie di Clemente, le Dr. Céline Prunier, le Dr. Hervé Acloque qui ont tous généreusement accepté d'évaluer ce travail. J'exprime en particulier mes vifs remerciements au Pr. Bruno Quesnel et Dr. Nathalie di Clemente pour leurs commentaires pertinents sur mon manuscrit de thèse.

Je voudrais exprimer mes plus profonds remerciements et ma vive gratitude à mon directeur de thèse, Dr. Thierry Tchénio. Avec une énorme patience, il m'a encadré et m'a appris beaucoup de choses sur la biologie et le plus important sur la façon de penser. Il m'a guidé et m'encouragé dès le début de mon stage de Master 2 jusqu'aujourd'hui. Sans son aide, je n'aurais pas pu ni commencer ma thèse ni arriver à la fin de ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements et ma reconnaissance à Maryline Harvard qui travaille avec moi dès mon arrivée au laboratoire. Elle m'a toujours accompagné au niveau du travail et m'a apporté un grand soutien moral. C'est avec elle que j'ai passé mes plus beaux moments durant mes années en France.

J'adresse mes sincères remerciements, ma gratitude et mon grand respect au Pr. François Dautry qui m'a donné la chance de travailler avec Thierry et Maryline. Ses conseils, son aide et son soutien sont très importants pour mon travail.

Je tiens à remercier Dr. Fanny Laurent-Tchénio pour son aide et son amitié.

Je voudrais remercier Dr. Meng-Er Huang qui nous a beaucoup aidés dans notre travail.

Mes grands remerciements s'adressent aux personnels du laboratoire, en particulier à Dr. Olivier Delelis, Dr. Stéphanie Bury-Moné; à mes collègues et à mes amis Ilham Ladid, Martine Lefort, Stanislas Denoeux et Syham Bibi.

Finalement, je remercie ma famille et Thao Nhi Nguyen Vu qui me soutiennent et me motivent depuis toujours.

SOMMAIRE

| 1 | . INTRODUCTION | .1 |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| | 1.1. Le phénomène de dormance cellulaire | . 1 |
| | 1.1.1. Rappel sur les phases G0/G1 du cycle cellulaire | 1 |
| | 1.1.2. Rappel sur la dormance des cellules souches adultes | 3 |
| | 1.1.2.1. Phénomène de dormance des cellules souches adultes | 3 |
| | 1.1.2.2. Mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules souches adultes | 5 |
| | 1.1.2.2.1. Régulateurs du cycle cellulaire (Rb, CDKIs Cip/Kip et p53) | . 5 |
| | 1.1.2.2.2. Dérivés oxygénés réactifs (ROS) et voies de signalisations afférentes | . 6 |
| | 1.1.2.2.3. Voie de signalisation de TGF-в/ВМР | . 8 |
| | 1.1.2.2.4. Autres voies de signalisation | 11 |
| | 1.1.3. Dormance des cellules cancéreuses disséminées | 12 |
| | 1.1.3.1. Observations in vivo du phénomène de dormance des cellules cancéreuses disséminées | 12 |
| | 1.1.3.2. Modèles de dormance des cellules cancéreuses en culture cellulaire | 14 |
| | 1.1.3.2.1. Modèles de dormance des cellules de cancer du sein en culture tridimensionnelle | 15 |
| | 1.1.3.2.2. Modèle de dormance de cellules cancéreuses cultivées sur boîte plastique | 16 |
| | 1.1.3.3. Mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules cancéreuses disséminées | 16 |
| | 1.1.3.3.1. Voie de signalisation de p38 et de ERK | 16 |
| | 1.1.3.3.2. Voie de signalisation de TGF-в/ВМР | 18 |
| | 1.1.3.3.3. Autres voies de signalisation | 20 |
| | 1.1.3.3.1. Intégrines | 20 |
| | 1.1.3.3.2. GAS6-Axl | 21 |
| | 1.1.3.3.3. Divers | 21 |
| | 1.1.3.3.4. Conclusion relative aux mécanismes de dormance des cellules cancéreuses | 22 |
| | 1.1.3.4. Implications thérapeutiques du phénomène de dormance cellulaire des DTCs | 22 |
| | 1.2. Dormance des petites masses tumorales et évaluation de son importance | 24 |
| | 1.2.1. Dormance de petites masses tumorales liée à une angiogenèse insuffisante | 24 |
| | 1.2.2. Dormance tumorale liée à un phénomène d'immuno-surveillance | 25 |
| | 1.2.3. Importance du phénomène de dormance affectant des masses tumorales | 26 |
| | 1.3. Androgènes, récepteur aux androgènes et cancer de la prostate | 28 |

| | 1 2 1 La signalisation par la réconteur aux androgènes 28 |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | 1.3.2. Rôle des androgènes dans le développement normal de la prostate |
| | 1.3.3. La voie de signalisation AR dans le cancer de la prostate |
| | 1.3.4. Le rôle suppresseur de tumeur des androgènes |
| : | 1.4. Sujet du travail de thèse : Analyse des mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules de cancer de la prostate à partir d'un modèle en culture cellulaire sur boîte de plastique |
| : | 1.4.1. Description du modèle de dormance utilisé dans mon travail de thèse |
| | 1.4.1.1. Mode d'induction de la dormance en culture cellulaire |
| | 1.4.1.2. Mécanismes caractérisés |
| | 1.4.2. Sujet du travail de thèse |
| 2. | RESULTATS |
| : | 2.1. Article 1 : SMAD signaling and redox imbalance cooperate to induce prostate cancer cell dormancy |
| : | 2.2. Article 2 : Transient exposure to androgens induces a remarkable self-sustained quiescent state in dispersed prostate cancer cells |
| 3. | DISCUSSION |
| 1 | 3.1. Synthèse des mécanismes de mise en place du phénomène de dormance 113 |
| : | 3.1.1. Distinction d'une phase d'induction et d'une phase de maintenance de l'état dormant113 |
| : | 3.1.2. Convergence des mécanismes d'induction vers un même état final de dormance impliquant les voies de signalisation activées par les facteurs de la famille du TGF-β/BMP et un déséquilibre redox de la cellule |
| | 3.1.3. Rôle de la densité cellulaire dans l'établissement de la dormance |
| : | 3.2. Possibles implications du stress oxydatif dans les phénomènes de dormance <i>in vivo</i> des cellules cancéreuses |
| : | 3.2.1. Implication de la voie de signalisation p38 MAPK117 |
| 3 | 3.2.2. Sites préférentiels de formation de métastases118 |
| | 3.2.3 Conditions inductrices de dormance pour les Cellules Tumorales Circulantes119 |
| : | 3.3. Relation entre le phénomène de dormance et le phénomène de sénescence prématurée 120 |
| 1 | 3.4. Développements possibles de ce travail 121 |
| : | 3.4.1. Approfondissement de l'analyse des mécanismes régulant la dormance cellulaire121 |

| cancéreuses disséminées | .123 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.4.3. Test de la capacité des androgènes à induire une dormance <i>in vivo</i> sur des cellules | |
| 3.4.2. Test de la dormance des cellules cancéreuses circulantes | .122 |
| 3.4.1.3. Analyse des relations entre dormance et sénescence | . 122 |
| 3.4.1.2. Induction d'un phénomène de dormance à moyenne densité cellulaire | . 121 |
| 3.4.1.1. Analyse du rôle de la voie p38 dans la dormance | . 121 |

1. INTRODUCTION

1.1. Le phénomène de dormance cellulaire

1.1.1. Rappel sur les phases G0/G1 du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire mitotique est le processus permettant à une cellule de se diviser en deux cellules filles génétiquement identiques. Dans le cas des cellules de mammifère, on le décompose entre quatre phases qui s'enchaînent dans un ordre déterminé : G1, S, G2, M (Viallard et al., 2001). Chaque phase ne peut commencer que si la phase précédente a été achevée. La phase G1 comprend des phénomènes mal compris comprenant en particulier une réorganisation de la chromatine après la mitose et vraisemblablement une préparation au cycle suivant de duplication de la cellule. Notons que cette phase peut être très courte dans des cellules se divisant rapidement comme les cellules souches embryonnaires (White and Dalton, 2005). Le démarrage et la fin de la phase de réplication de ADN chromosomique définit la phase S. Celleci est suivie de la phase G2 qui comprend les préparations nécessaires au déroulement de la mitose qui constitue la phase M. Le déroulement des phases dans un ordre bien déterminé semble coordonné de manière importante par des kinases dépendantes de cyclines (CDK) (Cobrinik, 2005; Sherr and Roberts, 2004). Chaque étape du cycle cellulaire est en effet normalement régulée par différents complexes contenant chacun une cycline activatrice liée à CDK de manière bien déterminée. Ainsi, lors de la phase G1, on définit un point de restriction (R) qui représente une étape après laquelle le passage en phase S devient indépendant des facteurs mitogéniques appliqués à la cellule. Cette transition corrèle avec le niveau de phosphorylation des protéines de la famile pRb (Cobrinik, 2005; Sherr and Roberts, 2004). Durant la phase G1, les cyclines de type D dont l'expression est régulée par les mitogènes, se lient aux kinases CDK4/6 et les activent, ce qui conduit à une phosphorylation des protéines de la famille pRb par ces kinases. La phosphorylation des protéines atténue leur action inhibitrice sur les facteurs de transcription de la famille E2F qui contrôlent la transcription des gènes nécessaires pour la transition G1/S, dont la cycline E. La formation de complexe cycline E-CDK2 conduit à une hyperphosphorylation des protéines de la famille pRb, ce qui amplifie tout à la fois la production de cycline E selon une boucle de régulation positive et la transcription des gènes nécessaires à la phase S. La mise en place de cette boucle de régulation positive semble coïncider avec le point de restriction R. Il est à noter que les CDKs sont régulées négativement par des CDKI (Cyclin Dependent Kinase

Inhibitor) qui bloquent la liaison entre la cycline avec sa partenaire CDK ou inhibent l'activité kinases des complexes CDK-cycline et donc empêchent la progression à travers du cycle cellulaire (Viallard et al., 2001).

Les cellules peuvent sortir du cycle de division cellulaire et demeurer dans un état nonprolifératif, appelé état G0, pendant des durées de temps très importantes. Historiquement, cet état G0 a été défini pour les cellules en différenciation terminale telles que les neurones ou les cardiomyocytes qui sont entrés dans un état non-prolifératif irréversible. Mais ce concept de phase G0 a été étendu à un autre type d'état non-prolifératif qui est réversible et qu'on appelle état quiescent (Cheung and Rando, 2013; Coller, 2011; Yao, 2014). La quiescence cellulaire peut être induite *in vitro* par des conditions non permissives pour la prolifération (manque de nutriments, inhibition de contact ou perte d'adhésion des cellules à un substrat). In vivo, le phénomène de quiescence (dormance) concerne essentiellement les cellules souches normales de l'organisme qui prolifèrent très rarement et les cellules cancéreuses. Il est important de noter que dans tous les modèles de quiescence en culture cellulaire, les cellules se remettent spontanément à proliférer lorsque les conditions redeviennent permissives pour la prolifération. Des travaux, menés essentiellement sur des cellules fibroblastiques en culture, ont tenté de caractériser des différences entre les phases G0 et G1. Ainsi, les fibroblastes quiescents (en phase G0) présentent une taille plus réduite avec une réduction de la synthèse des ARN (principalement ribosomiques) et des protéines (Pardee, 1989). Elles requièrent plus de temps pour rentrer en phase S par comparaison avec des cellules déjà en phase G1 (Coller, 2007; Pardee, 1989; Zetterberg and Larsson, 1985). Plusieurs études suggèrent que les protéines de la famille Rb régulent activement l'entrée et la maintenance en phase G0 notamment à travers la formation de complexes DREAM comprenant la protéine p130 ou p107 (de la famille Rb), le complexe E2F4-DP ou E2F5-DP et le complexe MuvB (Sadasivam and DeCaprio, 2013). Ce complexe DREAM se lie aux promoteurs de gènes dont le niveau de transcription change au cours du cycle cellulaire et réprime leur activité. L'inactivation de certains composants de ce complexe peut déstabiliser la phase G0 et raccourcir le temps de transition vers la phase S. La stabilité de ce complexe est régulée par la phosphorylation de p130 par les CDKs, la phosphorylation conduisant à la dissociation de p130 du complexe DREAM. D'ailleurs, la transition de la G0 à G1 a été associée à une dégradation du CDKI p27 (Oki et al., 2014). Plus globalement, il apparaît que les fibroblastes quiescentes ont un profil d'expression génétique spécifique qui diffère de cellules en

phase G1 avec l'induction de gènes impliqués dans le blocage de la prolifération mais aussi d'autres processus cellulaires tels que la différenciation cellulaire (Coller et al., 2006).



Figure 1 : Schéma du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire comprend quatre phases : G1, S, G2, M. La cellule peut sortir du cycle cellulaire après la phase M ou avant le point de restriction R et rentre dans un état non prolifératif, dit état G0. Cet état non prolifératif peut être réversible (quiescent) ou irréversible.

1.1.2. Rappel sur la dormance des cellules souches adultes

1.1.2.1. Phénomène de dormance des cellules souches adultes

Les cellules souches adultes sont des rares cellules dans l'organisme qui sont capables à générer l'ensemble de différentes lignées cellulaires d'un tissu. Elles se caractérisent par leur capacité à s'auto-renouveler et à différencier. Des premières cellules souches adultes identifiées et puis isolées à partir de l'organisme sont des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) (Weissman et al., 2001). La population des HSCs s'organise selon une hiérarchie en fonction de leur capacité d'auto-renouvellement : les LT-HSCs (Long term-HSCs) donnent naissance aux ST-HSCs (Short term-HSCs), celles-ci à leur tour générant des progéniteurs (Orford and Scadden, 2008). La caractérisation de ces cellules a permis de montrer que la plupart des HSCs (90-95%) est dans un état quiescent (en phase G0/G1 du cycle cellulaire) (Cheshier et al., 1999; Goodell et al., 1996; Kiel et al., 2005; Morrison and Weissman, 1994). En particulier, les LT-HSCs sont des cellules quiescentes qui se divisent très rarement, environ tous les 145 jours (soit 5 divisions au cours de la vie d'une souris) (Foudi et al., 2009; Wilson et al., 2008). De manière intéressante, il a été trouvé une forte corrélation entre l'état dormant des HSCs avec leur capacité d'auto-renouvellement (Foudi et al., 2009; Passegue et al., 2005; Wilson et al., 2008; Wilson et al., 2009). En effet, la fraction des cellules quiescentes est plus enrichie dans la population des LT-HSCs en comparant avec celle des ST-HSCs ou des progéniteurs. A l'inverse, les cellules

dormantes présentent un potentiel de reconstitution à long terme plus élevé en comparant à celles non-dormantes. Par ailleurs, il a été démontré dans de nombreuses études in vivo que la perturbation de la quiescence des HSCs souvent altère leur capacité d'auto-renouvellement (Cheng et al., 2000b; Matsumoto et al., 2011; Pietras et al., 2011; Rossi et al., 2012; Tothova et al., 2007; Tsai et al., 2013; Viatour et al., 2008). Dans ces études, une perte de quiescence liée à une prolifération excessive conduit généralement à une exhaustion du stock des cellules souches. Ainsi, il a été établi que la maintenance des HSCs dans un état quiescent est nécessaire pour préserver à long terme leur capacité d'auto-renouvellement (Orford and Scadden, 2008). Cela suggère que le phénomène de dormance est essentiel à la maintenance des HSCs. L'entrée en quiescence limite des dommages provoqués lors du processus de réplication et permet donc de protéger leur intégrité génomique au cours du temps (Nakamura-Ishizu et al., 2014). D'autre part, il a été établi que l'état dormant constitue un état résistant au stress, possiblement lié à un métabolisme spécifique limitant la production des radicaux libres (Cheung and Rando, 2013; Ito and Suda, 2014). Il a été également trouvé que les HSCs dormantes peuvent être rapidement mobilisées et remises en prolifération en réponse aux différents stress et puis retournent en quiescence une fois que l'homéostasie est établie (Brenet et al., 2013; Passegue et al., 2005; Takizawa et al., 2011; Wilson et al., 2009). Ainsi, le phénomène de dormance cellulaire a un rôle important dans la maintenance de l'activité fonctionnelle des cellules souches hématopoïétiques.

Le phénomène de dormance observé dans les cellules souches hématopoïétiques a mené à l'hypothèse selon laquelle, une caractéristique essentielle des cellules souches de l'organisme est une fréquence très basse de division cellulaire associée à un état dormant. Ainsi, plusieurs études ont été lancées dans le but d'identifier des cellules dormantes dans différents organes (Bickenbach, 1981; Cotsarelis et al., 1990; Teng et al., 2007; Terskikh et al., 2012; Tumbar et al., 2004). L'identification des cellules dormantes a été réalisée grâce aux essais de rétention de marquage (Nakamura-Ishizu et al., 2014). Dans ces tests, il y a une période de marquage des cellules proliférantes et une période de chasse. Le marquage le plus utilisé est BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine), un analogue de l'ADN qui est incorporé dans la cellule au cours de la phase S. Une cellule qui prolifère fréquemment va perdre le marquage au cours de la période de chasse tandis que celle qui reste en quiescence au cours de la période de chasse va retenir le marquage. Il a été ainsi identifié dans différents tissus des cellules dormantes dont il a ensuite été montré qu'elles possèdent la propriété multipotente de cellule souche (Li and Clevers, 2010). Comme les

HSCs, ce sont des cellules rares qui se trouvent dans des niches bien définies et qui permettent la régénération du tissu dont elles proviennent. Actuellement, l'existence des cellules souches quiescentes a été démontrée en particulier dans le muscle (Fukada et al., 2013), la peau (Terskikh et al., 2012), le follicule pileux (Cotsarelis, 2006), l'intestin (Buczacki et al., 2013) et le cerveau (Codega et al., 2014). Dans la plupart de cas, les cellules souches dormantes ne sont activées qu'en fonction des besoins (Cheung and Rando, 2013; Richmond et al., 2016; Terskikh et al., 2012).

1.1.2.2. Mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules souches adultes

La dormance de cellules souches adultes est à la fois régulée par des mécanismes intrinsèques et par des facteurs extrinsèques. Ces mécanismes convergent dans la cellule en contrôlant un réseau de signalisation spécifique. Je vous présente dans cette partie les principaux régulateurs de la dormance des cellules souches adultes, comprenant les principaux régulateurs du cycle cellulaire ainsi que certaines des voies de signalisation qui sont impliqués.

1.1.2.2.1. Régulateurs du cycle cellulaire (Rb, CDKIs Cip/Kip et p53)

La famille Rb (incluant pRb, p107 et p130) joue un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire et elle a été récemment impliquée dans la maintenance de la quiescence des cellules souches. L'inhibition simultanée de ses trois membres induit une perte de quiescence des HSCs, corrélée avec une perte de capacité d'auto-renouvellement et provoque des anomalies sévères de l'hématopoïèse (Viatour et al., 2008).

Les CDKIs de la famille Cip/Kip (p21, p27, p57) représentent un autre groupe de régulateurs du cycle cellulaire. p21 (CDKN1A) est le premier membre de la famille CDKI Cip/Kip qui a été impliqué dans la régulation de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques et des cellules souches neurales (NSCs) (Cheng et al., 2000b; Kippin et al., 2005). Dans ces études, l'invalidation de CDKN1A conduit à une exhaustion des cellules souches qui est associée à une diminution de leur quiescence. Mais des données récentes ont suggéré que le rôle de p21 ne semble en fait essentiel que dans les conditions de stress comme celles involontairement induites lors d'expérimentations animales (van Os et al., 2007). p57 (CDKN1C) est le CDKI le plus exprimé dans les HSCs, en particulier dans les LT-HSCs (Passegue et al., 2005). Il a été trouvé que p57 joue un rôle dominant dans la maintenance de la quiescence des HSCs (Matsumoto et al., 2011). L'inhibition de p57 réduit la fraction des cellules

quiescentes dans les HSCs et compromet leur capacité d'auto-renouvellement. Ces déficiences causées par l'inhibition de p57 peuvent être compensées par l'activation de p27 (CDKN1B), un CDKI qui est aussi impliqué dans la quiescence des progéniteurs (Cheng et al., 2000a). Il semble que p27 et p57 coopèrent pour maintenir la quiescence des HSCs en contrôlant la localisation nucléaire du complexe Hsc70/Cyclin D1 (Zou et al., 2011).

p53 est un régulateur crucial contrôlant de nombreux processus cellulaires en réponse aux différents stress. Récemment, il a été montré son rôle important dans la maintenance de la quiescence des cellules souches. En absence de p53, la quiescence des HSCs est fortement altérée (Liu et al., 2009). Par ailleurs, il semble que le facteur MEF/ELF4 module l'expression de p53 pour lever la dormance des HSCs (Lacorazza et al., 2006; Liu et al., 2009). En outre, Gfi-1 et Necdin, deux cibles directement activées par p53, sont aussi impliquées dans la quiescence des HSCs (Hock et al., 2004; Liu et al., 2009).

1.1.2.2.2. Dérivés oxygénés réactifs (ROS) et voies de signalisations afférentes

L'implication de ROS dans la régulation de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques a été récemment démontrée par nombreuses études. Jang et al. ont trouvé une corrélation entre un bas niveau de ROS intracellulaire avec l'état quiescent (Jang and Sharkis, 2007). Dans cette étude, la fraction des HSCs caractérisée par un bas niveau de ROS présente des attributs des LT-HSCs et contient plus de cellules quiescentes que la fraction des HSCs ayant un niveau plus élevé de ROS. Il a été aussi trouvé qu'un niveau élevé de ROS corrèle à un faible potentiel d'auto-renouvellement in vitro et in vivo. La déficience de la capacité d'autorenouvellement des cellules HSCs présentant un niveau de ROS élevé peut être corrigée in vitro par un traitement avec l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) ou avec l'inhibiteur de la voie p38 MAPK ou de mTOR (Jang and Sharkis, 2007). De manière intéressant, il a été observé dans d'autres études in vivo que la perturbation de la quiescence des HSCs est fortement corrélée à une augmentation du niveau de ROS intracellulaires. L'inhibition de facteurs de transcription de la famille FoxO (FoxO1/3/4) dans les HSCs induit une diminution de leur fraction quiescente, une augmentation aberrante du niveau de ROS et des anomalies hématopoïétiques (Tothova et al., 2007). L'administration de NAC dans les souris déficientes en FoXO permet de rétablir la quiescence dans les HSCs et de corriger les autres anomalies. Des observations similaires ont été trouvées dans le cas des HSCs dans lesquelles ATM a été invalidé (Ito et al., 2004; Maryanovich et al., 2012). Dans ces études, il a été montré que ATM régule la quiescence et la capacité

d'auto-renouvellement des HSCs en contrôlant le niveau intracellulaire de ROS. Par ailleurs, il a été trouvé que TSC1, un régulateur négatif de mTORC1, maintient la quiescence et la fonction des HSCs en réprimant la biogénèse mitochondriale – la principale source de la génération de ROS (Chen et al., 2008). Il est à noter que PML, un autre répresseur de l'activité de mTORC1, est aussi impliquée dans la maintenance de la quiescence des HSCs (Ito et al., 2008). Un traitement avec la rapamycine (un inhibiteur de mTORC1) permet de corriger des défauts fonctionnels causés par la délétion de TSC1 ou de PML dans les HSCs. A l'inverse des précédentes observations où une augmentation du niveau de ROS intracellulaire est liée à une perte de quiescence, dans le cas des HSCs déficitaires en AKT1/2, une diminution du niveau de ROS en parallèle avec une quiescence trop stable a été observée (Juntilla et al., 2010). Un renforcement du niveau de ROS par un traitement avec un inhibiteur de la synthèse du glutathion (Buthionine Sulfoximine) permet à corriger des problèmes de différenciation qui sont probablement liés à cette quiescence aberrante. Il est à noter que AKT est un régulateur en amont de mTOR et de FoxO et que ATM pourrait être un effecteur en aval régulé par FoXO (Bigarella et al., 2014; Juntilla et al., 2010; Tothova et al., 2007). Enfin, il a été montré que les ROS régulent la quiescence des HSCs en activant la voie des p38 MAPKs (Ito et al., 2006). L'inhibition de ces voies p38 MAPKs permet de corriger des défauts fonctionnels induits par une augmentation de ROS. L'ensemble de ces observations montre que les cellules souches hématopoïétiques doivent maintenir un bas niveau de ROS intracellulaire pour assurer leur quiescence.

A côté de ces mécanismes intracellulaires, le microenvironnement des HSCs pourrait participer au contrôle du niveau de ROS. Il semble que les HSCs quiescentes résident dans une niche hypoxique, ce qui vraisemblablement limite la génération de ROS (Jang and Sharkis, 2007; Kubota et al., 2008; Parmar et al., 2007; Suda et al., 2011). HIF-1 α , un facteur de transcription qui est stabilisé par des conditions hypoxiques, a été trouvé fortement exprimé dans les LT-HSCs (Simsek et al., 2010; Takubo et al., 2010). En fait, HIF-1 α est requis pour la maintenance de la quiescence des HSCs (Takubo et al., 2010). Or, HIF-1 α promeut un métabolisme glycolytique et restreint ainsi l'activité pro-oxydante de la mitochondrie (Simsek et al., 2010; Takubo et al., 2013). Ainsi, une action au niveau métabolique médiée par HIF-1 α représente un autre moyen des cellules souches pour minimiser le niveau de ROS intracellulaire. Cela semble confirmé par l'observation récente que les HSCs doivent limiter la respiration mitochondriale pour rester en quiescence et pour maintenir leur capacité d'auto-renouvellement (Ito and Suda, 2014; Takubo et al., 2013; Yu et al., 2013). L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de ROS dans la régulation de la dormance des cellules souches. Le niveau de ROS intracellulaire pourrait constituer un rhéostat régulant l'état prolifératif ou quiescent des cellules souches normales (Ito and Suda, 2014). Par ailleurs, la maintenance d'un bas niveau de ROS intracellulaire dans les cellules souches quiescentes limite probablement le stress oxydatif et favorise donc l'intégrité de ces cellules au cours du temps. Il est aussi à noter que des voies contrôlant la quiescence mentionnées ci-dessus (tel que FoXO, ATM et HIF-1 α) sont impliquées dans des systèmes de défense cellulaire face à différents stress (Greer and Brunet, 2005; Suda et al., 2011). Il est donc possible que l'entrée en dormance soit un mécanisme activée par les cellules souches pour leur protection.

1.1.2.2.3. Voie de signalisation de TGF- β /BMP

Les voies de signalisation par les cytokines de la famille TGF- β constituent un réseau complexe contrôlant nombreux processus cellulaires, dont la dormance des cellules souches. La cascade de signalisation activée par ces cytokines qui est la mieux caractérisée est celle médiée par les protéines SMAD (Figure 2). Suite à la fixation du ligand à ses récepteurs transmembranaires, des protéines R-SMAD (SMAD activable) sont activées par phosphorylation. Les R-SMAD phosphorylées s'associent avec la protéine SMAD4 et sont transloquées dans le noyau où ces complexes se fixent directement à l'ADN ou s'associent à d'autres régulateurs transcriptionnels pour réguler l'expression de nombreux gènes. R-SMAD2/3 sont activées par les cytokines de la sous-famille du TGF- β , incluant le TGF- β , l'Activine et Nodal tandis que R-SMAD1/5/8 sont des médiateurs en aval activées par les facteurs de la sous-famille des BMP (Bone Morphogenetic protein).



Figure 2 : Représentation schématique de la voie de signalisation de TGF-β/SMAD (Blank and Karlsson, 2011)

En 2009, Yamazaki et al. ont montré que le TGF- β est un inducteur de la dormance des HSCs *ex vivo* (Yamazaki et al., 2009). Plus tard, cette équipe a démontré le rôle de la voie TGF- β /SMAD dans la régulation de la quiescence des HSCs *in vivo* (Yamazaki et al., 2011). En effet, la délétion du récepteur de type II au TGF- β (Tgtbr2) dans les HSCs conduit à un échappement de la quiescence des HSCs associé avec une perte de capacité de reconstitution à long terme. Une diminution du niveau de phosphorylation de SMAD2/3 a également observée dans les HSCs déficitaires de Tgfbr2. D'autre part, ils ont montré qu'une chute du niveau de TGF- β 1 dans la moelle osseuse causée par la dénervation du système sympathique perturbe la quiescence des HSCs. A part l'activation de la voie SMAD, la dormance induite par TGF- β implique aussi l'induction de p57 et la régulation de la voie PI3K-Akt-FoxO (Yamazaki et al., 2009). Ces deux facteurs ont également impliqués dans la dormance des HSCs (Juntilla et al., 2010; Matsumoto et al., 2011; Tothova et al., 2007). Par ailleurs, l'implication de la voie TGF- β dans la régulation de la quiescence des HSCs a été confirmée par d'autres études. Zhao et al. ont mis en évidence que

dans les conditions homéostatiques, les mégacaryocytes maintiennent les HSCs en quiescence en activant la voie TGF- β /SMAD (Zhao et al., 2014). Une autre équipe a démontré le rôle de cette voie dans le phénomène de réentrée des HSCs en quiescence (Brenet et al., 2013). Après l'exposition à certaines conditions de stress (exposition au 5-Fluorouracil ou à la phénylhydrazine), des HSCs sont induites à proliférer puis retournent en dormance. Un blocage transitoire de la voie TGF- β par un inhibiteur du récepteur de type I au TGF- β ou par un anticorps spécifique lors de la période de récupération permet de retarder la rentrée en quiescence des HSCs et d'accélérer la reconstitution hématopoïétique.

Une sous-famille de la famille du TGF-β est constituée des cytokines BMP. Elles sont impliquées dans la quiescence des cellules souches du follicule pileux (HFSCs). En effet, durant la phase de repos (phase télogène), les HFSCs sont maintenues en quiescence par les protéines BMP sécrétées par d'autres types cellulaires du microenvironnement (Hsu et al., 2011; Plikus et al., 2008). L'activation de la voie BMP dans les HFSCs quiescentes est corroborée par la phosphorylation de SMAD1/5/8, qui est fortement diminuée lorsque ces cellules sortent de quiescence (Zhang et al., 2006b). L'inhibition de la voie BMP durant la phase télogène via l'ablation du gène Bmpr1a (codant pour le récepteur BMPR-IA) conduit à une activation des HFSCs quiescentes (Kobielak et al., 2007). Par ailleurs, l'inactivation de cette voie par Noggin, un antagoniste de BMP donne des résultats similaires avec une expansion du stock des HFSCs. Dans ces études, il a été montré que la voie BMP active la phosphatase PTEN, ce qui conduit à une déstabilisation de la β-caténine et ainsi à une inhibition de la voie Wnt/β-caténine impliquée dans la prolifération des HFSCs. PTEN est un régulateur négatif de la voie PI3K/Akt qui inhibe la dégradation de β-caténine. Il est à noter que PTEN est aussi impliquée dans le contrôle de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques et des cellules souches neurales (Groszer et al., 2006; Zhang et al., 2006a). Par ailleurs, il a été montré que la voie BMP active l'expression du facteur de transcription NFATc1. Celui-ci réprime l'expression de Cdk4 lors de l'induction de la dormance (Horsley et al., 2008). De manière intéressante, il a été trouvé que TGF- β 2 stimule la prolifération des HFSCs en inhibant l'activation des voies dépendantes des BMP (Oshimori and Fuchs, 2012). Cet effet antagoniste du TGF-β2 ne semble pas impliquer SMAD4 (le SMAD co-activateur utilisé à la fois par la voie TGF-β et par la voie BMP). Il a été montré que Tmeff1, directement activé par TGF-\u00df2, est le facteur qui restreint l'activité de la voie BMP. Un rôle de la voie BMP/SMAD a été aussi démontré dans la régulation de la quiescence des cellules

souches neurales (NSCs) qui résident dans l'hippocampe (Mira et al., 2010). Dans cette étude, il a été observé que la voie BMP est activée dans les NSCs quiescentes mais reste inactive dans des cellules souches en division cellulaire. L'inactivation de cette voie par noggin, par l'ablation du Bmpr1a ou par l'inhibition du SMAD4 entraine une sur-prolifération dans les NSCs. En conclusion, il parait que la voie de TGF- β /BMP est une voie de signalisation utilisée par de différents types des cellules souches pour réguler leur dormance.

1.1.2.2.4. Autres voies de signalisation

La voie Wnt semble réguler la quiescence des cellules souches de manière dépendante du type cellulaire. Si dans les cellules souches du follicule pileux, l'activation de la voie Wnt/βcaténine promeut la prolifération, cette voie a un effet inverse dans le cas des cellules souches hématopoïétiques. En effet, Fleming et al. ont trouvé que l'activation de la voie Wnt médiée par la niche ostéoblastique est nécessaire pour maintenir l'état quiescent de HSCs (Fleming et al., 2008). Dans cette étude, une surexpression de Dkk1 (DKK1, un antagoniste de la voie Wnt/βcaténine) dans les ostéoblastes induit une inhibition de l'activité de la voie Wnt dans les HSCs. Cette inhibition entraine une levée de dormance dans les HSCs associée avec une réduction de l'expression de p21. Comme dans la plupart des cas, cette quiescence perturbée est liée à une diminution de la capacité de reconstitution des HSCs. De manière plus générale, il est à noter que les ostéoblastes sont impliqués dans la régulation de la quiescence des HSCs par une série de facteurs. En effet, il a été trouvé que des facteurs sécrétées par ces cellules tels que Angiopoiétine 1 ou la thrompoiétine promeuvent l'interaction entre les HSCs (Arai et al., 2004; Yoshihara et al., 2007).

Une autre voie de signalisation impliquée dans la régulation de la quiescence des cellules souches est la voie Hedgehog (Hh). Celle-ci exerce un effet inhibiteur sur la quiescence des cellules souches hématopoïétiques. En effet, une activation constitutive de la voie Hh dans les conditions normales ou de stress induit une expansion des HSCs due par une augmentation de prolifération (Trowbridge et al., 2006). Mais cette activation, si elle est maintenue artificiellement, conduit à une exhaustion des HSCs. Un traitement *in vivo* avec la cyclopamine (un inhibiteur de la voie Hh) permet corriger cet effet. Dans une autre étude *in vivo*, il a été trouvé que l'inhibition de cette voie via l'invalidation homozygote de Gli1 (un facteur de transcription situé en aval dans la cascade de signalisation activée par Hh) augmente la fraction

des cellules quiescentes dans les LT-HSCs et dans les progéniteurs (Merchant et al., 2010). Cette quiescence renforcée est associée avec une réduction de l'expression de Cyclin D1 dans les cellules Gli1^{null}.

1.1.3. Dormance des cellules cancéreuses disséminées

1.1.3.1. Observations in vivo du phénomène de dormance des cellules cancéreuses disséminées

Une métastase est le résultat de la prolifération clonale d'une cellule tumorale unique qui a été disséminée à partir d'une tumeur par voie sanguine ou lymphatique dans un organe distant. Le développement de métastases constitue une des principales causes de décès par cancer. Aussi, comprendre le processus métastasique s'avère crucial pour pouvoir développer des méthodes efficaces pour lutter contre le cancer. Le processus métastasique est le sujet de très nombreuses recherches. Des études dans les modèles animaux au début des années 2000 ont révélé qu'un phénomène de dormance cellulaire dans les cellules cancéreuses disséminées (DTCs) dans différents organes pouvait limiter considérablement le développement des métastases. La première mise en évidence de ce phénomène a été faite avec l'étude de Luzzi et al. en 1998. Dans cette étude, ils ont suivi le devenir des cellules de mélanomes B16F1 injectées dans la veine mésentérique de la souris. Ils ont trouvé qu'après l'extravasation dans le parenchyme du foie, la plupart des cellules cancéreuses qui survivent rentrent dans un état quiescent. Dans cette étude, seulement 2% des cellules cancéreuses détectées ont proliféré pour former des micrométastases et 1% de ces micro-métastases se sont développés en macro-métastases (Luzzi et al., 1998). Plus d'un tiers de cellules de mélanome injectées au début persistaient dans le foie sous forme des cellules solitaires quiescentes, caractérisées par un marquage négatif avec un marqueur de prolifération ou d'apoptose. Ces observations ont été étendues à d'autres modèles cellulaires (Cameron et al., 2000; Naumov et al., 2001; Naumov et al., 2002; Naumov et al., 2003). Ainsi, un phénomène similaire a pu être observé dans des cellules de cancer du sein de manière corrélée au potentiel métastatique des lignées cellulaires (D2.0R et D2A1). Les cellules D2.0R, qui sont peu métastasiques, pouvaient persister dans l'organisme dans un état quiescent pendant une longue période (jusqu'à 11 semaines après l'injection). Au moins une fraction des cellules D2.0R quiescentes récupérées à partir du foie des souris injectées étaient capables de proliférer in vitro et à former de novo une tumeur quand elles étaient injectées dans le coussin adipeux mammaire de la souris (Naumov et al., 2002). La pertinence de ce phénomène de dormance a été confirmée par d'autres études *in vivo* (Goodison et al., 2003; Heyn et al., 2006; Logan et al., 2008; Suzuki et al., 2006; Townson et al., 2009). De ces différentes études ressortent trois points importants. Tout d'abord, ce phénomène est observé avec des différentes lignées cellulaires et dans des différents organes et implique une fraction importante et parfois la quasi-totalité des cellules cancéreuses disséminées survivantes. Par ailleurs, ces cellules dormantes peuvent survivre pendant des temps importants (plus de 6 mois après l'excision de la tumeur primaire, ce qui correspond au moins au quart du temps moyen de vie d'une souris) (Goodison et al., 2003). Enfin, ces cellules dormantes peuvent maintenir leur capacité tumorigène ainsi que leur potentiel métastasique (Naumov et al., 2002; Suzuki et al., 2006) tout en étant plus résistantes à la chimiothérapie qui cible essentiellement des cellules en division cellulaire (Naumov et al., 2003; Townson et al., 2009). En effet, le traitement par la doxorubicine ne permet pas à réduire le nombre des cellules cancéreuses dormantes et n'a pas d'impact sur la récurrence des métastases tardives dûe au réveil des cellules cancéreuses dormantes.

Une question qui se pose est la transposabilité de ces observations à l'homme. Plusieurs observations cliniques suggèrent l'occurrence de phénomènes similaires chez l'homme. Par exemple, la plupart des DTCs isolées à partir de la moelle osseuse de patients soignés pour un cancer du sein sont trouvées dans un état quiescent (marquage négatif avec Ki67 et p120) (Pantel and Brakenhoff, 2004). D'ailleurs, il a été trouvé que les cellules tumorales circulantes (CTCs) récupérées à partir du sang périphérique étaient aussi dans un état quiescent (Muller et al., 2005). Des DTCs peuvent être détectées des années après le traitement complet de la tumeur primaire et persistent même après le traitement adjuvant par la chimiothérapie (Braun et al., 2000a; Janni et al., 2005; Wiedswang et al., 2004). De manière intéressant, dans le cas de cancer du sein ou de prostate, la persistance des DTCs dans la moelle osseuse est associée à un risque élevé de récurrence métastasique (Braun et al., 2000b; Janni et al., 2005; Janni et al., 2011; Morgan et al., 2009; Weckermann et al., 2009; Wiedswang et al., 2000b; Janni et al., 2004). Même s'il n'y a pas encore de preuve directe prouvant formellement que ces DTCs quiescentes peuvent réverter de leur état quiescent pour donner des métastases, on explique les rechutes métastasiques tardives par le réveil aléatoire de cellules cancéreuses disséminées dormantes.

Une autre question posée par la dormance des DTCs est la nature des facteurs régulant son induction après l'extravasation des cellules cancéreuses. Trois explications ont été suggérées (Bragado et al., 2012). La dormance pourrait être déclenchée en réponse à des conditions défavorables rencontrées lors du processus de dissémination et/ou au site d'extravasation avec un microenvironnement hostile. L'entrée en dormance pourrait constituer un mécanisme cellulaire de survie à des conditions hostiles. D'ailleurs, certains des mécanismes régulant la dormance semblent contrôler des signaux anti-apoptotiques (voir section 1.1.3.3.1). Cette explication pourrait expliquer pourquoi des DTCs restent préférentiellement en dormance dans un organe mais forme des métastases dans un autre. De plus, une perturbation dans le site métastasique peut changer complètement le comportement de la cellule cancéreuse disséminée (Barkan et al., 2010; Ghajar et al., 2013; Ottewell et al., 2014). Un autre paramètre important semble être le phénotype des cellules cancéreuses. En effet, certaines signatures génétiques établies avec la tumeur primaire permettent à prédire une récurrence métastasique tardive (Kim et al., 2012; Villanueva et al., 2010). Cela suggère que la prédisposition des cellules cancéreuses à entrer en dormance prolongée est prédéterminée par le phénotype des cellules cancéreuses de la tumeur primaire. Il a ainsi été suggéré que des DTCs qui ont disséminé précocement ne possédaient pas les altérations génétiques nécessaires pour pouvoir proliférer dans un site secondaire et donc rentraient facilement en dormance. Cela est corroboré par des récents résultats obtenus dans des modèles animaux ou des analyses génomiques des DTCs isolées des patients qui ont montré que le processus de dissémination peut avoir lieu très tôt (Eyles et al., 2010; Husemann et al., 2008; Pantel et al., 2008; Schardt et al., 2005). Enfin, il a été observé que la tumeur primaire favorise la dormance des DTCs solitaires (Guba et al., 2001). Mais les mécanismes par lesquels la tumeur primaire régule la dormance des cellules disséminées et par lesquels la dormance des DTCs persiste après l'excision de la tumeur primaire demeurent incompris.

1.1.3.2. Modèles de dormance des cellules cancéreuses en culture cellulaire

L'analyse des mécanismes régulant la dormance des cellules cancéreuses demeure pour le moment très incomplète en raison des difficultés inhérentes à ce type d'étude. En effet, les cellules cancéreuses disséminées représentent une fraction infime des cellules (de l'ordre d'une par un million de cellules normales), ce qui rend leur détection et leur caractérisation *in situ*, très difficles (Lacroix, 2006). Les analyses mécanistiques sont donc très lourdes à mener *in vivo*. Par ailleurs, l'environnement des DTCs présente potentiellement une grande hétérogénéité pouvant conduire à des variations importantes du phénotype dormant, ce qui limite aussi l'étude des mécanismes qui peut être faite à partir des analyses de transcriptomes à partir de populations de DTCs isolées par tri cellulaire. Pour contourner ces difficultés, une stratégie est de développer des modèles de dormance *in vitro* pour identifier des mécanismes potentiels régulant la dormance sous des conditions pouvant être manipulées à volonté et de tester les prédictions issues de ces modèles *in vitro* dans des modèles animaux. Dans cette partie, je vais présenter un bref rappel des principaux modèles de dormance en culture cellulaire qui ont été développés.

1.1.3.2.1. Modèles de dormance des cellules de cancer du sein en culture tridimensionnelle

Dans le modèle de dormance développé par Barkan et al., des lignées de cellule de cancer du sein sont cultivées en trois dimension (3D) dans un extrait de membranes basales dérivé des cellules du sarcome d'Engelbreth-Holm-Swarm (Culturex) (Barkan et al., 2010; Barkan and Green, 2011; Barkan et al., 2008). La capacité à proliférer sous ces conditions des cellules de différentes lignées cellulaires est fortement corrélée avec leur pouvoir métastasique *in vivo*. Des cellules très métastasiques telles que D2A1, MDA-MB-231 se remettent à proliférer rapidement sous ces conditions *in vitro* après une relative courte période de quiescence. Par contre, les cellules de lignées telles que D2.OR, MCF7 qui sont peu métastasiques, les DTCs qu'elles produisent restant très majoritairement en dormance *in vivo*, demeurent quiescentes dans ces conditions de culture 3D durant tout le temps de l'expérience. Avec ce modèle, cette équipe a essentiellement étudié le rôle de composants de la matrice extracellulaire et des intégrines dans la régulation du phénomène de dormance.

Marlow et al. ont récemment établi un modèle de dormance *in vitro* qui repose sur la coculture des cellules cancéreuses avec des cellules de la moelle osseuse dans une matrice de collagène (Marlow et al., 2013). Des cellules de la moelle osseuse sont pré-cultivées dans la matrice afin de préparer une niche pour la culture des cellules de cancer du sein. Un phénomène de dormance cellulaire est observé avec plusieurs lignées de cellules de cancer du sein (ERpositive (MCF7) et ER-négative (SUM 159, MDA-MB-231)) lorsque les cellules cancéreuses sont cultivées à faible densité dans des niches dérivées d'un mélange d'ostéoblastes, de cellules endothéliales et de cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse (hFOB, HUVEC, HS-5). Ces cellules cancéreuses quiescentes sont capables de se remettre à proliférer lorsqu'elles sont transférées dans un environnement permissif établi à partir de cellules stromales de la moelle osseuse en culture primaire. Ce modèle a permis de caractériser un rôle de p38 et du récepteur de TGFβRI dans l'établissement de la quiescence observée dans la niche inductrice de dormance. Le rôle de la niche ainsi que l'effet des inhibiteurs dans l'induction de la dormance observés dans ce modèle *in vitro* ont été subséquemment validées *in vivo* dans un modèle de xéno-implantation.

1.1.3.2.2. Modèle de dormance de cellules cancéreuses cultivées sur boîte plastique

Un système de cultures cellulaires sur boîte plastique a été établi pour modéliser le phénomène de dormance des cellules de cancer du sein dans la moelle osseuse (Barrios and Wieder, 2009; Korah et al., 2004). Il a été ainsi montré que des cellules de lignées de cancer du sein peu métastasiques (MCF7 et T-47D) entrent en dormance lorsqu'elles sont ensemencées à une faible densité sur des boîtes plastiques couvertes de fibronectine en présence de FGF-2 – un facteur impliqué dans la différenciation des cellules mammaires et qui est produit de manière abondante dans le stroma de la moelle osseuse. Cette quiescence est associée à une différenciation partielle des cellules et elle est révertée lorsque le FGF-2 est ôté. Ce modèle a permis de caractériser le rôle de l'intégrine- α 5 β 1 qui intéragit avec la fibronectine et dont l'expression est induite par le FGF-2 et de la voie PI3K/Akt qui est activée par le FGF-2 dans la dormance et la survie de des cellules quiescentes.

Un autre modèle de dormance en culture sur boîte plastique avec des cellules de cancer de la prostate a aussi été développé par T. Tchenio et al. Ce modèle sera décrit en détail dans la section 1.4.1.1, car mon travail de thèse a été basé dessus. Un point important à souligner est que ces modèles sur boîte plastique présente une grande maniabilité permettant la mise en œuvre de techniques d'analyses qui seraient relativement difficiles à mener avec des cultures 3D.

1.1.3.3. Mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules cancéreuses disséminées

1.1.3.3.1. Voie de signalisation de p38 et de ERK

ERK et p38 sont des kinases de la famille des MAPK. Ce sont des médiateurs essentiels dans des cascades de signalisation activées par différents stimuli extracellulaires. La voie ERK stimule la prolifération cellulaire en réponse aux mitogènes et la voie p38 est activée par des signaux de stress (Zhang and Liu, 2002). Des publications suggèrent que l'activation de p38 a un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (Bulavin and Fornace, 2004). Il a été démontré que les voies p38 et ERK sont impliquées dans la régulation de la dormance des cellules HEp3 de cancer de la tête et du cou. Dans ce modèle, une réduction de l'expression du récepteur de l'urokinase (uPAR) permet d'induire un état dormant dans ces cellules *in vivo* (Aguirre Ghiso et

al., 1999). Aguirre Ghiso et al. ont montré que la signalisation médiée par uPAR favorise la prolifération cellulaire en activant ERK. Cette activation implique le complexe uPAR/intégrineα5β1, EGFR et FAK (Aguirre Ghiso, 2002; Aguirre Ghiso et al., 1999; Liu et al., 2002). L'inhibition d'un de ces éléments entraine une suppression de prolifération in vivo. Par ailleurs, ils ont trouvé que la dormance des cellules HEp3 nécessite l'activation de p38 (Aguirre-Ghiso et al., 2001). L'inhibition de p38 par un inhibiteur pharmacologique ou par expression d'une forme mutée dominante négative est suffisante à remettre des cellules dormantes in vivo en prolifération. L'inhibition du complexe contenant uPAR permet l'activation de la GTPase Cdc42, qui active à son tour p38 pour induire la dormance (Aguirre-Ghiso et al., 2003). p38 régule aussi l'activité de ERK de manière négative suggérant que les activations de p38 et de ERK sont antagonistes l'une de l'autre (Aguirre-Ghiso et al., 2001). Il est aussi à noter que p38 peut être activée par des gènes de suppresseurs de métastases tels que MKK4 ou MKK6 (Taylor et al., 2008). Dans ce modèle, le rapport entre l'activité de ERK et celle de p38 permet prédire le destin des cellules HEp3 in vivo (Aguirre-Ghiso et al., 2003; Aguirre-Ghiso et al., 2001). En effet, un faible ratio d'activité pour ERK/p38 correspond à un état dormant et inversement un ratio élevé reflète un état prolifératif in vivo. Cette observation a été élargie à d'autres lignées de cellules cancéreuses (incluant des cellules de cancer de la prostate, de cancer du sein et de fibrosarcome) (Aguirre-Ghiso et al., 2003). La modulation du ratio des activités ERK/p38 par des interventions pharmacologiques ou génétiques peut produire une bascule des cellules entre un état quiescent et un état prolifératif. Par ailleurs, des mesures de l'activité de ERK et de p38 in vivo réalisées par des rapporteurs fluorescents ont confirmé ces observations (Aguirre-Ghiso et al., 2004). Par la suite, cette équipe a identifié un réseau de facteurs de transcription régulés par p38. Ils ont trouvé que la quiescence induite par l'activation de p38 implique la surexpression de p53, BHLHB3 et la sous-expression de c-Jun et FoxM1 (Adam et al., 2009). Par ailleurs, ils ont montré que NR2F1, un autre facteur de transcription de ce réseau, contrôle la dormance des cellules tumorales via SOX9, RARβ et NANOG (Sosa et al., 2015). De manière intéressante, il semble que l'activation de p38 contribue aussi aux mécanismes anti-apoptotiques et rend les cellules dormantes plus résistantes aux stress génotoxiques. Il a été observé que la voie p38 active PERK et BiP, ce qui empêche l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax (Ranganathan et al., 2006). L'inactivation de PERK ou la sous-expression de BiP conduit à une augmentation de la mort cellulaire dans les cellules HEp3 dormantes traitées par la doxorubicine

in vitro. Ils ont également trouvé que la survie des cellules HEp3 dormantes dépend de la voie ATF6 α -Rheb-mTOR et que ATF6 α est partiellement régulé par p38 (Schewe and Aguirre-Ghiso, 2008). Cette voie n'est importante que pour la survie des cellules dormantes mais non des cellules hautement tumogéniques T-HEp3. L'inhibition de ATF6 α provoque l'apoptose dans les cellules HEp3 dormantes *in vivo* et par conséquent permet de prolonger la survie des souris qui portent des cellules cancéreuses dormantes. Par ailleurs, il a été trouvé que l'inhibition de ATF6 α ou de Rheb *in vitro* rend les cellules dormantes plus sensibles à l'effet cytotoxique de la doxorubicine. En conclusion, la voie de p38 s'avère importante dans certains modèles de dormance des cellules cancéreuses, non seulement parce qu'elle est nécessaire pour induire et maintenir la quiescence mais aussi qu'elle confère aux cellules dormantes des capacités de résistance au stress.

1.1.3.3.2. Voie de signalisation de TGF- β /BMP

L'implication de la voie TGF- β /BMP dans la dormance des cellules souches de l'organisme a été décrite dans la section 1.1.2.2.3. Il apparaît que les cytokines de cette famille participent aussi à la régulation de la dormance des DTCs.

En 2007, il été observé dans des modèles murins un effet inhibiteur de BMP7 sur la formation de métastases osseuses à partir de cellules de cancer du sein ou de la prostate humaines injectées (Buijs et al., 2007a; Buijs et al., 2007b; Buijs et al., 2007c). Plus tard, en 2011, un lien entre BMP7 et la dormance des DTCs a été établi (Kobayashi et al., 2011). Dans cette étude, Kobayashi et al. ont trouvé que BMP7, qui est secrété par des cellules stromales osseuses, induit un arrêt de prolifération dans des cellules de cancer de la prostate. Cette quiescence est levée lorsque BMP7 est enlevé et semble être indépendante de l'expression du récepteur d'androgène (AR). Ils ont montré que la dormance induite par BMP7 conduit à l'induction de p21 et de NDGR1 et à l'activation de p38. BMP7 se lie au récepteur BMPRII. L'inhibition de BMPRII abolit l'effet suppresseur de BMP7 sur le développement des métastases osseuses in vivo. Dans le cancer de la prostate, l'expression de BMPRII ou de NDRG1 est inversement corrélée à l'occurrence des métastases osseuses (Bandyopadhyay et al., 2003; Kobayashi et al., 2011). Dans une autre étude, il a été trouvé que des cellules de cancer du sein disséminées dans le poumon sont maintenues en dormance par les protéines BMPs dérivées du stroma pulmonaire (Gao et al., 2012). En bloquant la voie de signalisation de BMP, l'expression de Coco (un antagoniste de BMP) provoque un échappement de la dormance dans une fraction

des cellules cancéreuses disséminées et conduit à une augmentation du taux de formation de métastases dans le poumon. La surexpression de SMAD6, un SMAD inhibiteur, dans les cellules de cancer du sein donne un résultat similaire. L'inhibition de Coco permet à rétablir la quiescence des DTCs situées dans le poumon et empêche la formation des métastases mais elle n'a aucun d'impact sur le développement métastasique dans l'os ou dans le cerveau. En analysant l'état de phosphorylation des protéines SMAD dans les cellules cancéreuses disséminées dans l'os et dans le cerveau, Gao et al. ont suggéré que ces deux derniers sites sont dépourvus de quantité suffisante de BMP fonctionnel. Il est aussi possible que la levée de la dormance des DTCs dans cette étude, la réactivation des DTCs par Coco est associée à l'induction de caractéristiques propres aux cellules souches cancéreuses (CSCs). Pourtant, un lien direct entre dormance et CSC n'a pas été établi et d'ailleurs, le concept de CSCs dans les tumeurs solides est encore un sujet de débat (Quintana et al., 2008).

Le TGF-\beta2 est un autre régulateur de la dormance des DTCs. Dans un modèle de formation de métastases basé sur les cellules HEp3 de cancer de la tête et du cou, la signalisation activée par TGF-β2 est impliquée dans la dormance des cellules cancéreuses disséminées dans la moelle osseuse (Bragado et al., 2013). Cette signalisation est transmise par les récepteurs TGFβRI et TGFβRIII. La quiescence induite par TGF-β2 implique l'activation de SMAD et l'induction de p27 (CDKN1B). En parallèle avec l'activation de la voie de SMAD, TGF-\beta2 active la voie de signalisation p38 qui induit DEC2. DEC2 induit p27 et inhibe CDK4. Par ailleurs, l'inhibition de p38 ou de TGFBRI par l'administration systémique d'inhibiteurs pharmacologiques augmente le taux de formation de métastases dans plusieurs organes. Dans ce modèle, le poumon permet le développement fréquent de métastases. Or contrairement à la moelle osseuse, le micro-environnement du poumon ne présente qu'une faible expression de TGF-\beta2. Cette expression différentielle de TGF-\beta2 pourrait expliquer pourquoi la lignée HEp3 forme fréquemment des métastases dans le poumon mais rarement dans la moelle osseuse. De manière intéressante, des cellules HEp3 disséminées isolées de la moelle osseuse se divisent lentement lorsqu'elles sont remises en culture (Bragado et al., 2013; Nakamura et al., 2015). Il a été trouvé qu'un niveau d'expression élevé de TGF-β2 dans ces cellules est responsable de ce fait (Nakamura et al., 2015). En accord avec ces observations, l'inactivation de TGF-\beta2 promeut la prolifération in vitro des DTCs dérivées de la moelle osseuse et les rend plus vulnérables à

l'effet cytotoxique de cisplatine. Ces résultats suggèrent que même en absence des signaux du microenvironnement, ces cellules pourraient activer des mécanismes auto-entretenus leur permettant de rester en quiescence. Notons que BMP7 et TGF- β 2 font partie des gènes surexprimés dans la signature de dormance réalisée avec des DTCs des patients de cancer de la prostate (Chery et al., 2014). Cette signature compare l'expression génétique des DTCs obtenus à partir des patients avec un stade avancé et celles des patients qui présentent une longue période asymptomatique (7-18 ans) après une prostatectomie radicale. Cela suggère encore une fois l'implication de la voie de TGF- β /BMP dans le phénomène de dormance des DTCs. En conclusion, il parait que cette voie de signalisation joue un rôle essentiel dans le phénomène de dormance cellulaire car elle contrôle à la fois la dormance des cellules souches ainsi que celle des cellules tumorales.

1.1.3.3.3. Autres voies de signalisation

1.1.3.3.3.1. Intégrines

Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui permettent principalement d'établir des liens entre une cellule et la matrice extracellulaire. Parmi celles-ci, l'intégrine ß1 a été particulièrement impliquée dans la réactivation de cellules cancéreuses dormantes dans un modèle de dormance *in vitro* de cellules de cancer du sein. En effet, la fibronectine induit une transition d'un état quiescent à un état de prolifération en interagissant avec l'intégrine-ß1 exprimé sur les cellules cancéreuses (Barkan et al., 2008). Cette transition est associée avec une réorganisation du cytosquelette, une formation des fibres de stress et nécessite l'activation de MLCK. L'inhibition de MLCK bloque cette transition in vitro et réduit la formation des métastases in vivo en limitant la prolifération des cellules de cancer du sein disséminées dans le poumon. Il a été trouvé dans une autre modèle avec des cellules de cancer de la prostate que l'activation constitutive de MLCK dans des cellules quiescentes promeut la prolifération in vitro (Ruppender et al., 2015). Des observations similaires montrent que le collagène de type I (Col I) promeut lui aussi la réactivation in vitro des cellules de cancer du sein dormantes D2.0R en se liant à l'intégrine-\beta1 (Barkan et al., 2010). L'interaction entre Col I et l'intégrine-\beta1 induit l'activation de SRC, FAK et ERK. L'activation de ERK conduit à la phosphorylation de MLC par MLCK. L'inhibition de l'intégrine-β1, de SRC, de ERK ou de MLCK supprime l'effet stimulant de Col I sur la prolifération. Finalement, il a été observé in vivo, que la réduction de l'expression de l'intégrine- β 1 ou de FAK dans des cellules de cancer du sein limite la formation des métastases (Barkan et al., 2010; Shibue and Weinberg, 2009). Toutefois, il convient d'être prudent dans l'interprétation de ces résultats obtenus *in vivo*, car les intégrines sont aussi fortement impliquées dans le contrôle de l'apoptose sans qu'il y ait nécessairement un lien direct avec le phénomène de dormance.

1.1.3.3.3.2. GAS6-Axl

Des résultats récents suggèrent l'implication de la voie GAS6-Axl dans la dormance des cellules de cancer de la prostate (Shiozawa et al., 2010; Taichman et al., 2013). GAS6 est une protéine produite par les cellules ostéoblastiques. L'interaction entre les ostéoblastes et les cellules de cancer de la prostate via l'Annexine II et son récepteur induit l'expression du récepteur Axl à GAS6, ce qui active la voie de signalisation Gas6-Axl dans les cellules cancéreuses. *In vitro*, la signalisation GAS6-Axl dans des cellules de cancer de la prostate régule l'invasion, induit l'arrêt de la prolifération et confère une résistance aux drogues anticancéreuses (Shiozawa et al., 2010). *In vivo*, on observe une corrélation dans différentes lignées cellulaires entre les niveaux relatifs d'expression de Axl et de Tyro3 (un autre récepteur de GAS6) et l'état dormant ou prolifératif des cellules cancéreuses (Taichman et al., 2013). Quand l'expression de Axl est prépondérante par rapport à celle de Tyro3, les cellules cancéreuses disséminées sont dans un état dormant et inversement lorsque l'expression de Tyro3 est prépondérante. La pertinence de ce mécanisme dans la régulation de la dormance des cellules cancéreuses reste à confirmer.

1.1.3.3.3.3. Divers

Wendt et al. ont montré que l'inhibition de l'expression de la E-cadhérine cause un échappement des cellules de cancer du sein à la dormance *in vitro* et *in vivo* en partie en facilitant l'expression de l'intégrine- β 1 (Wendt et al., 2011). Ce travail suggère qu'il pourrait y avoir un lien entre la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et la réversion du phénomène de dormance. Par ailleurs, certaines études suggèrent que l'entrée en dormance pourrait être associée à une différenciation aberrante (Shachaf et al., 2004; Yu et al., 2005). Dans l'étude de Shachaf, il a été montré *in vivo* que l'inactivation de l'oncogène MYC dans les cellules de cancer du foie conduit à une différenciation associée avec une expression des marqueurs de différenciation tels que CK-8, CEA et une perte d'expression du marqueur tumorale AFP. Ils ont

trouvé que cet état de différenciation est associé avec un état dormant qui est maintenu tant que MYC est inactivé et réverté par la réactivation de MYC (Shachaf et al., 2004).

1.1.3.3.4. Conclusion relative aux mécanismes de dormance des cellules cancéreuses

On remarque donc que certaines voies de signalisation sont impliquées tout à la fois dans la régulation de la dormance des cellules souches et des cellules cancéreuses. Ces similarités sont confortées par l'observation qu'environ 62% des gènes induits dans des cellules souches quiescentes (incluant HSCs, MuSCs, HFSCs) sont surexprimés dans les cellules de cancer de la tête et du cou dormantes (Sosa et al., 2014). Par ailleurs, il semble que certaines voies de signalisations activées à partir des cellules participant à l'architecture de la niche des cellules souches hématopoïétiques et régulant la dormance de ces dernières pourraient aussi réguler la dormance des cellules cancéreuses. Toutefois, une différence majeure entre la dormance des cellules souches normales et des cellules souches normales et des cellules souches normales alors qu'il semblent associés à la dormance des cellules cancéreuses dans plusieurs modèles cellulaires. L'ensemble de ces observations suggère l'occurrence de mécanismes communs mais aussi de différences notables entre la dormance des cellules souches normales et des cellules souches normales et des cellules compares dans plusieurs modèles cellulaires. L'ensemble de ces observations suggère l'occurrence de mécanismes communs mais aussi de différences notables entre la dormance des cellules souches normales et des cellules cancéreuses.

1.1.3.4. Implications thérapeutiques du phénomène de dormance cellulaire des DTCs

Le phénomène de dormance cellulaire limite la formation de métastases mais est aussi à l'origine des récurrences métastasiques tardives. La caractérisation de marqueurs de dormance robustes ainsi qu'un contrôle pharmacologique du phénomène de dormance des DTCs en vue de son amplification ou de son inhibition pourrait trouver des applications thérapeutiques importantes. Ainsi, Aguirre-Ghiso et al. ont proposé un schéma thérapeutique hypothétique pour traiter la maladie cancéreuse résiduelle (Aguirre-Ghiso et al., 2013). Si le patient est négatif pour la présence des DTCs, il serait surveillé. Si la présence de DTCs est détectée, ces DTCs et leur niche seraient profilés pour déterminer la propension des cellules cancéreuses à demeurer dormantes. Dans le cas où les DTCs seraient dans un état dormant robuste, le patient serait traité par des thérapies visant à amplifier l'état dormant ou à éliminer des cellules dormantes. Par contre, dans le cas où les DTCs ne seraient pas dans un état dormant robuste, des traitements anti-prolifératifs seuls ou en combinaison avec des thérapies inductrices de dormance seraient

proposés. Ce schéma thérapeutique idéal n'est pas réalisable à présent car les mécanismes régulant la dormance tumorale sont connus de manière incomplète. D'autre part, il faudrait trouver et valider des marqueurs exprimés par les DTCs et/ou par leur niche qui permettraient de prédire l'évolution de la maladie. Pour les DTCs, l'expression des récepteurs de uPAR, TGFβRIII, BMPRII, Axl, Tyro3 ou l'état de phosphorylation de p38/ERK pourraient être des candidats potentiels. En ce qui concerne l'évaluation des niches des DTCs, la présence de TGFβ2, BMP7, BMP4 ou de fibronectine, collagène I, Coco, TGF-β1 pourrait être utilisée (Sosa et al., 2014). Notons que si ce schéma thérapeutique est encore hypothétique, des drogues spécifiquement toxiques pour les DTCs commencent à être caractérisées tel que l'acide zolédronique - un biphosphonate normalement utilisé contre l'ostéoporose. Dans un essai clinique réalisé avec des patients de cancer du sein, il a été trouvé qu'un traitement par l'acide zolédronique contribue à éradiquer les DTCs (Banys et al., 2013). Par ailleurs, de nouvelles stratégies thérapeutiques de contournement d'un problème de résistance aux chimiothérapies des cellules dormantes sont en train d'être définies. En effet, il a été observé avec des modèles animaux, qu'un traitement par chimiothérapie administré précocement ne permettait pas d'éliminer les cellules dormantes et n'avait pas d'effet sur la formation tardive des métastases (Naumov et al., 2003; Townson et al., 2009), car les cellules dormantes sont plus résistantes à la mort cellulaire. Il a donc été suggéré de retarder le traitement adjuvant ou de le fractionner ou de prolonger le temps de traitement (Goss and Chambers, 2010) afin d'augmenter la probabilité d'exposer aux drogues anticancéreuses les DTCs qui sont sorties de dormance. De fait, une réduction du risque de récurrence métastasique ainsi qu'une amélioration de la survie globale ont été observées dans des patients de cancer du sein qui ont bénéficié d'un traitement adjuvant retardé avec le tamoxifène ou d'un traitement adjuvant prolongé avec le létrozole (Delozier et al., 2000; Goss et al., 2008). La possibilité de lever la dormance des DTCs par un traitement pharmacologique devrait donc amplifier les effets des chimiothérapies adjuvantes. Une alternative préférable est évidemment de pouvoir tuer directement les cellules dormantes sans avoir à les sortir de dormance. En conclusion, des cellules cancéreuses dormantes représentent une cible thérapeutique prometteuse et il est crucial de comprendre des mécanismes qui régulent ce phénomène de dormance cellulaire pour envisager de nouvelles stratégies.

1.2. Dormance des petites masses tumorales et évaluation de son importance

Il existe un autre phénomène de dormance de nature différente et concernant les petites masses tumorales. Dans ce cas, le terme de dormance désigne une situation où la masse tumorale de taille microscopique n'augmente pas pendant une longue période. Contrairement au phénomène de dormance cellulaire où la cellule est dans un état quiescent, des cellules dans la micro-tumeur dormante continuent à se diviser mais cette prolifération est contrebalancée par la mort de cellules cancéreuses (Aguirre-Ghiso, 2007). Deux mécanismes menant à ce phénomène ont été identifiés, et sont liés à l'angiogénèse (Almog, 2010; Naumov et al., 2006a) ou à l'immuno-surveillance (Quesnel, 2008; Romero et al., 2014b; Teng et al., 2008).

1.2.1. Dormance de petites masses tumorales liée à une angiogenèse insuffisante

L'angiogénèse est le processus qui permet d'établir de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Certains modèles animaux montrent que l'absence d'expansion de microtumeurs peut être liée à une angiogénèse insuffisante (Almog et al., 2006; Naumov et al., 2006a; Naumov et al., 2006b). Dans ces modèles, des cellules cancéreuses humaines (dérivées de cancer du sein, d'ostéosarcome, de glioblastome, ou de liposarcome) forment, après leur injection souscutanée dans les souris immuno-déficientes, des tumeurs qui demeurent de taille microscopique pendant une période prolongée durant des mois (Naumov et al., 2006a). Toutefois, certaines d'entre elles peuvent spontanément se mettre à croître pour former des tumeurs palpables. La transition d'un état dormant à un état de croissance est associée à un changement de la vascularisation. En effet, les tumeurs microscopiques sont caractérisées par une faible vascularisation qui est de surcroit instable alors que les tumeurs macroscopiques présentent une vascularisation plus importante. Il semble que la transition d'un état dormant à un état de croissance soit associé à des modifications épigénétiques ou génétiques stables. En effet, des lignées cellulaires établies à partir des tumeurs dormantes ou en croissance présentent des cinétiques différentes de formation de tumeur après la ré-injection dans des souris. Les lignées dérivées des tumeurs en croissance forment rapidement des tumeurs macroscopiques au bout d'un mois après l'injection. Par contre, les cellules des lignées provenant des tumeurs de phénotype dormant se comportent comme leurs cellules parentales, car elles forment majoritairement des tumeurs microscopiques dormantes, la formation de tumeurs macroscopiques n'étant détectable qu'après une longue période pouvant excéder 3 mois. Il a été montré que les cellules des lignées peu tumorigéniques du fait de ce phénomène de dormance

expriment et sécrètent une plus grande quantité de facteurs anti-angiogéniques endogènes tels que Thrombospondin-1 ou TIMP1 (Almog et al., 2006; Almog et al., 2009; Naumov et al., 2006b). Un rôle important de l'angiogenèse est confirmé par d'autres études montrant que l'administration d'angiostatine (un facteur anti-angiogénique) ou la surexpression du gène codant cette protéine dans les cellules cancéreuses inhibe la croissance de la tumeur primaire ainsi que des micro-métastases *in vivo* (Cao et al., 1998; Holmgren et al., 1995; O'Reilly et al., 1996). De manière inverse, un traitement par des facteurs angiogéniques tels que le VEGF, bFGF, la surexpression des gènes correspondants ou la co-injection des cellules cancéreuses avec des cellules angiogéniques permet de fortement stimuler la croissance tumorale (Bayko et al., 1998; Indraccolo et al., 2006; Udagawa et al., 2002). Ces observations montrent qu'une vascularisation est nécessaire aux micro-tumeurs pour poursuivre leur croissance, faute de quoi elles se maintiennent dans un état dormant qui perdure tant qu'une angiogenèse suffisante ne se sera pas développée.

1.2.2. Dormance tumorale liée à un phénomène d'immuno-surveillance

Le rôle du système immunitaire dans le contrôle de la croissance des tumeurs a été bien démontré dans des modèles animaux. Dans un modèle de sarcome murin chimio-induit, une grande majorité des souris immunocompétentes ne développent que de petites tumeurs qui ne s'accroissent pas pendant une longue période pouvant dépasser 150 jours (Koebel et al., 2007). Ces petites tumeurs sont caractérisées par un taux élevé de mort cellulaire. La déplétion en cellules T ou la neutralisation de l'interféron γ ou de l'interleukine 12 conduit à une croissance des tumeurs dormantes. Un rôle crucial du système immunitaire est retrouvé dans un modèle murin de lymphome à lymphocytes B (cellules BCL1). Lorsque les souris sont préalablement immunisées contre les cellules BCL1, l'injection de ces cellules conduit dans environ 70% des souris au développent d'un lymphome dormant alors qu'elle tue des souris non immunisées au bout d'un mois après l'injection (Rabinovsky et al., 2007; Uhr and Marches, 2001; Yefenof et al., 1993). Les souris avec un lymphome dormant contiennent toujours dans leur rate des cellules BCL1 qui sont rapidement létales lorsqu'elles sont isolées et réinjectées à des souris nonimmunisées. On a identifié dans les souris immunisées des anticorps anti-idiotypiques qui se lient avec une IgM présente à la surface des cellules BCL1 et induisent ainsi la mort ou une quiescence de ces cellules. Par ailleurs, les cellules T CD8⁺, mais non T CD4⁺, synergisent avec les anticorps anti-idiotypiques pour induire et maintenir la dormance tumorale (Farrar et al.,

1999). Il apparait dans d'autres études que les cellules T CD8⁺ inhibent la croissance des micrométastases (Eyles et al., 2010; Romero et al., 2014a). Un traitement par l'anticorps anti-CD8 conduit à une augmentation du nombre et de la taille des métastases. De manière intéressante, les cellules T CD8⁺ peuvent restreindre l'expansion de la masse tumorale sans directement cibler des cellules cancéreuses mais via un effet cytotoxique sur des cellules immunosuppressives du stroma (Zhang et al., 2008). D'autres études ont montré de manière concordante que l'état dormant d'une tumeur corrèle avec une proportion élevée de cellules du système immunitaire anti-tumorales (T CD8⁺, NK) et inversement qu'un état de croissance est lié à un nombre important de cellules immunosuppressives infiltrant dans la tumeur (Wu et al., 2013). L'ensemble de ces résultats montrent que la dormance tumorale peut être sous le contrôle actif du système immunitaire.

1.2.3. Importance du phénomène de dormance affectant des masses tumorales

Les résultats obtenus dans les modèles animaux montrent que les phénomènes de dormance des tumeurs peuvent réguler la croissance de la tumeur primaire ainsi que des métastases. Bien que des preuves directes de l'occurrence de ce phénomène dans les patients manquent, il existe un large consensus pour l'existence de ce phénomène. Ce phénomène contribue à la période de latence précédant le développement apparent de la tumeur primaire et aussi à la période asymptomatique avant la rechute de la maladie. Dans le dernier cas, la question se pose de son importance par rapport au phénomène de dormance cellulaire des cellules cancéreuses isolées. Des modèles mathématiques suggèrent que l'équilibre dynamique établi dans la masse tumorale est difficile à maintenir au cours du temps (Taylor et al., 2013; Wells et al., 2013). Ainsi, des rechutes tardives qui ont lieu plus de cinq ans après le traitement de la tumeur primaire sont plutôt attribués à l'existence du phénomène de dormance. D'ailleurs, les cellules proliférantes dans les micro-métastases dormantes ont une probablité a priori plus importante de développer des altérations génétique ou épigénétiques qu'une cellule dormante du fait de leur nombre plus importants et des multiples disfonctionnements possibles pouvant altérer la division cellulaire et donc de développer un potentiel malin aggravé rompant l'état stationnaire de dormance des micro-métastases. Une étude par Luzzi et al. avec des cellules de mélanome injectées dans le système porte du foie suggère que qu'environ 2% des cellules extravasées dans le parenchyme hépatique peuvent former des micrométastase et que seul 1% de ces dernières donneront des métastases macroscopiques (Luzzi et al., 1998), suggérant que les deux

phénomènes de dormance cellulaire et de dormance de masses tumorales sont tous deux importants pour le contrôle du développement des métastases.

Figure 3 : Représentation des phénomènes de dormance (de la cellule cancéreuse et des petites masses tumorale) dans le processus métastasique (adapté de Aguirre-Ghiso, 2007)



Nature Reviews | Cancer

Après l'extravasation dans un organe distant, la cellule cancéreuse disséminée peut entrer dans un état quiescent cellulaire en réponse à des conditions défavorables rencontrées lors du processus de dissémination et/ou au microenvironnement hostile du nouvel site. La cellule cancéreuse dormante peut sortir de cet état et remettre en prolifération. La croissance des micrométastases à leur tour peut être limitée par un autre phénomène de dormance. Dans ce cas, les micro-métastases n'arrivent pas à s'accroître parce que la prolifération des cellules cancéreuses dans les micro-métastases est équilibrée par les événements de la mort cellulaire. Ce phénomène de dormance est lié aux mécanismes de l'immuno-surveillance et/ou à l'insuffisance de vascularisation.

1.3. Androgènes, récepteur aux androgènes et cancer de la prostate

1.3.1. La signalisation par le récepteur aux androgènes

Les androgènes sont des stéroïdes qui régulent principalement le développement et la maintenance des caractères sexuels males. La testostérone est le principal androgène présent dans la circulation. Chez l'homme, elle est essentiellement sécrétée par les cellules de Leydig du testicule en réponse à la stimulation hypothalamo-hypophysaire (Basu and Tindall, 2010). Par ailleurs, des androgènes surrénaliens peuvent être convertis en testostérone (Labrie et al., 2001). La majorité de la testostérone circulante est liée aux protéines plasmatiques comme le SHBG (sex hormon binding globulin) ou l'albumine. Seul 1-2% de testostérone circulante est libre (Basu and Tindall, 2010). Une fois qu'elle a pénétré dans des cellules cibles telles que les cellules prostatiques, la testostérone est métabolisée par l'enzyme 5-a-réductase en dihydrotestostérone (DHT), cette dernière ayant une affinité augmentée pour le récepteur aux androgènes (AR) (Heinlein and Chang, 2004). AR est une protéine de 110 kDa de la famille des récepteurs nucléaires et est donc un facteur de transcription. Elle présente trois domaines principaux : un domaine N-terminal impliqué dans la transactivation, un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal de liaison au ligand (Ferraldeschi et al., 2015). En absence de ligand, AR reste confiné dans le cytoplasme en association avec des protéines de choc thermique (HSPs) tels que Hsp90, 70, 56, 21. En liant la testostérone ou la DHT, AR change de conformation, se dissocie des HSPs, se dimérise et migre dans le noyau. Dans le noyau, le complexe androgène-AR se fixe sur des sites spécifiques de l'ADN présentant une séquence consensus déterminée (AREs) et qui sont situés au niveau des régions promotrices des gènes cibles et recrute ainsi des co-régulateurs de transcription (van de Wijngaart et al., 2012). Certains de ces derniers semblent être des co-activateurs relativement spécifiques de AR tels que ARA70, 55, 54. AR peut aussi s'associer avec d'autres co-activateurs tels que p160, p300, CBP et pCAF qui possèdent une activité histone-acetyltransferase (HAT). L'assemblage du complexe androgène-AR et des co-régulateurs au niveau du promoteur des gènes cibles conduit à activer ou à réprimer l'expression de ces gènes. Il faut aussi noter que AR peut agir selon un mécanisme indépendant de son action comme facteur de transcription. Le complexe androgène-AR cytoplasmique peut en effet activer des kinases comme c-Src, Akt, PKC via une liaison directe et ainsi par exemple stimuler l'activation de la voie de MAPK/ERK (Liao et al., 2013). Par ailleurs, les androgènes pourraient exercer des effets indépendamment de leur liaison au récepteur des

androgènes mais via leur liaison avec des récepteurs membranaires tels que le récepteur de SHBG (Foradori et al., 2008).



Figure 4 : Représentation schématique du mécanisme d'action des androgènes via le récepteur aux androgènes (adapté de Feldman and Feldman, 2001)

1.3.2. Rôle des androgènes dans le développement normal de la prostate

La prostate est une glande exocrine de l'appareil génital masculin qui participe à la production du liquide séminal. Elle a de la forme d'une châtaigne, et entoure l'urètre sous la vessie (Hayward and Cunha, 2000). La prostate est constituée d'un stroma fibromusculaire et d'un épithélium glandulaire qui est à l'origine de la majorité (95%) de cancer de la prostate (Shen and Abate-Shen, 2010). L'épithélium de la prostate adulte est essentiellement composé de cellules luminales et basales auquelles s'ajoutent de rares cellules neuroendocrines et des cellules épithéliales luminales de phénotype intermédiaire entre cellules luminales et basales (Shen and Abate-Shen, 2010; van Leenders and Schalken, 2003; Walker et al., 2008). Les cellules épithéliales luminales (ou des cellules sécrétrices) forme une couche continue et produisent le liquide prostatique. Elles expriment des marqueurs caractéristiques tels que cytokeratines K8/K18 et le récepteur d'androgène. Les cellules épithéliales basales situent en dessous de cellules sécrétrices et les séparent de la membrane basale. Elles expriment des cytokeratines

K5/K14, p63 et n'expriment pas AR sinon à un très faible niveau. Les cellules neuroendocrines exprimant des marqueurs endocriniens (chromogranin A, synaptophysin) sont aussi AR-négatives.

La prostate commence à se développer à partir du sinus urogénital durant l'embryogénèse tardive. L'organogénèse de la prostate et son développement sont dépendants des androgènes et requièrent une interaction réciproque entre l'épithélium et le mésenchyme du sinus urogénital (Hayward and Cunha, 2000). En absence d'un AR fonctionnel chez l'homme ou la souris, la prostate ne se développe pas (Marker et al., 2003). Au cours du développement embryonnaire, l'épithélium prostatique provient des cellules souches multipotentes basales qui persistent durant le développement postnatal (Ousset et al., 2012; Pignon et al., 2013; Wang et al., 2001). Dans la prostate chez l'adulte, la régénération de l'épithélium est assurée par des progéniteurs unipotents luminals et basals (Choi et al., 2012; Liu et al., 2011; Wang et al., 2009). La maintenance de la prostate chez l'adulte est toujours dépendante des androgènes. En effet, la privation en androgènes par castration cause une rapide involution de la prostate du fait de l'induction d'une mort cellulaire dans la grande majorité des cellules luminales (Chen et al., 2013). Cet effet est réversible car l'administration d'androgènes après castration induit la régénération de l'épithélium prostatique. Les androgènes stimulent des cellules progénitrices luminales dont la survie est indépendante de la présence d'androgènes (Choi et al., 2012; Liu et al., 2011; Wang et al., 2009). Ainsi, dans la prostate adulte, les cellules luminales qui sont à l'origine de la majorité des adénocarcinomes prostatiques (Wang et al., 2014), sont dépendantes des androgènes pour leur survie (cellules luminales différenciées), et pour leur prolifération et leur différenciation (cellules progénitrices luminales).

1.3.3. La voie de signalisation AR dans le cancer de la prostate

Aux Etats-Unis, le cancer de la prostate est un des cancers le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme et représente une cause majeur de décès par cancer (Jemal et al., 2010). Pour des tumeurs localisées à faible risque, une prostatectomie ou la radiothérapie est le premier traitement. Dans le cas de tumeurs à un stade avancé ou de récurrences locales/métastasiques de la maladie, les thérapies visant à réduire l'activité de AR constituent le traitement de référence (Heidenreich et al., 2014a, b). L'origine de cette stratégie thérapeutique provient de l'étude pionnière de Charles Huggins en 1941 où il a été démontré que l'ablation des androgènes via la castration apportait des améliorations cliniques remarquables à des patients à
un stade de cancer avancé (Huggins et al., 1941). Depuis lors, il a été trouvé que la prolifération et la survie des cellules cancéreuses prostatiques dans la très grande majorité des cas dépend de la voie de signalisation androgènes/AR (Dehm and Tindall, 2006). Les thérapies actuelles incluent une castration chirurgicale et/ou médicamenteuse avec des antagonistes/agonistes de la LHRH qui bloquent la production de LH par l'hypophyse et ainsi la production de testostérone par les cellules de Leydig. Cette castration peut être réalisée en combinaison avec un traitement avec des molécules antagonistes de AR (anti-androgènes). Les anti-androgènes sont en compétition avec les androgènes pour se lier à AR et ainsi inhiber son activité transcriptionnelle (Chen et al., 2009). Il y a deux classes d'antagonistes de AR : les inhibiteurs stéroïdiens et ceux non-stéroïdiens. Les anti-androgènes non-stéroïdiens présentent moins d'effets secondaires et constituent le traitement standard dans le cancer de la prostate avancé. Récemment, une nouvelle génération d'anti-androgènes non stéroïdiens a été développée, ce qui a abouti à la commercialisation de Enzalutamide. Ce dernier a une plus forte affinité pour AR, inhibe la translocation nucléaire de AR et sa liaison à l'ADN (Tran et al., 2009). En addition à ces deux stratégies (inhiber la production d'androgène, antagoniser AR), il y a une autre stratégie qui vise à inhiber la biosynthèse des androgènes. Par exemple, c'est le cas de Albiterone, elle est l'inhibiteur de CYP17A1 - un enzyme crucial dans le processus de synthèse des androgènes surrénaliens

Bien qu'à la phase initiale du traitement, une rémission soit souvent observée, elle est malheureusement transitoire car des cellules cancéreuses résistantes apparaissent quasi constamment avec une médiane de l'ordre de 2-3 ans (Wadosky and Koochekpour, 2016). Le cancer est alors qualifié de résistant à la castration (CRPC : castration-resistant prostate cancer). Le CRPC présente souvent une malignité accrue (taux de prolifération et pouvoir métastasique augmentés) et est léthal avec une médiane de un à deux ans (Wadosky and Koochekpour, 2016).

De nombreuses études ont été lancées pour étudier des mécanismes régulant la résistance aux anti-androgènes. Dans la plupart de cas, même si le CRPC ne répond plus aux traitements anti-androgènes, les cellules cancéreuses continuent à dépendre de la voie de signalisation du AR pour survivre et/ou proliférer. En fait, dans la très grande majorité des cas, les cellules de CRPC ont développé différents mécanismes pour restaurer l'activité de la voie AR malgré des taux circulants d'androgènes très bas ou la présence d'antagonistes de AR (Feldman and Feldman, 2001; Watson et al., 2015). D'ailleurs, l'expression des gènes qui sont normalement induites par l'activation de AR tel que le PSA reste souvent élevée dans le cas de CRPC (Heinlein and Chang, 2004; Sadar, 1999). Les mécanismes de résistance peuvent être divisés en deux grandes catégories selon qu'ils dépendent d'un ligand ou non.

Dans la première catégorie on classe les mécanismes dépendants d'un ligand. Ainsi un mécanisme possible est une augmentation de la synthèse endogène des androgènes par les cellules cancéreuses afin de maintenir un niveau d'androgène suffisant pour leur survie et leur prolifération (Cai et al., 2011; Chun et al., 2009; Locke et al., 2010; Montgomery et al., 2008). Par ailleurs, différentes mutations dans le domaine de liaison du ligand (LBD) présent dans AR (Beltran et al., 2013; Robinson et al., 2015; Suzuki et al., 1996; Suzuki et al., 1993) permettent à AR d'être activé par des ligands non-canoniques tels que l'oestradiol, la progestérone, les glucocorticoïdes, des androgènes surrénaliens et aussi par des antagonistes pharmacologiques de AR (Hara et al., 2003a; Tan et al., 1997; Taplin et al., 1999; Veldscholte et al., 1990; Zhao et al., 2000). Toutefois, un des mécanismes principaux de résistance semble être une exacerbation de la sensibilité des cellules aux androgènes. Celle-ci peut être causée par la surexpression de AR souvent causée par l'amplification du gène AR. Le niveau d'expression de AR est trouvé augmenté dans environ 60% des métastases de CRPC (Taylor et al., 2010). L'amplification et/ou la surexpression de AR résulte de la sélection clonale induite par le traitement anti-androgène (Chen et al., 2004; Visakorpi et al., 1995). Une surexpression de AR est suffisante à induire la progression vers un état de CRPC in vitro et in vivo (Chen et al., 2004). Un mécanisme alternatif est une augmentation de l'activité transcriptionnelle de AR. Cela peut se faire par une augmentation de la localisation nucléaire ou de la stabilité de AR ainsi que par la surexpression de co-activateurs transcriptionnels (Gregory et al., 2001a; Gregory et al., 2001b; Taylor et al., 2010).

Dans la seconde catégorie, on trouve des mécanismes de résistance qui rendent l'activation de AR indépendante d'un ligand. Ainsi, l'épissage alternatif des ARN transcrits à partir de *AR* peut générer des variants du récepteur dépourvu du domaine de liaison aux androgènes et qui sont activés constitutivement en absence de ligand (Ware et al., 2014). En fait, la forme canonique de AR peut elle aussi être activée en absence de ligands par certaines voies de signalisation intracellulaires telle la voie dépendante de ERBB2, un récepteur tyrosine kinase de la famille des récepteurs à l'EGF (Feldman and Feldman, 2001).

Les mécanismes mentionnés ci-dessus constituent différentes manières par lesquelles les cellules cancéreuses dépendantes du récepteur d'androgène peuvent s'adapter aux traitements anti-androgènes. Ainsi, AR demeure une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des CRPC. Il est aussi possible que la préexistence des cellules qui sont complètement indépendantes de AR pour leur survie et leur prolifération dans la population des cellules de cancer de la prostate constitue autre mécanisme de résistance (Watson et al., 2015).

1.3.4. Le rôle suppresseur de tumeur des androgènes

A première vue, il semble que les androgènes aient essentiellement un impact négatif sur la progression du cancer de la prostate en favorisant la survie et la prolifération des cellules tumorales. Mais les relations entre les androgènes et le cancer de la prostate sont plus complexes. Ainsi, il a été observé qu'un faible niveau de testostérone sérique était associé à un risque élevé de l'occurrence d'un cancer de la prostate (Morgentaler and Rhoden, 2006). D'ailleurs, les tumeurs qui évoluent dans un environnement à faible niveau de testostérone sont plus agressives (Hoffman et al., 2000; Lane et al., 2008). Inversement, de nombreuses études in vitro et in vivo suggèrent que les androgènes pourraient agir comme un suppresseur de tumeur à un stade avancé de la maladie. En effet, il a été observé que les androgènes inhibent la prolifération des cellules de cancer de la prostate AR-positives in vitro et empêchent la croissance tumorale in vivo (Chuu et al., 2005; Chuu et al., 2006; Chuu et al., 2011b; Cinar et al., 2001; Hara et al., 2003b; Joly-Pharaboz et al., 2000; Kokontis et al., 1994; Kokontis et al., 1998; Kokontis et al., 2014; Wolf et al., 1991; Zhau et al., 1996). En particulier, il a été montré que l'expression ectopique de AR dans la lignée hormono-insensible PC3 (négative pour AR) provoque l'inhibition de sa prolifération en réponse aux androgènes (Heisler et al., 1997; Litvinov et al., 2004; Yuan et al., 1993). Le blocage de la prolifération inductible par les androgènes dépend du niveau d'expression de AR et s'accompagne d'une inhibition de l'expression de Skp2, c-Myc, CDK2, et CCNA2 et de la sur-régulation de CDKN1B (p27Kip1) (Chuu et al., 2011b; Kokontis et al., 2014; Tsihlias et al., 2000). Par ailleurs, des études récentes ont montré que la surexpression de AR induite par la privation en androgènes rend cytotoxiques des doses élevées d'androgènes (Isaacs et al., 2012; Thelen et al., 2013; Vander Griend et al., 2007). Cet effet cytotoxique pourrait être causé par l'induction des cassures double brins ou par l'inhibition des origines de réplication de l'ADN du fait d'une dégradation incomplète de AR (Denmeade and Isaacs, 2010; Haffner et al., 2010; Isaacs et al., 2012; Vander Griend et al., 2007). Par ailleurs, certains études

ont suggéré que l'activation de AR était capable à induire un phénomène de sénescence dans les cellules de cancer de la prostate (Mirochnik et al., 2012; Roediger et al., 2014). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère fortement un rôle suppresseur de tumeur de l'androgène, ce qui est strictement lié au niveau d'expression de son récepteur. De fait, il a été récemment proposé que les androgènes pourraient être utilisés pour le traitement du CRPC qui présente une expression très augmentée de AR (Chuu et al., 2011a; Denmeade and Isaacs, 2010; Kaplan et al., 2016; Schweizer et al., 2015).

1.4. Sujet du travail de thèse : Analyse des mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules de cancer de la prostate à partir d'un modèle en culture cellulaire sur boîte de plastique

1.4.1. Description du modèle de dormance utilisé dans mon travail de thèse

1.4.1.1. Mode d'induction de la dormance en culture cellulaire

Le modèle a été dérivé de l'étude des facteurs qui modulent la clonogénicité des cellules de cancer de la prostate en culture cellulaire, c'est à dire la capacité de ces cellules à proliférer lorsqu'elles sont isolées pour former des clones cellulaires (populations de cellules génétiquement identiques) (Havard et al., 2011). La clonogénicité est facilement étudiable en culture cellulaire (*in vitro*) en analysant la capacité de cellules ensemencées à faible densité à former des colonies cellulaires. Elle est mesurée par l'efficacité de clonage qui est définie comme le nombre de clones ou colonies formées rapporté au nombre de cellules ensemencées. Il est à noter que la culture à faible densité cellulaire constitue une condition plus hostile pour la prolifération en comparant à la culture à moyenne densité cellulaire. Il n'y a qu'une fraction de cellules ensemencées qui sont capables à proliférer pour former des clones.

Dans cette étude, ils ont utilisé les cellules sensibles aux androgènes LNCaP*, dérivées des cellules LNCaP par transduction du récepteur aux rétrovirus murins écotropiques. Ils ont trouvé que la clonogénicité des cellules LNCaP* est fortement modulée par la pression osmotique. En effet, l'efficacité de clonage diminue plus d'un facteur 100 lorsque l'osmolalité du milieu de culture varie de 270 à 360 mOsm/l. La clonogénicité des cellules LNCaP* est fortement inhibée dans un milieu légèrement hypertonique tel que le milieu de culture DMEM supplémenté de 10% du sérum (DMEM-FCS). Il y a moins de 1% de cellules qui est capable à cloner sous cette condition. Une diminution de la pression osmotique par l'ajout de l'eau dans le

milieu DMEM-FCS augmente considérablement l'efficacité de clonage. Celui-ci atteint son niveau optimal dans la condition hypotonique obtenue par l'addition de 25% de l'eau dans le milieu DMEM-FCS. A l'inverse, une augmentation de la pression osmotique par l'ajout du sorbitol ou de NaCl dans un milieu de culture isotonique tel que le RPMI-FCS diminue l'efficacité de clonage. Une modulation de la clonogénicité par la pression osmotique a été aussi observée avec les cellules parentales LNCaP. De manière remarquable, la tonicité du milieu de culture n'a aucun d'impact sur la prolifération des cellules LNCaP* cultivées à moyenne densité cellulaire suggérant une absence d'effet toxique ou d'inhibition spécifique de certaines étapes du cycle de division cellulaire.

Ils ont trouvé que l'induction d'un phénomène de dormance cellulaire par l'hypertonicité explique la faible clonogénicité dans le milieu hypertonique. En effet, la plupart de cellules persistent sous forme de cellule solitaire lorsqu'elles sont cultivées à faible densité dans le milieu hypertonique DMEM-FCS. L'analyse par cytométrie après marquage à l'iodure de propidium a révélé que ces cellules sont très majoritairement en phase G0/G1 du cycle cellulaire (85%) alors que les cellules en phase S ont pratiquement toutes disparues. Par ailleurs, ils ont montré que le blocage des divisions cellulaires induit par l'hypertonicité est stable. En effet, après 7 jours de culture dans le milieu hypertonique, la remise des cellules en milieu hypotonique n'induit la prolifération que dans une faible fraction des cellules. Toutefois, un traitement par l'acide citrique et le glutathion coopère avec la remise en milieu hypotonique pour augmenter fortement la fraction des cellules proliférantes et l'efficacité de clonage des cellules.



Figure 5 : Schéma du modèle de dormance sur boîte plastique avec des cellules de cancer de la prostate

1.4.1.2. Mécanismes caractérisés

Des premières analyses ont montré l'implication dans la voie TGF- β /BMP dans la régulation de la dormance induite par l'hypertonicité. L'inhibition de cette voie par la surexpression ectopique de Smad7 (un SMAD inhibiteur) inhibe l'induction ou déstabilise la dormance et augmente ainsi l'efficacité de clonage en milieu hypertonique. A l'inverse, un traitement par l'activine A (une cytokine de la famille TGF- β) inhibe la clonogénicité dans la condition hypotonique. Il a été aussi montré que l'acide citrique et le glutathion, qui permettent de lever la dormance induite par l'hypertonicité, inhibent aussi l'effet inhibiteur de l'activine A sur la clonogénicité. Mais cet effet de l'activine A sur la clonogénicité est moins puissant que celui exercé par l'hypertonicité. Par ailleurs, la surexpression de Smad7 ne réprime que partiellement les effets de l'hypertonicité, ce qui suggère qu'il existe d'autre(s) voie(s) de signalisation impliquées dans la régulation de cette dormance induite.

L'inhibition de p53 par expression des formes mutantes dominantes négatives limite l'induction de la dormance par l'hypertonicité et promeut aussi la réversion de la quiescence. Mais ces effets sont encore moins forts que ceux induits par la surexpression de Smad7. Toutefois, une régulation spécifique de la dormance par ces voies de signalisation était suggérée du fait que ni l'inhibition de p53 ni l'inhibition de la voie TGF- β /BMP n'ont d'impact sur la clonogénicité des cellules LNCaP* cultivées dans la condition hypotonique.

Le phénomène de dormance cellulaire établi dans ce modèle présente des caractéristiques similaires à ceux observés *in vivo*. Il s'agit d'un blocage stable en phase G0/G1 qui est réversible par des stimulants appropriées. De plus, l'implication de la voie TGF- β /BMP et de p53 dans la régulation de cette dormance suggèrent des mécanismes communs avec la dormance des cellules souches ou des cellules cancéreuses *in vivo*. Par rapport aux autres modèles de dormance, il s'agit d'un modèle de grande maniabilité où la dormance est établie par une simple modulation de la tonicité du milieu de culture et de la densité cellulaire, ce qui facilite les analyses des mécanismes moléculaires impliqués.

1.4.2. Sujet du travail de thèse

Mon directeur de thèse, T.Tchénio, a suggéré que cette dormance induite ne consiste pas en un simple blocage passif de la prolifération mais devrait être associée à des mécanismes stabilisateurs particuliers. Mon travail de thèse a eu pour objectif d'analyser plus précisément les mécanismes moléculaires régulant ce phénomène de dormance des cellules de cancer de la prostate *in vitro* et leurs interactions. Nous avons voulu aussi analyser le rôle d'un paramètre important du modèle à savoir la densité cellulaire dans l'induction de la dormance. En parallèle, nous avons cherché à développer la portée du modèle en élargissant nos observations à d'autres lignées de cellule de cancer de la prostate et en recherchant d'autre(s) inducteur(s) de dormance.

2. RESULTATS

2.1. Article 1 : SMAD signaling and redox imbalance cooperate to induce prostate cancer cell dormancy

Objectif de l'étude

ll a été observé par T.Tchénio que la clonogénicité des cellules de cancer de la prostate est régulée par un phénomène de dormance cellulaire (Havard et al., 2011). La dormance est induite lorsque les cellules LNCaP* sont cultivées à faible densité cellulaire dans un milieu légèrement hypertonique. Des études préliminaires ont montré l'implication des voies de signalisation dépendantes des cytokines de la famille du TGF- β /BMP et de p53 mais le rôle de ces voies dans l'induction ou/et la maintenance de la dormance demeurait mal défini. L'objectif principal de notre première étude a été de caractériser de manière plus exhaustive les voies de signalisations contrôlant ce phénomène de dormance et leur dépendance à la densité cellulaire.

Stratégie de recherche

Notre stratégie a été d'abord d'établir par l'analyse en RT-qPCR une signature d'expression génétique caractéristique de l'état dormant. Une centaine de gènes impliqués dans de différents processus cellulaires (la régulation du cycle cellulaire, la réponse au stress, le processus de différenciation, la transition épithélio-mésenchymateuse, la progression tumorale) ont été criblés pour leur capacité à être modulés dans les cellules dormantes comparées à des cellules en croissance exponentielle. Les gènes de cette signature ont ensuite été utilisés comme autant de gènes rapporteurs endogènes pour caractériser les voies de signalisation régulant le phénomène de dormance. L'implication fonctionnelle des voies de signalisation candidates dans la dormance a été étudiée en analysant l'effet de leur inhibition ou de leur activation réalisées par des approches génétiques ou par des traitements pharmacologiques.

Résultats

Nous avons établi une signature d'expression génétique de la dormance comprenant une vingtaine de gènes dont l'expression est significativement régulée par le phénomène de dormance. Ces gènes sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et dans la réponse au stress (tels que CCNA2, CDKN1A et HMOX1) des marqueurs d'activation de la voie TGF- β /BMP (SMAD6, 7, ID1) et des activateurs de cette voie (GDF11, BMP4), des marqueurs de

différenciation (tels que KLK3, KRT19) et des marqueurs de cellules souches (tels que HES1 ou OCT4A). Cette signature s'est révélée spécifique de la dormance induite dans notre modèle car elle nous permettait de distinguer l'état dormant de l'état quiescent obtenue par la culture à haute confluence cellulaire. Par ailleurs, cette signature, outre qu'elle nous confirmait l'implication de la voie TGF- β /BMP, suggérait que les cellules dormantes étaient le siège d'un stress oxydatif. Nous avons donc étudié l'hypothèse que les voies de signalisation activées par les cytokines de la famille du TGF- β /BMP et par un déséquilibre rédox de la cellule pouvaient coopérer pour réguler le phénomène de dormance. Cette hypothèse a été amplement confirmée. Par ailleurs, nous avons observé une forte intrication de ces deux voies, puisque l'inhibition de l'une d'elles diminuait fortement l'induction de l'autre. Un autre résultat important de ce travail est la démonstration que l'activation d'un stress oxydatif et des voies du TGF- β /BMP suffisait à rendre compte de manière remarquable de la modulation de l'expression des gènes de la signature de dormance par le phénomène de dormance. Bien que d'autres voies de signalisations puissent aussi réguler ce phénomène de dormance l'ensemble de nos données semblaient explicables par l'activation conjointes de ces deux voies de signalisation.

Dans cette étude, nous avons également étudié le rôle de la densité cellulaire. De manière tout à fait étonnante, nous avons observé que la seule culture à faible densité cellulaire était suffisante pour moduler l'expression de l'ensemble des gènes de la signature de dormance avec un profil d'expression très semblable à celui de cellules dormantes si ce n'est une amplitude de modulation plus réduite. Nous avons montré que la culture à faible densité cellulaire suffisait à induire une activation des voies TGF- β /BMP et un déséquilibre rédox plus modérés que ceux observés dans les cellules dormantes. L'effet de l'hypertonicité semblait être réduit à amplifier ces voies pour déclencher le phénomène de dormance, l'hypertonicité ne présentant pas d'effets détectables sur des cellules cultivées à moyenne densité cellulaire. Il apparaît *a posteriori* de notre étude de la dormance inductible par les androgènes (article 2) que cette explication est probablement exacte, car nous y avons montré l'existence d'un niveau seuil pour le stress oxydatif afin de déclencher le phénomène de dormance.

SMAD signaling and redox imbalance cooperate to induce prostate cancer cell dormancy

Anh Thu Bui, Fanny Laurent, Maryline Havard, François Dautry, and Thierry Tchénio*

LBPA; UMR8113 ENSC - CNRS; Ecole Normale Supérieure de Cachan; Cachan, France

Keywords: cell proliferation, cell signaling, prostate cancer, redox regulation, SMAD transcription factor

Abbreviations: BSO, buthionine sulfoximine; CE, cloning efficiency; DMEM-FCS, Dulbecco Modified Essential Medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum and penicillin-streptomycin; LD_hyper, low cell density condition in DMEM-FCS medium; LD_hypo, low cell density condition in hypotonic medium made by addition of 25% water to DMEM-FCS; MD_hypo, medium cell density condition in hypotonic medium made by addition of 25% water to DMEM-FCS; MD_hyper, medium cell density condition in DMEM-FCS medium (slightly hypertonic); NAM, Normalized Averaging Method; ARM, Averaging Ratio Method.

Metastasis involves the dissemination of single or small clumps of cancer cells through blood or lymphatic vessels and their extravasation into distant organs. Despite the strong regulation of metastases development by a cell dormancy phenomenon, the dormant state of cancer cells remains poorly characterized due to the difficulty of *in vivo* studies. We have recently shown *in vitro* that clonogenicity of prostate cancer cells is regulated by a dormancy phenomenon that is strongly induced when cells are cultured both at low cell density and in a slightly hypertonic medium. Here, we characterized by RT-qPCR a genetic expression signature of this dormant state which combines the presence of both stemness and differentiation markers. We showed that both TFGβ/BMP signaling and redox imbalance are required for the full induction of this dormancy signature and cell quiescence. Moreover, reconstruction experiments showed that TFGβ/BMP signaling and redox imbalance are sufficient to generate a pattern of genetic expression displaying all characteristic features of the dormancy signature. Finally, we observed that low cell density was sufficient to activate TGFβ/BMP signaling and to generate a slight redox imbalance thus priming cells for dormancy that can be attained with a co-stimulus like hypertonicity, most likely through an increased redox imbalance. The identification of a dual regulation of dormancy provides a framework for the interpretation of previous reports showing a restricted ability of BMP signaling to regulate cancer cell dormancy *in vivo* and draws attention on the role of oxidative stress in the metastatic process.

Introduction

Metastases originate from the dissemination of single or possibly small clumps of cancer cells through blood or lymphatic vessels and are clonal cell populations resulting from the proliferation of an individual cancer cell. Experimental models suggest that, following dissemination, cancer cells that survive can enter into a reversible dormant state that strongly limits the development of metastases. ¹⁻⁵ In humans, the phenomenon of dormancy also accounts for metastatic recurrences appearing up to several decades after the cure of the primary cancer, as observed in breast and prostate cancers, some leukemia and melanoma.⁶⁻¹¹ These recurrences are also in agreement with the observation that dormant cells are more resistant to chemotherapy than the primitive cancer cells, which makes them very difficult to eradicate.¹²⁻¹⁴ Dormancy thus appears as both a barrier to metastasis and as a mechanism of resistance to chemotherapy, and a better understanding of the underlying mechanisms is warranted in order to control the metastatic process. Several

signaling pathways have been implicated in the regulation of disseminated cancer cell dormancy in vivo including BMP/TGFB signaling. These pathways could allow determining how cell intrinsic features and environmental interactions can lead to metastasis development.¹⁵⁻²² However, a detailed analysis of dormancy has been hampered by the challenge of identifying and studying dormant cells in vivo. Therefore, models of dormancy in cell culture have been developed which rely on the parallel between metastasis in vivo and the clonogenic capacity in vitro, i.e. the ability of isolated cells to give rise to a clonal population. Two major in vitro models have been set up with breast cancer cell lines, which differ by the cell culture conditions.^{23,24} These studies have focused on the relationship between the dormant state and distinctive features linked to epithelial-mesenchymal transition (EMT) including cytoskeleton rearrangement, E cadherin expression and the influence of extracellular matrix components.^{23,25-28} These studies linked dormancy escape in cell culture to acquisition of mesenchymal traits by breast cancer cells including loss of E-cadherin expression, but the mechanisms

^{*}Correspondence to: Thierry Tchénio; Email: ttchenio@ens-cachan.fr Submitted: 11/11/2014; Revised: 01/22/2015; Accepted: 01/27/2015 http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1014145

involved in dormancy entry and maintenance remain largely elusive. Additional investigations are required to characterize cancer cell dormancy and to distinguish it from other forms of quiescence in a G0 phase of cell cycle such as those induced by contact inhibition and/or restricted nutrient availability.

We have recently developed a new model of cell dormancy in vitro based on the LNCaP prostate cancer cell line, a prevalent paradigm for the study of androgen-dependent human prostate cancers. In this model, about 99% of the cultured cells can be induced to enter into a reversible dormant state when they are cultured at low cell density and in a slightly hypertonic growth medium such as Dulbecco Modified Essential Medium supplemented with 10% fetal calf serum.²⁹ We showed that dormancy drastically limits prostate cancer cell clonogenicity. Indeed, changing the cell culture medium from RPMI to DMEM decreased the clonogenicity by up to 3 orders of magnitude without significantly altering cell viability. During this initial characterization we observed that 2 of the signaling pathways that are involved in normal stem cell dormancy, TP53 and TGFB/BMP, also played a role in our cellular model but could not fully account for the control of dormancy. In the present work, we exploited our model to generate a gene expression signature of dormant cells in order to explore in more details the signaling pathways regulating dormancy.

Results

Characterization of a genetic expression signature of the dormant state by RT-qPCR

We have previously shown that the association of a low cell density (< 160 cells/cm2) and a slightly hypertonic medium such as Dulbecco Modified Essential Medium supplemented with fetal calf serum (DMEM-FCS) efficiently induces the entry into dormancy of LNCaP* cells.²⁹ To characterize the biological state of these cells we used RT-qPCR to analyze the expression of an initial panel of 84 genes involved in cell cycle regulation, prostate epithelial cell differentiation, Epithelial-Mesenchymal Transition and prostate cancer progression (the complete list of genes investigated in this study is presented in Fig. S1). We first compared the expression profile of dormant cells (low cell density in DMEM-FCS abbreviated LD_hyper) with that of cells in exponential growth conditions (medium cell density in DMEM-FCS+25% water, abbreviated MD hypo). We also measured variations of mRNA species levels for intermediate conditions (at low cell density in hypotonic medium (LD_hypo), and at medium cell density in hypertonic medium (MD_hyper) to assess the effects of cell density and medium tonicity separately.

As displayed in **Figure 1A** (red bars) 21 genes were initially found to display a significant (p value of Student's t test inferior to 0.05) and more than a twofold change in their mRNA levels in dormant cells (LD_hyper) as compared to exponentially growing cells (MD_hypo). Notably, we observed in dormant cells a 3fold decrease in the mRNA level of *CCNA2* encoding cyclin A2 and a 11 fold increase in the mRNA level of *CDKN1A* mRNA encoding the p21^{Cip1/Waf1} cyclin-dependent kinase inhibitor, in agreement with their growth-arrested state. Another salient feature was the increased mRNA levels of Krüppel-like factors (KLF4, 6, 10) -that are involved in normal prostate cell growth inhibition and differentiation- and of markers of differentiation including the androgen receptor (AR), the prostate specific antigen (KLK3), the cytokeratin 19 (KRT19) and E-Cadherin (CDH1). By contrast, KRT18 mRNA level was unchanged, further indicating that the dormant LNCaP* cells resemble normal prostate epithelial luminal cells at an intermediate or late differentiation stage. mRNA for cytokeratin 5 (KRT5), CD44 and TP63 levels were below the detection threshold and only extremely low levels could be detected for CD133 (data not shown). Interestingly, several of the up-regulated genes were associated with stemness like KLF4, OCT4A, ID1, HES1 and BMP4. It is noteworthy that up-regulation of stemness markers was not linked to EMT since only an extremely low and stable level of CDH2 mRNA encoding N-cadherin protein (that was undetectable by Flow Cytometry analysis; data not shown), a slight CDH1 mRNA increase (Fig. 1A) or non-significant changes in the mRNA levels of vimentin, SNAI2 and ZEB1 were observed in dormant cells (data not shown). Finally, this signature showed the induction of genes associated with cellular stress (PIG3, MDM2, GADD45A and also CDKN1A) or activation of the TGFβ/BMP signaling pathways (BMP1, BMP4, GDF11, SMAD6, SMAD7, ID1) or repression of the Hedgehog signaling pathway (PTCH1). It is noteworthy that BMP4 can activate SMAD1, 5, 8 whereas GDF11 can activate SMAD2 and 3 and BMP1 is an astacin protease that can activate both BMP4 and GDF11 proteins.³⁰ The subsequent analysis of transfected cells and their control populations confirmed these initial observations and established their robustness (see Fig. 4B).

Interestingly, many of the mRNA changes observed in dormant cells were already present, albeit on a smaller scale, in cells under growth permissive conditions but at low density LD_hypo; blue bars in **Fig. 1A**. By contrast, hypertonicity had a limited impact on gene expression in cells at medium density (aquamarine bars) but strongly increased the changes associated with low cell density. These results are in agreement with our previous observation that LNCaP* cells have similar growth rates in DMEM-FCS and DMEM-FCS + 25% water when cells were cultured at medium cell density.²⁹

Specificity of the dormancy signature

To assess whether the pattern of expression of the 21 genes characterized above could constitute a signature of the dormant state we first compared it with the corresponding pattern of growth-arrested LNCaP*cells obtained by culturing cells in DMEM-FCS up to confluence without culture medium change for the last 3 d. Growth arrest was confirmed by cell cycle analysis with propidium iodide staining and under these conditions the G0/G1 population increased from $60,6 \pm 3.2$ % (average \pm s.d.; n = 4) in exponentially growing cells to 94.0 ± 2.9 % (p value of Student's t test $<10^{-5}$; see Fig. 1B). As shown in Figure 1C (green bars), confluent growth-inhibited cells displayed a strong decrease of *CCNA2* mRNA level in agreement with the growth arrest. We also observed a significant induction of *GADD45A*



Figure 1. Characterization of a specific genetic expression signature of dormant LNCaP* cells. (**A**) RT-qPCR analysis of the variations of mRNA species levels according to cell culture conditions. Relative mRNA levels were averaged using the Averaging Ratio Method (ARM), with all mRNA levels reported to those measured under MD_hypo conditions in parallel experiments. Three to 5 independent experiments were performed with cells cultured in parallel under LD_hyper, LD_hypo, MD_hypo and 2 under MD_hyper conditions. (**B**) Cell cycle analysis of LNCaP* cells cultured under exponential growth (MD_hypo) or highly confluent conditions (confluency; see Experimental procedures). Cells were analyzed by Flow Cytometry after propidium iodide staining. A two-step gating procedure using Side SCattering-Height versus Forward SCattering-Height (data not shown) followed by pulse Area vs. pulse Width FLuorescence (FL2-A-versus FL2-W) was performed to eliminate cell doublets. Gated region is indicated on the FL2-A-versus FL2-W dot plot representation. Next to dot plots are fluorescence histograms. One representative experiment is shown. (**C**) Comparison of the patterns of mRNA level variations between confluent and dormant cells. Relative mRNA levels were averaged using the Normalized Averaging Method (NAM with levels under MD_hypo conditions taken as unity) from 2, 3, and 5 or 6 cell cultures experiments for confluent, dormant (LD_hyper conditions) and exponentially growing (MD_hypo) cells, respectively. Data are presented as mean \pm s.d., with statistical significance indicated for the differences in mRNA levels between cells cultured under exponentially growing (MD_hypo) and under dormancy-inducing (LD_hyper) or permissive (LD_hyper) conditions (**A**), or between cells cultured under dormancy-inducing and confluent conditions (**B**); *, *P* < 0.1; **, *P* < 0.05; ***, *P* < 0.01; ****, *P* < 0.002. See the Materials and Methods section for more details on the averaging methods.

and *CDKN2A* (encoding p16^{INK4A}) genes but a complete lack of induction for all others genes of the dormancy signature. This indicated that the proposed genetic signature reflected cellular physiology beyond the growth-arrest.

Extension of the dormancy signature to VCaP cancer cells

As a second example of prostate cancer cell line, we chose the VCaP cell line that was established from a vertebral metastatic lesion. Like LNCaP cells, VCaP cells harbor a functional androgen receptor and markers of the luminal epithelial phenotype as in majority of prostate cancers in human. However, at variance with LNCaP cells, VCaP express a mutated TP53 gene and are more metastatic. As shown in Figs. S2A and B, clonogenicity of VCaP cells was strongly dependent on the tonicity of the culture medium with about one thousand fold difference in cloning efficiency between cells cultures under LD hyper and LD hypo conditions. RT-qPCR analysis revealed a strong homology in the pattern of gene expression between LNCaP* and VCaP cultured under dormancy inducing conditions (LD_hyper) (Figs. S2C and S3). In particular we observed a down regulation of CCNA2 and an up regulation of CDKN1A. Markers of cell differentiation like KLK3, KRT19, CDH1 were upregulated along with KLF4. OCT4A as well as genes involved in TGF β /BMP signaling were also induced under culture in LD_hyper conditions. Most salient differences were a lack of GADD45A, AR and KLF10 induction along with reduced inductions of HES1 and PTCH1, but a stronger induction of KLF4 and ID1. Finally, the same relationship was observed between gene expression, cell density and medium tonicity as in LNCaP* cells: nearly all of the mRNA changes observed in dormant cells were present at a smaller scale in cells under growth permissive conditions but at low density (LD hypo). Hypertonicity had a limited impact on gene expression in cells at medium density but strongly increased the changes associated with low cell density. Overall, VCaP cells displayed the same essential features as observed in LNCaP* cells.

SMAD signaling pathway is activated in the dormant state

An important role of the TGF β /BMP signaling pathways in dormancy was previously suggested by our observation that constitutive overexpression of murine Smad7, an inhibitory Smad, rendered LNCaP* cells partially refractory to dormancy induction by low cell density and hypertonicity.²⁹ Similar results were observed by expressing a small hairpin RNA targeting SMAD4 (sh-SMAD4), encoding a binding partner of regulatory SMAD or by treating LNCaP* cells with pharmacologic inhibitors of BMP and, to a lesser extent, TGF β receptors (Figs. S4 and S5). To further investigate the role of TGF β /BMP signaling pathways in gene expression, we transduced LNCaP* cells with pTRIP vectors allowing the doxycycline-inducible expression of murine inhibitory Smad7 or human BMP4 cDNA, the empty vector being used as a control. In the presence of doxycycline, the intensity of the band detected by Western blot using a pan-species antibody and corresponding to SMAD7 and Smad7 was 2.4 \pm 0.5 times higher (p = 0.02) in *Smad7* transduced cells, (Fig. 2A) left panel). As pTRIP is a potent expression vector yielding a high level of mRNA accumulation (data not shown), this suggested that Smad7 expression is tightly regulated at a post transcriptional level, in line with the observation that the ten-fold increase of endogenous SMAD7 mRNA in dormant cells (Fig. 1A) did not result in a significant increase in SMAD7 protein level (Fig. 2A). Note that the RT-qPCR assay is specific of the human SMAD7 and does not detect the transduced murine Smad7 mRNA. Nonetheless, murine Smad7 expression under dormancy-inducing conditions increased CCNA2 mRNA accumulation and decreased mRNA accumulation of most others genes of the dormancy signature (Fig. 2B). Notably, mRNA levels for well-characterized direct targets of the TGFB/BMP signaling pathways such as SMAD6, 7 and ID1 were decreased by more than 50%, as were those for KRT19, GADD45A, PTCH1, KLF10 and KLK3. Similar results were obtained upon depletion of endogenous SMAD4 using sh-SMAD4 under dormancyinducing (LD_hyper) conditions (Fig. S4B).

To further address the role of TGFB/BMP signaling in the generation of the dormancy signature, we analyzed the effect of ectopic expression of BMP4 in exponentially growing pTRIP-BMP4 transduced cells (MD_hypo). As BMP4 signaling activates only SMAD1, 5 and 8 but not SMAD2 and 3 like GDF11 or TGF β , we also analyzed its synergy with activin α , taken as a surrogate for SMAD2 and 3 activation, that was previously shown to induce cellular quiescence of LNCaP* cells treated at low cell density.²⁹ Most of the genes that were robustly repressed upon Smad7 or sh-SMAD4 overexpression under dormancy-inducing conditions were strongly induced upon BMP4 or BMP4+activin α cell stimulation under exponential growth conditions (Fig. 2C). These included the classical targets of BMP signaling (SMAD6, 7 and ID1) and others genes like KRT19 and KLK3. CCNA2 was strongly repressed only by co-stimulation with BMP4+activin α , activin α at 50 ng/ml having only a small effect on mRNA accumulations under MD_hypo conditions (Fig. 2D). However, induction of CDKN1A, GADD45A and *PTCH1* expression by BMP4+ activin α at medium cell density was significantly lower than in dormant cells suggesting the implication of other signaling pathways, besides SMAD signaling in the regulation of these 3 genes (see below). Overall, these data showed that SMAD signaling was a major contributor to the dormancy signature.

Redox imbalance is a component of the dormant state

The limited induction of *PTCH1*, *CDKN1A* and *GADD45A* genes suggested that hypertonicity activated other signaling pathways beside SMAD. The previous observation of an induction of *PIG3*, *GADD45A*, *CDKN1A*, *KLF4* and 6 in response to cellular oxidative stress suggested the involvement of a redox imbalance in the establishment of cellular dormancy. Although we initially reported that glutathione alone only partially suppressed dormancy in LNCaP* cells,²⁹ subsequent studies with glutathione (2 to 8 mM) and with others thiol-based antioxidants like N-acetyl-cysteine (NAC, 2 to 8 mM) or dithiothreitol (200 μ M) showed that they induced a 40–100-fold increase in cloning efficiency under LD_hyper conditions when added at the beginning of the assay (data not shown and **Fig. 3A and B**). Thus, thiol-based antioxidant supplementation effectively blunted the effects of



Figure 2. Implication of SMAD signaling in LNCaP* dormancy. (**A**) Western Blot analysis of total smad7 expression (endogenous human SMAD7 and transduced murine Smad7) in cell populations transduced with pTRIP-control and pTRIP-mSmad7 cultured under exponentially growing (MD_hypo) or dormancy inducing (LD_hyper) conditions. Cells were grown in the presence of doxycycline to induce pTRIP expression and a polyspecific monoclonal antibody was used. The arrow indicates the common expected size for SMAD7 and Smad7 proteins (46 kDa) while a star indicates bands resulting from non-specific antibody hybridizations. Two identically processed parts of the same gel have been regrouped for the figure. (**B**) Regulation of mRNA species accumulation under dormancy-inducing conditions by ectopic *Smad7* overexpression. Ratios of mRNA species levels measured by RT-qPCR between *Smad7* and control-transduced cell populations cultured under LD_hyper conditions were derived from 2 couples of cell populations. Statistical significance of the effects of *Smad7* overexpression is indicated. (**C**) Regulation of mRNA species accumulation by BMP4 and Activin α signaling in cells cultured under MD_hypo conditions. Relative mRNA levels determined by RT-qPCR were averaged with NAM (with levels under MD_hypo conditions taken as unity) from 2 and 4 independent pTRIP-BMP4 and pTRIP-control transduced cell populations respectively, cultured under MD_hypo conditions α at 50 ng/ml as indicated. D) Regulation of mRNA species accumulation by activin α and control cells is indicated. D) Regulation of mRNA species accumulation servery in a and control cells is indicated. D) Regulation of mRNA species accumulation servery were measured by RT-qPCR from 2 control and 2 treated cell populations respectively. Note that mRNA level of ID1, a target gene of BMP signaling, was decreased by activin α addition. Data are presented as mean \pm s.d., with significance of mRNA levels variations indicated as in **Figure 1**.



Figure 3. Modulation of dormancy by glutathione (GSH). (**A**) Glutathione supplementation reverse the effect of hypertonicity on the cloning efficiency of LNCaP* cells. Statistical significance of the effects of glutathione addition is indicated. (**B**) Pictures of representative cloning efficiency assays for the indicated cell culture conditions. (**C**) LNCaP* cell cloning inhibition by Buthionine Sulfoximine (BSO) under hypotonic conditions and its reversal by glutathione supplementation. Cloning efficiency of LNCaP* cells cultured in hypotonic conditions (LD_hypo) in the presence of BSO and/or Glutathione as indicated were determined. Data are averaged from 2 independent cell experiments and are presented as mean \pm s.d., with statistical significance indicated for the effects of glutathione supplementation. (**D**) Pictures of cells after 13 d of culture under LD_hypo conditions in the presence of none, GSH 8mM, BSO 0.25 mM and BSO plus GSH. (**E**) Glutathione supplementation reverses the gene expression signature of dormancy. Relative mRNA levels were calculated as in **Fig. 1A** as the ratio of mRNA levels species measured in LNCaP* cell populations cultured under LD_hyper conditions in the presence of 4 mM glutathione and in MD_hypo conditions. Data are averaged from 3 cell culture experiments. Relative mRNA levels under LD_hyper and LD_hypo conditions are those of **Figure 1**. Statistical significance of the differences between dormant and glutathione-treated cells is indicated as in **Figure 1**.



Figure 4. Oxidative stress mediated by hydrogen peroxide cooperates with BMP4/activin α signaling to induce the dormancy gene expression signature in LNCaP* cells cultured at middle cell density in hypotonic medium (MD_hypo). (**A**) Effect of H₂O₂-induced oxidative stress on mRNA species accumulation in LNCaP* cells cultured under MD_hypo conditions. Inset: Dose response of the cloning efficiency of LNCaP* cells to H₂O₂. Data are average of 2 cloning efficiency assays made with 10³ and 2 × 10³ cells in 6 cm diameter dish, each in duplicate. Histogram: Effects of hydrogen peroxide treatment on mRNA species accumulation. Relative mRNA species levels were averaged with NAM from 2 parallel cell culture experiments. Statistical significance of the effects of H₂O₂ addition is indicated. All Data are presented as mean ± s.d., with significance indicated as in **Figure 1**. (**B**) Comparison of the mRNA accumulation patterns generated by activation of BMP4/ activin α signaling plus H₂O₂ treatment and by dormancy. Relative mRNA levels were averaged with NAM from 2 independent cell populations transduced with pTRIP-*BMP4* and cultured under MD_hypo conditions in the presence of doxycycline and 4 to 6 independent cell populations transduced with pTRIP-control and cultured under MD_hypo conditions in the presence of doxycycline. Data were calculated using the normalized averaging method and are presented as mean ± s.d., and stars indicate statistical significance of mRNA level variations compared to basal levels measured for pTRIP-control transduced cell populations cultured under MD_hypo conditions under MD_hypo conditions in the presence of doxycycline.

hypertonicity, enabling similar cloning efficiencies in LD_hyper and LD_hypo. Inversely, we found that treatment with buthionine sulfoximine (0.05 to 0.5 μ g/ml), an inhibitor of glutathione synthesis strongly decreased cloning efficiency under LD_hypo conditions (**Fig. 3C**). For doses inferior or equal to 0.25 μ g/ml, isolated cells remained alive for at least 2 weeks suggesting an induction of cell quiescence in a large fraction of the seeded cells (Fig. 3D). Importantly, this inhibitory effect of BSO was reversed if glutathione (8 mM) was simultaneously added (Fig. 3C and D). Altogether, these experiments showed that glutathione levels strongly determined cell fate. We therefore investigated the effects of glutathione supplementation on the establishment of the dormancy signature for cells cultured under LD_hyper growth conditions. As shown in Figure 3E, early

glutathione treatment increased mRNA accumulation for *CCNA2* and decreased mRNA accumulation for all others genes of the dormancy signature, their mRNA levels becoming similar or even lower to those obtained at low cell density in hypotonic conditions. Thus the effects of hypertonicity on the dormancy signature could be suppressed by an early antioxidant treatment.

As ROS are also involved in physiological cell signaling without implying any true redox imbalance, we searched for an activation of the NF-E2 p45-related factor 2 (NRF2) transcription factor, since it is inactive under homeostatic conditions but is activated in response to redox imbalance through thiol modification of its inhibitor KEAP1.³¹ Accordingly, we measured the mRNA levels of 3 well-characterized targets of NRF2, the Aldoketo reductase family 1 member C1 (AKR1C1), the Heme Oxygenase 1 (HMOX1), and the NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1) genes. A 74, 10 and 3 fold change in the mRNA levels of these genes was observed in cells plated under LD_hyper conditions, respectively (Fig. 3E, right). An induction of these genes was also observed in VCaP cells plated under LD_hyper conditions (Figs. S2C and S3). As expected, early glutathione treatment strongly decreased the mRNA accumulations of these genes confirming the dependence of their induction on redox imbalance (Fig. 3E, right). This confirmed that a redox imbalance played an essential role in the setting-up of the dormant state.

To further assess the role of redox imbalance in regulation of gene expression in dormant cells, we investigated the effects of an oxidative stress on gene expression in cells cultured under exponential growth conditions in hypotonic medium (MD_hypo). Here we chose to treat cells with hydrogen peroxide since it is a natural oxidant produced by cellular O2 metabolism, and it readily oxidizes thiols to their disulfide or sulfonic acid derivatives. Under LD hypo conditions a strong inhibition of LNCaP* cell clonogenicity was observed when 100 µM H₂O₂ was added at the beginning of the assay (Fig. 4A, inset). We therefore performed RT-qPCR analyses on LNCaP* cells cultured under MD_hypo conditions in the presence of 100 μ M H₂O₂. After two days the mRNA levels of all cellular stress markers (CDKN1A, PIG3, GADD45A, KLF4, KLF6, HMOX1, AKR1C1, NQO1) were strongly induced while the CCNA2 mRNA was repressed (Fig. 4A). In addition, expression of BMP1, BMP4, KLF10, OCT4A, MDM2 was increased while that of KRT19 was down-regulated. Thus in exponentially growing cells a redox imbalance induced the expression of a subset of the dormancy signature genes.

Reconstitution of the dormancy signature by reconstruction experiments

Comparison of mRNA accumulation patterns in hydrogen peroxide-treated cells (Fig. 4A) and pTRIP-*BMP4* transduced cell populations plus exogenous activin α (Fig. 2C) suggested that the association of these stimuli could generate a complete dormancy signature. This was tested by analyzing the mRNA accumulation in pTRIP-*BMP4* transduced cells populations cultured under MD_hypo conditions in the presence of activin α and hydrogen peroxide. Remarkably, cell stimulation by activin α , BMP4 and hydrogen peroxide induced a pattern of mRNA accumulation almost indistinguishable from that of dormant cells (Fig. (4B) in cells under growth-permissive conditions (MD_hypo). This response included enhanced mRNA accumulation of both differentiation and stemness markers and a strong down regulation of CCNA2 mRNA. The main discrepancies were BMP1, PTCH1 and HMOX1. The lack of BMP1 mRNA up regulation by BMP4 + Activin α + H₂O₂ might be related to the artificial stimulation by BMP4 + activin α as this mRNA species seemed to be decreased under these conditions (Fig. 2C). The high induction of PTCH1 mRNA in dormant cells was cellspecific as it was lower in VCaP cells (see Fig. S2C). Finally the lower accumulation of HMOX1 mRNA in dormant cells is clearly linked to some quantitative differences in the effects of hydrogen peroxide and hypertonicity (see Fig. 4A). Thus, the similarity in gene expression signatures suggested that signaling elicited by members of the TGFB/BMP family and redox imbalance could account for the key features of the dormant state.

SMAD signaling and redox imbalance induction by low cell density

As noted in Figure 1A, and Figures S2A and S3, many features of the dormancy signature were already present, albeit at a lower level, in cells cultured at low density without hypertonic conditions. As several of these genes, including SMAD6, 7, ID1 and *KRT19* were also regulated by the BMP/TGF β signaling pathways during dormancy this suggested that this pathway was at least partially activated by culture at low density. To investigate this point, we tested the effects of over-expressing the inhibitory murine Smad7 on gene expression of cell plated at low density under hypotonic conditions (LD_hypo). As shown in Figure 5A, Smad7 overexpression inhibited the expression of endogenous SMAD6, 7, ID1, PTCH1 and KRT19 genes normally observed in cells at low cell density. Depletion of SMAD4 by expressing sh-SMAD4 confirmed the requirement of SMAD signaling in the induction of these genes by the mere culture at low density and further suggested that induction of HMOX1, GADD45A, KLK3, HES1, BMP4 and to a lesser extent OCT4A was also dependent upon this signaling pathway (Fig. S4C). Overall, this supported that SMAD signaling is activated by cell culturing at low cell density.

We also observed that glutathione treatment under LD_hyper cell culture conditions decreased mRNA accumulation of a few genes including HES1, SMAD7, BMP4 and also NRF2-targets to their minimal levels (corresponding to MD_hypo conditions) suggesting that their mRNA induction required cell signaling triggered by redox imbalance. Since these genes were also induced by culture at low cell density (LD_hypo), this suggested that low cell density was sufficient to promote some redox imbalance. To assess this possibility, we analyzed the effects of glutathione treatment on mRNA accumulation of these genes in cells cultured under LD_hypo conditions. Data on Figure 5B indicates that glutathione treatment significantly inhibited mRNA accumulation of these genes under LD_hypo conditions. This strongly suggested that the mere culture at low cell density could induce some redox imbalance leading to the expression of these genes. Moreover, the strong inhibition of BMP4 and SMAD7



Figure 5. Activation of SMAD signaling at low cell density and contribution of ROS signaling. (A) Smad7 overexpression changes the gene expression profile of LNCaP* cells under LD_hypo conditions. Ratios of mRNA species levels measured by RT-qPCR in pTRIP-mSMAD7 and pTRIP-control transduced cell populations cultured under LD_hypo conditions were averaged from 2 experiments using independent cell populations. Stars indicate significance of the decreased mRNA species accumulation upon murine Smad7 overexpression. (B) Glutathione supplementation reduces the activation of SMAD signaling at low density. Relative mRNA levels measured by RT-qPCR under LD_hypo, LD_hypo+glutathione and MD_hypo conditions were averaged from 4-5, 2 and 7-9 cell culture experiments, respectively. Stars indicate statistical significance of the difference in mRNA levels between cells cultured in LD_hypo and LD_hypo+glutathione. (C) Lack of additive effects between Smad7 overexpression and glutathione treatment on cloning efficiency. Cloning efficiency of pTRIP-control and pTRIPmSmad7 transduced cell populations were measured under the indicated cell culture conditions. Data were averaged from 2 to 5 experiments made with 2 independent control and 2 independent Smad7 transduced cell populations processed in parallel. Stars indicate significance of the differences in cloning efficiency. Data are presented as mean \pm s.d.

expression by glutathione suggested that the redox imbalance associated with a low cell density could be in part responsible for the activation of TGF β /BMP signaling. Accordingly, either glutathione addition and murine Smad7 overexpression significantly increased cloning efficiency under both LD_hyper and LD_hypo conditions but their association had no additive effects (Fig. 5C).

To further ascertain the above conclusions, we reasoned that if TGFB/BMP and redox imbalance signaling were the main signaling pathways, both activated under LD_hyper and LD_hypo conditions although at different intensities, then the patterns of mRNA accumulation for cells cultured under these 2 conditions should be correlated. Therefore, we calculated the Pearson linear correlation coefficients between the patterns of mRNA level variations measured in cells grown under LD_hyper, LD_hypo, MD hyper (exponential) and confluent growth conditions as described in the Methods section using expression data in Figure S3. A high degree of correlation (r = 0.94; n = 24 genes; p <0.0001) was indeed observed for LNCaP* cultured under LD_hyper and LD_hypo. By contrast, correlation coefficient values did not reach significance when comparing mRNA level variation patterns for cells cultured under LD_hyper and MD_hyper (r = 0.05; n = 24; p = 0.81) or LD_hyper and confluent (r = 0.05; n = 24; p = 0.81)0.07; n = 20; p = 0.76) conditions. This also held true for VCaP cells for which the correlation coefficient reached 0.95 (n = 23 genes; p < 0.001) between LD_hyper and LD_hypo conditions but did not reach significance when comparing LD_hyper and MD hyper conditions. Of note, because this test measured linear correlations, this indicated that cellular states reached under LD_hyper and LD_hypo conditions were highly related. And indeed, we calculated that there is on average a 1.90 ± 0.82 (n = 24) and 1.93 ± 0.67 (n = 23) fold change in the mRNA levels between LD_hypo and LD_hyper conditions for genes of the dormancy signature in LNCaP* and VCaP cells, respectively (geometric means \pm s. d. calculated from data in Fig. S3).

Discussion

In this study we exploited our ability to induce a stable but reversible dormant state in cultured prostate cancer cells²⁹ to generate a genetic expression signature of the dormant state in order to identify the signaling pathways regulating dormancy.

Respective contribution of low cell density and hypertonicity to the induction of the dormant state

There are 2 distinct requirements to induce dormancy in our cellular model: low cell density and exposure to a slightly hypertonic medium (Fig. 6). A requirement for low cell density has been previously observed in a model of breast cancer cell dormancy in culture,²⁶ and at least several dormant cells *in vivo*, including normal haematopoietic stem cells,³² cancer cells,^{2-5,33} or circulating memory B or T lymphocytes display very few if any homotypic cell interactions. Here we observed that low cell density was sufficient to activate the BMP/TGF β signaling pathway and to modulate the mRNA level of most genes of the dormancy signature including ID1, SMAD7, KRT19, HES1 and



Figure 6. Schematic representation of the signaling pathways involved in cell dormancy. (**A**) Cell signaling pathways activated by low cell density under clonogenic conditions (i. e. in isotonic or slightly hypotonic culture medium). Under these conditions, a mild activation of BMP/TGFβ (**Fig. 1A**, **5A** and **Fig. S4C**) and redox imbalance (**Fig. 1A** and **5B**) signaling pathways is observed, redox imbalance also contributing to the activation of BMP/TGFβ signaling (**Fig. 5B**). (**B**) Reinforcements of these signaling pathways under dormancy-inducing conditions in slightly hypertonic medium. The main effect of hypertonicity is to amplify redox imbalance and BMP/TGFβ signaling (**Fig. 3, Fig. 2B** and **Fig. S4B and C**) thus increasing the expression level of the dormancy gene expression signature that is already activated in cells plated at low density but in hypotonic or isotonic medium.

BMP4 (**Fig. 5A** and **Fig. S4C**). The BMP/TGFβ pathway has been previously implicated in restricting cancer metastasis development.¹⁵⁻²⁰ Thus, it has been reported that BMP7 could inhibit formation of bone but not loco-regional lymph node metastases by human prostate cancer cells inoculated in nude mice.¹⁷ In a subsequent study, expression of the BMPR2 receptor (that can bind BMP4 or BMP7) in prostate cancer cells was inversely correlated with bone metastasis and recurrence in men and required for the quiescence of cancer stem cells.¹⁵ Finally, BMP signaling was shown to modulate dormancy of human breast cancer cells.^{16,19} These observations and those, numerous, implicating the BMP/TGFβ signaling pathway in the control of normal stem cells in different tissues indicate the relevance of our *in vitro* experimental approach to decipher the control of dormancy.

Importantly, we report that another role of low cell density is to generate a slight redox imbalance that is important for gene induction at low cell density. Notably, activation of the BMP/ TGFB pathway by culture at low density is markedly reduced in the presence of glutathione as indicated by the expression of BMP4, SMAD7 and HES1 (Fig. 5B) establishing that these 2 pathways are coupled (Fig. 6A). As to the role of the second stimulus, hypertonicity (Fig. 6B), one striking result of our analysis is that it mainly enhances the redox imbalance of cells cultured at low density while having no significant effect on cells at medium density. This enhanced redox imbalance reinforces a program already expressed by cells plated at low density. This translates into highly similar patterns of gene expression between LD_hypo and LD_hyper cells, which is apparent through a Pearson correlation coefficient of 0.94. Consequently, genes of the dormancy signature are expressed on average twice as much in LD_hyper than in LD_hypo cells. These observations could mean that entry

into dormancy requires a threshold level of activation of the dormancy inducing pathways that is reached in the overwhelming majority of the cells only when low cell density is associated with pro-oxidant condition (Fig. 6B). This also suggests the possible presence of dormant cells in cultures at low density under permissive conditions (LD-hypo; see Fig. 6A). This is compatible with our observations that conditions that can induce exit from dormancy in hypertonic medium (glutathione treatment, Smad7 or sh-SMAD4 ectopic expression or CDKN1A down regulation) increase modestly but significantly cloning efficiency under permissive conditions (Figs. 3A, 5C, Fig. S4A, and data not shown). In any case, the similarity between the gene expression profiles in LD_hypo and LD_hyper conditions indicates a crucial role of low cell density in priming cells for dormancy. Moreover, the increased redox imbalance provides a molecular basis for the role of hypertonicity which will warrant further investigation. As several thiol-based antioxidants but not sodium ascorbate, tocopherol acetate or phenol derivatives are effective to counterbalance the effects of hypertonicity (Fig. 3A, B and data not shown) oxidation of cellular thiols should be involved. TP53 is one of the multiple cellular targets regulated by thiol modification ^{34,35} and we have previously observed a significant role of TP53 of dormancy.²⁹ However, TP53 alone cannot account for the importance of the redox imbalance since its impact on the number of dormant cells is only modest. Moreover, VCaP cells which express a dominant-negative TP53 protein (R248W mutation, ref.³⁶) enter into dormancy like LNCaP cells and express a very similar gene expression signature (Figs. S2 and S3) indicating that the p53 pathway is not essential for dormancy. Others signaling pathways modulated by hypertonicity in a thiol sensitive manner are currently investigated.

BMP/TGF β and redox imbalance signaling are necessary and sufficient to establish a dormant state

We found that both signaling pathways were required for establishment of the dormant state since their disruption upon Smad7 or sh-SMAD4 overexpression (Fig. 5C and Fig. S4A), treatment with pharmacologic inhibitors of BMP/TGFB receptors (Fig. S5) or antioxidant treatment (Fig. 3A, B and data not shown) increases cloning efficiency under dormancy-inducing conditions. Inversely, we showed that activin α or redox imbalance induced by BSO or H₂O₂ treatment could decrease cloning efficiency of cells cultured at low cell density under permissive conditions (Fig. 3C, inset in Fig. 4A and ref.²⁹). Association of a redox imbalance with BMP4 is likely to further strengthen this growth-inhibitory activity as suggested by CCNA2 mRNA down regulation and CDKN1A induction at medium cell density (Figs. 2C, 4A and 4B), ectopic overexpression of CDKN1A having also been shown to be sufficient to induce a complete growth arrest at low and medium cell density (data not shown).

We further demonstrated that BMP/TGFB signaling pathways and redox imbalance are sufficient to account for most features of the dormancy signature. Activation of these 2 signaling pathways seems specific to dormant cells since the dormancy signature can be easily distinguished from that of cells rendered quiescent by culture at high confluence. Interestingly, the genetic signature of the dormant state includes mRNA of genes involved in epithelial differentiation as well as markers of stemness. It is interesting to note that expression of markers like HES1 and PTCH1 in dormant cells were not affected by the addition of Notch or Hedgehog signaling inhibitors (cyclopamine and DAPT; data not shown) suggesting that these signaling pathways are not involved in their induction. Thus dormant cells do not readily conform to a standard phenotype and, at least in the 2 cell lines derived from prostate cancer that we have studied, dormancy is associated with epithelial traits. We suggest that in addition to replicative senescence, cell cycle arrest induced by cell contact-inhibition/nutrient starvation and terminally differentiated cellular states this dormant state constitutes a fourth state of cellular quiescence that is actively maintained through both a decreased cellular redox potential and BMP signaling.

Predictions of the model

Our observation that, in association with BMP signaling, an oxidative stress can induce dormancy could provide an overlooked rationale for some reports on the control of the metastatic process. Expression of COCO, an inhibitor of BMP signaling, was shown to be sufficient to revert dormancy of breast cancer cells disseminated in the lung but not in others organs like bones or brain.¹⁶ The authors related this restricted activity of COCO to a lower paracrine activity of BMP in these latter organs. However, if the major findings of our model hold true for breast cancer cells, the pro-oxidant conditions encountered by cancer cells in the lung could account the ability of BMP to induce dormancy specifically in this organ and not in those with a lower exposure to oxygen. Finally, our observations lead us to predict that the prevailing conditions in the blood circulation should entice Circulating Tumor Cells (CTCs) to enter into a dormant state before their extravasation into the stroma of distant organs. Indeed, CTCs in the blood are exposed to a higher oxygen concentration than in the initial tumor. This could contribute to the poor efficiency of the metastatic process when compared with the number of circulating cells.^{4,37,38} Additionally, the observation that the number of metastases correlates with the number of CTC clusters of 4 cells or more rather than with individual CTC might reflect a role of homotypic intercellular contacts in preventing dormancy.³⁹ Thus, by highlighting the role of 2 different biological phenomena, cell density and redox imbalance, our *in vitro* analysis of dormancy suggests further avenues of investigation of the metastatic process.

Materials and Methods

Plasmids and chemicals

Doxycycline-inducible pTRIP vectors for murine Smad7 (mSmad7) and human BMP4 cDNA expression were constructed by replacing the RFP-shRNA cassette downstream the TET/ON promoter in pTRIPZ-shp21 (Open Biosystems, Thermofisher Scientific Biosciences) with the corresponding cDNA. Excision of the RFP-shRNA cassette was achieved by Age1-Mlu1 digestion of pTRIPZ-shp21 followed by Klenow treatment. mSmad7 cDNA was recovered from pBabepuro-mSmad7 (previously constructed by T.T. from murine F9 cell cDNA) by BamH1-SphI digestion and Klenow blunting, BMP4 cDNA was derived from pCMV-Sport6-hBMP4 (sequence verified cDNA clone IMAGE n° 4399276 from RZPD; German Science Center for Genome Research) by Xho1-Age1 digestion and Klenow blunting. pTRIP-control vector refers to pTRIPZ-shp21 following excision of the RFP-shRNA cassette. pSuperRetro-sh-SMAD4 was constructed as previously described.⁴⁰ Recombinant human Activin A was from R&D systems (Catalog No 338-AC, lot BNV3211101). K-0228841 was from Tocris (Catalog No 4986 Batch No 1A/158861), SB-50512442 was from Abcam (Catalog No ab144402; Lot No GR204729-1), reduced L-glutathione (Catalog No G6013-5G; Lot No 088K07621V) and L-Buthionine sulfoximine (Catalog No B2515) were from Sigma-Aldrich.

Cells and retroviruses

DMEM-FCS refer to DMEM (containing Glutamax-I and 4.5 g/l glucose without pyruvate, ref 61965 Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (PAA Laboratories, Pasching, Austria) and penicillin plus streptomycin solution (Life Technologies). Cloning efficiency assays were mostly performed in 6 cm-diameter dishes seeded with 10^3 to 4×10^3 cells. LNCaP* designates a cell population derived from LNCaP cells (a gift from Dr Florence Cabon, Institut André Lwoff, Villejuif, France) through transfection of plasmid pBabeBleo-EcoR (encoding the murine ecotropic leukemia retrovirus receptor)⁴³ and phleomycin selection (10 µg/ml). These cells were routinely cultured in DMEM-FCS as described previously.²⁹ VCaP cells (from Dr A. Chauchereau, Institut Gustave Roussy, France) were routinely passaged in DMEM-FCS supplemented with 15% water to make

medium isotonic at a 1:4 dilution after detachment of highly confluent cells with trypsin-EDTA (Life Technologies). Recombinant lentiviruses were produced by DNA transfection of 0.7×10^6 293T cells, plated in 6-wells plates the day before, with 2 µg of retroviral vectors and 2 µg of *trans*-complementing plasmids (1.3 µg of pCMV- Δ R8.74 plus 0.7 µg of pMD.G) using Lipofectamine 2000 (Gibco Invitrogen Corporation). Viral transductions were performed as previously.²⁹

Flow cytometry and western blot analysis

Western Blot analysis were carried out as previously described,²⁹ except for a modified Bradford procedure to determine protein concentration.⁴⁴ Smad7 antibody was from R&D systems (Catalog No MAB2029, lot No YHN02). Bands intensity on pictures of scanned films in TIFF format were determined using GelQuant.NET software (V 1.7.8 from http://biochemlabsolutions.com). Flow Cytometry and cytometric analysis were performed as previously except for a 2 step gating procedure to eliminate G1 cell doublets using SSC-H versus FSC-H and then FL2-A vs. FL2-W fluorescence dot plot representations.⁴⁵

RT-qPCR assays

For low cell density culture conditions, 10 or 20 dishes (10 cm diameter) were seeded with 10^4 cells in the indicated medium and incubated for 7 d at 37°C and 5% CO2. At that time, supernatants were discarded and cells were harvested by vigorous pipeting in PBS1X supplemented with 0.5% FCS and 1 mM EDTA at 4°C, pelleted by centrifugation, rinsed once with cold PBS1X and total RNA extracted using a RNeasy extraction kit (Qiagen). Amounts of RNA extracted per cell were similar for different cell culture conditions. For medium cell density conditions, cells were seeded at 4×10^5 cells in 6 cm diameter dish and lysed 3 d later directly in the cell dishes after one cold PBS1X wash. For high-density growth-arrested cell culture, cells were seeded at 6×10^5 cells in 6 cm diameter dish and grown for 7 days, with no medium change in the last 3 d before cell lysis. For single strand cDNA synthesis, 2 µg of RNA were used with the Maxima first strand cDNA synthesis kit (Thermofisher Scientific Biosciences) or with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems Life Technologies). Real-time PCR analysis were performed on about 20 ng of cDNA using the Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermofisher Scientific Biosciences) and the primers listed in Fig. S1 in a Lightcycler-01 or a LightCycler-1.5 machine (ROCHE) with LCS3.5 or LCS4 software respectively. Background signal was determined by analyzing negative controls generated by omitting reverse transcriptase at the mRNA reverse transcription step. Genes which generated a signal not exceeding 8 times the background were excluded from further analysis. For each experimental condition, amplification signals were normalized to that of GAPDH and relative expression level for gene X was calculated as 2^[Ct(GADPH)- Ct(gene X)], Ct being the cutting threshold calculated by the LCS3.5 or LCS4 qPCR software. Importantly, GADPH expression levels differed by less than a factor 2 between different experiments. For averaging the mRNA

levels, one of 2 calculation methods was used depending on the experimental design and the relative importance of stochastic and non-stochastic (such as use of different RT-qPCR kit or machines) errors in mRNA levels measurements. In the normalized averaging (NA) method, the relative expression levels obtained from independent experiments were averaged and the corresponding standard deviation calculated. Values were then divided by a normalization factor chosen for each gene to set expression level at medium cell density under hypotonic conditions (MD_hypo) to unity. In the averaging ratio (AR) method used when experiments involved comparisons between paired cell populations processed in parallel, the ratios between the GADPH-normalized mRNA levels measured for each gene in the paired cell populations were calculated, averaged and standard deviation of the ratios derived. When both applicable, these 2 methods led to very similar results (Pearson linear correlation coefficient greater than 0.99 for the dormancy signature of LNCaP* cells; compare Fig. 1A and C) as they correspond to calculation of the ratio of the averaged mRNA levels and the average of the mRNA level ratios respectively.

Statistical analysis

Significance of mRNA levels variations was calculated using a paired or a heteroscedatic Student's t test with unilateral distribution. Significance (p value) was indicated by stars as **** for P < 0.002; *** for P < 0.01; ** for P < 0.05 and * for P < 0.1. For correlation analysis between patterns of mRNA accumulation measured under different cell culture conditions, the linear correlation coefficient of Pearson was calculated for genes of the dormancy signature. For this analysis, we used for each gene the relative mRNA levels normalized to unity under MD_hypo cell culture condition because large variations between the levels of different mRNA species countermanded mRNA level variations originating in different cell culture conditions for a given gene (data not shown). Significance of the correlation coefficients was calculated on the VassarStats web site (http://vassarstats.net/rsig. html).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgements

The authors gratefully thank Christian Auclair for his generous support of this project and C. Ohanna for performing flow cytometry analysis of LNCaP* cells for CDH1 and CDH2 expression. The authors also thank Paul Tchénio and Claude Boucheix for their gift of K-02288 and SB-505124 inhibitors.

Supplemental Material

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

References

- Aguirre-Ghiso JA, Ossowski L, Rosenbaum SK. Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth. Cancer Res 2004; 64:7336-45; PMID:15492254; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0113
- Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. Cancer Res 2000; 60:2541-6; PMID:10811137
- Goodison S, Kawai K, Hihara J, Jiang P, Yang M, Urquidi V, Hoffman RM, Tarin D. Prolonged dormancy and site-specific growth potential of cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as revealed by labeling with green fluorescent protein. Clin Cancer Res 2003; 9:3808-14; PMID:14506175
- Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. Am J Pathol 1998; 153:865-73; PMID:9736035; http://dx.doi.org/10.1016/ S0002-9440(10)65628-3
- Naumov GN, MacDonald IC, Weinmeister PM, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Wilson SM, Morris VL, Groom AC, Chambers AF. Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. Cancer Res 2002; 62:2162-8; PMID:11929839
- Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. Clin Cancer Res 2004; 10:5342-8; PMID:15328170; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0245
- Uhr JW, Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108:12396-400; PMID:21746894; http://dx.doi.org/10.1073/ pnas.1106613108
- Ruppender NS, Morrissey C, Lange PH, Vessella RL. Dormancy in solid tumors: implications for prostate cancer. Cancer Metast Rev 2013; 32:501-9; PMID:23612741; http://dx.doi.org/10.1007/s10555-013-9422-z.
- Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Dormancy of metastatic melanoma. Pigment Cell Melanoma Res 2010; 23:41-56; PMID:19843243; http://dx.doi.org/10.1111/ j.1755-148X.2009.00647.x
- Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. J Cell Physiol 2005; 204:36-44; PMID:15605394; http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20265
- Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. N Engl J Med 2000; 342:525-33; PMID:10684910; http://dx.doi.org/10.1056/ NEJM200002243420801
- Naumov GN, Townson JL, MacDonald IC, Wilson SM, Bramwell VH, Groom AC, Chambers AF. Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases. Breast Cancer Res Treat 2003; 82:199-206; PMID:14703067; http://dx.doi.org/10.1023/B: BREA.0000004377.12288.3c
- Najmi S, Korah R, Chandra R, Abdellatif M, Wieder R. Flavopiridol blocks integrin-mediated survival in dormant breast cancer cells. Clin Cancer Res 2005;

11:2038-46; PMID:15756030; http://dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-04-1083

- Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de WJ, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. J Clin Oncol 2000; 18:80-6; PMID:10623696
- Kobayashi A, Okuda H, Xing F, Pandey PR, Watabe M, Hirota S, Pai SK, Liu W, Fukuda K, Chambers C, et al. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. J Exp Med 2011; 208:2641-55; PMID:22124112; http://dx.doi.org/10.1084/jem.20110840
- Gao H, Chakraborty G, Lee-Lim AP, Mo Q, Decker M, Vonica A, Shen R, Brogi E, Brivanlou AH, Giancotti FG. The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. Cell 2012; 150:764-79; PMID:22901808; http://dx.doi.org/ 10.1016/j.cell.2012.06.035
- Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G, van Overveld PG, Wetterwald A, Schwaninger R, Henriquez NV, Ten DP, Borovecki F, Markwalder R, et al. BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. Am J Pathol 2007; 171:1047-57; PMID:17724140; http://dx.doi.org/10.2353/ ajpath.2007.070168
- Buijs JT, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, ten Dijke P, van der Pluijm G. TGF-beta and BMP7 interactions in tumour progression and bone metastasis. Clin Exp Metast 2007; 24:609-17; PMID:18008174; http://dx.doi.org/10.1007/s10585-007-9118-2
- Buijs JT, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, Que I, Schwaninger R, Rentsch C, Ten DP, Cleton-Jansen AM, Driouch K, et al. Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. Cancer Res 2007; 67:8742-51; PMID:17875715; http://dx.doi.org/ 10.1158/0008-5472.CAN-06-2490
- Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S, Capobianco C, Farina HG, Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. TGFbeta2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF-beta-RIII and p38alpha/beta signalling. Nat Cell Biol 2013; 15:1351-61; PMID:24161934; http://dx.doi.org/10.1038/ncb2861
- Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. Nat Rev Cancer 2014; 14:611-22; PMID:25118602; http://dx.doi.org/10.1038/nrc3793
- 22. Taichman RS, Patel LR, Bedenis R, Wang J, Weidner S, Schumann T, Yumoto K, Berry JE, Shiozawa Y, Pienta KJ. GAS6 receptor status is associated with dormancy and bone metastatic tumor formation. Plos One 2013; 8:e61873; PMID:23637920
- Korah R, Boots M, Wieder R. Integrin alpha5beta1 promotes survival of growth-arrested breast cancer cells: an in vitro paradigm for breast cancer dormancy in bone marrow. Cancer Res 2004; 64:4514-22; PMID:15231661; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3853
- Barkan D, Green JE. An in vitro system to study tumor dormancy and the switch to metastatic growth. J Visualized Exp: JoVE 2011; 54:e2914; PMID:21860375
- Wendt MK, Taylor MA, Schiemann BJ, Schiemann WP. Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. Mol Biol Cell 2011; 22:2423-35; PMID:21613543; http:// dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0306
- Shibue T, Weinberg RA. Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106:10290-5; PMID:19502425; http:// dx.doi.org/10.1073/pnas.0904227106
- 27. Barrios J, Wieder R. Dual FGF-2 and intergrin alpha5beta1 signaling mediate GRAF-induced RhoA

inactivation in a model of breast cancer dormancy. Cancer Microenviron 2009; 2:33-47; PMID:19308677; http://dx.doi.org/10.1007/s12307-009-0019-6

- Barkan D, El Touny LH, Michalowski AM, Smith JA, Chu I, Davis AS, Webster JD, Hoover S, Simpson RM, Gauldie J, et al. Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. Cancer Res 2010; 70:5706-16; PMID:20570886; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2356
- Havard M, Dautry F, Tchenio T. A dormant state modulated by osmotic pressure controls clonogenicity of prostate cancer cells. J Biol Chem 2011; 286:44177-86; PMID:22039055; http://dx.doi.org/10.1074/jbc. M111.262709
- Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. Matrix Biol 2007; 26:508-23; PMID:17560775; http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2007.05.004
- Baird L, Swift S, Lleres D, Dinkova-Kostova AT. Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells. Biotechnol Adv 2014; 32:1133-44; PMID:24681086; http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.004
- 32. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell 2010; 7:391-402; PMID:20804974; http://dx.doi.org/ 10.1016/j.stem.2010.06.020
- Naumov GN, MacDonald IC, Chambers AF, Groom AC. Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy? Semin Cancer Biol 2001; 11:271-6; PMID:11513562; http://dx.doi.org/10.1006/ scbi.2001.0382
- Wu HH, Thomas JA, Momand J. p53 protein oxidation in cultured cells in response to pyrrolidine dithiocarbamate: a novel method for relating the amount of p53 oxidation in vivo to the regulation of p53-responsive genes. Biochem J 2000; 351:87-93; PMID:10998350; http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3510087
- Augustyn KE, Merino EJ, Barton JK. A role for DNAmediated charge transport in regulating p53: Oxidation of the DNA-bound protein from a distance. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104:18907-12; PMID:18025460; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709326104
- 36. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. Prostate 2003; 57:205-25; PMID:14518029; http://dx.doi.org/10.1002/ pros.10290
- Tarin D, Vass AC, Kettlewell MG, Price JE. Absence of metastatic sequelae during long-term treatment of malignant ascites by peritoneo-venous shunting. A clinico-pathological report. Invasion Metast 1984; 4:1-12; PMID:6735637
- Butler TP, Gullino PM. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. Cancer Res 1975; 35:512-6; PMID:1090362
- Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. Cancer Res 1974; 34:997-1004; PMID:4841969
- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. Cell 2006; 125:929-41; PMID:16751102; http://dx.doi.org/10.1016/j. cell.2006.03.045
- Sanvitale CE, Kerr G, Chaikuad A, Ramel MC, Mohedas AH, Reichert S, Wang Y, Triffitt JT, Cuny GD, Yu PB, et al. A new class of small molecule inhibitor of BMP signaling. Plos One 2013; 8:e62721
- Vogt J, Traynor R, Sapkota GP. The specificities of small molecule inhibitors of the TGFbs and BMP pathways. Cell Signalling 2011; 23:1831-42;

PMID:21740966; ht cellsig.2011.06.019

http://dx.doi.org/10.1016/j.

 Albritton LM, Tseng L, Scadden D, Cunningham JM. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. Cell 1989; 57:659-66; PMID:2541919; http://dx.doi.org/ 10.1016/0092-8674(89)90134-7

 Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Anal Biochem 1996; 236:302-8; PMID:8660509; http://dx.doi.org/10.1006/ abio.1996.0171

 Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. Curr Issues Mol Biol 2001; 3:67-70; PMID:11488413

LEGENDS TO SUPPLEMENTARY DATA

File S1: List of genes analyzed by RT-qPCR and sequences of the corresponding primers The genes of the dormancy signature are in red..

File S2: Clonogenicity of VCAP cells is also regulated by a dormancy phenomenon. A) Cloning efficiency of VCAP cells under LD_hyper and LD_hypo conditions. B) Photomicrographs of VCAP cells seeded at $3x10^4$ cells in 6 cm diameter culture dishes after 19 days of culture in DMEM-FCS (LD_hyper) or DMEM-FCS+25% water (LD_hypo). Small and very compact spherical clones could be frequently detected under LD_hypo but not LD_hyper conditions. C) RT-qPCR analysis of the relative levels of mRNA species according to cell culture conditions. Relative mRNA levels were averaged using NAM (with levels under MD_hypo conditions taken as unity) from two independent experiments each with cells cultured in parallel under LD_hyper, LD_hypo, MD_hypo and MD_hyper conditions. Data are presented as mean \pm s.d., with statistical significance of the differences with cells cultured under exponentially growing (MD_hypo) conditions indicated for cells cultured under dormancy-inducing (LD_hyper) or permissive (LD_hypo) conditions as in Fig. 1.

File S3: Values of the relative mRNA levels for genes of the dormancy signature measured in LNCaP* et VCAP cells under the indicated culture conditions. Data correspond to Fig.1 and File S2 for LNCaP* and VCAP cells, respectively.

File S4: Modulation of cloning efficiency and gene expression by depleting endogenous *SMAD4*. LNCaP* cells were transduced with pRetroSuper vectors expressing a shRNA targeting *SMAD4* (*sh-SMAD4*)⁴⁰ or the Firefly luciferase gene (*sh-Luc*), that was used as control. As shown in panels B and C, *SMAD4* RNA levels were decreased on average by 80% in cells expressing *sh-SMAD4* as compared to *sh-Luc* expressing control cells. A) Cloning efficiency of *sh-Luc* (control) and *sh-SMAD4* transduced cell populations were measured under the indicated cell culture conditions.

Data were averaged from 2 experiments made with two independent control and two independent *sh-SMAD4*- transduced cell populations processed in parallel. B) Regulation of mRNA species accumulation under dormancy-inducing conditions (LD_hyper) by SMAD4 depletion. Ratios of mRNA species levels measured by RT-qPCR between *sh-SMAD4* and control-transduced cell populations cultured under LD_hyper conditions were derived from two couples of cell populations. C) Regulation of mRNA species accumulation under LD_hyper conditions were derived from two couples of cell populations. Ratios of mRNA species levels measured by RT-qPCR between *sh-SMAD4* and control-transduced cell populations of mRNA species accumulation under LD_hypo conditions by *SMAD4* depletion. Ratios of mRNA species levels measured by RT-qPCR between *sh-SMAD4* and control-transduced cell populations cultured under LD_hyper conditions were derived from two couples of cell populations. Stars indicate significance of the differences between control (*sh-Luc*) and *sh-SMAD4* transduced cells. Data are presented as mean \pm s.d..

File S5: Suppression of dormancy by pharmacologic BMP and TGF β receptor inhibitors. Cloning efficiency of LNCaP* cells under the indicated cell culture conditions in the presence of different concentrations of K02288⁴¹ (targeting ALK1, 2, 3, 6 receptors that are activated by BMP2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 GDF5, 6, 7, and AMH ligands)⁴⁶ and SB505124⁴² (targeting ALK4, 5, 7 receptors that are activated by TGF β , Activin, BMP3B GDF1 and 3 ligands)⁴⁶ inhibitors. K02288 and SB505124 induced up to a 18 and 9 fold increase in cloning efficiency under dormancy-inducing conditions, respectively. Note that both inhibitors displayed a strong toxicity at the highest tested concentrations as shown by a strong decrease of cloning efficiency under LD_hypo conditions. Data are averaged from two independent measures and presented as mean ± s.d.. Stars indicate significance of the differences between treated cells and their corresponding (not treated) controls.

| | gono ovmbol | primers for RT-qPCR | | | | |
|-----------------------|--------------|-------------------------|--------------------------|--|--|--|
| | gene symbol | forward primer | reverse primer | | | |
| Normalization | GADPH | GACCTGACCTGCCGTCTAG | GCCCAGGATGCCCTTGAG | | | |
| Normalization | GADPH | ACCCAGAAGACTGTGGATGG | TCTAGACGGCAGGTCAGGTC | | | |
| | AKR1C1 | TCCAGTGTCTGTAAAGCCAGG | CCAGCAGTTTTCTCTGGTTGAA | | | |
| | APAF1 | GTCACCATACATGGAATGGCA | CTGATCCAACCGTGTGCAAA | | | |
| | BAX | TGCTTCAGGGTTTCATCCAG | GGCGGCAATCATCCTCTG | | | |
| | CCNA2 | GAAGACGAGACGGGTTGCA | AGGAGGAACGGTGACATGCT | | | |
| | CDC25A | CAAACCTTGACAACCGATG | ACACTGACCGAGTGCTGGAG | | | |
| | CDKN1A (p21) | TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA | GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC | | | |
| | CDKN1B (p27) | CTGCAACCGACGATTCTTCTACT | GGGCGTCTGCTCCACAGA | | | |
| | CDKN1C (p57) | GCGGCGATCAAGAAGCTGT | GCTTGGCGAAGAAATCGGAGA | | | |
| | CDKN2A (p14) | GGCCCTCGTGCTGATGCTAC | TGGAGCAGCAGCAGCTCCGC | | | |
| | CDKN2A (p16) | CTGCCCAACGCACCGAATA | TGCAGCACCACCAGCGTGTC | | | |
| Cell cycle regulators | CDKN2B (p15) | GGACTAGTGGAGAAGGTGCG | GGGC GCTGCCCATCATCATG | | | |
| stress markers, | CDKN2C (p18) | GGGGAC CTAGAGCAACTTAC | GTAGCAGTCTCCTGGCAATC | | | |
| apoptosis | CDKN2D (p19) | CTCAACCGCTTCGGCAAGAC | GGACTGGTACC GGAGGTGTC | | | |
| | CDKN3 (CIP2) | CAGCGATGAAGCCGCCCAGT | TGACAGTTCCCCTCTGGTGCAG | | | |
| | FAS | AGATTGTGTGATGAAGGACATGG | TGTTGCTGGTGAGTGTGCATT | | | |
| | GADD45A | GAGAGCAGAAGACCGAAAGGA | CACAACACCACGTTATCGGG | | | |
| | HMOX1 | AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC | AAAGCCCTACAGCAACTGTCG | | | |
| | MDM2 | GAATCATCGGACTCAGGTACATC | TCTGTCTCACTAATTGCTCTCCT | | | |
| | NQO1 | GAAGAGCACTGATCGTACTGGC | GGATACTGAAAGTTCGCAGGG | | | |
| | PARP1 | TCTGAGCTTCGGTGGGATGA | TTGGCATACTCTGCTGCAAAG | | | |
| | PIG3 | GGAGGACCGGAAAACCTCTAC | CCTCAAGTCCCAAAATGTTGCT | | | |
| | TP53 | TCAACAAGATGTTTTGCCAACTG | ATGTGCTGTGACTGCTTGTAGATG | | | |
| | ХРА | CCAGGACCTGTTATGGAATTTGA | GCTTCTTGACTACCCCAAACTTC | | | |
| | BMP2 | CTCAGGTCAGCCGGGCTCA | GTTCTTCCAAAGATTCTTCATGG | | | |
| | BMP4 | TGAGCCTTTCCAGCAAGTTT | GCATTCGGTTACCAGGAATC | | | |
| TGFbeta superfamily | BMP6 | AGCAATCTGTGGGTTGTGACT | GGTAGAGCGATTACGACTCTGTT | | | |
| | BMP7 | TCAACCTCGTGGAACATGACA | CTTGGAAAGATCAAACCGGAACT | | | |
| | BMP10 | CCTCTGCCAACATCATTAGGAG | TTTTCGGAGCCCATTAAAACTGA | | | |
| | GDF11 | CCACCGAGACCGTCATTAGC | CAGGCCGTAGGTACACCCA | | | |
| | GDF5 | AGACCGTGTATGAGTACCTGTT | GTCCTTGAAGTTGACATGCAGT | | | |
| | GDF9 | CAGAGCTTTGCACTACATGAAGA | TGAAGAGCCGAACAGTGTTGT | | | |
| | INHBA | TGAAGAAGAGACCCGATGTCA | GCTTTCTGATCGCGTTCAG | | | |
| | NODAL | TGTTGGGGAGGAGTTTCATC | GCACAACAAGTGGAAGGGAC | | | |
| | TGFB1 | GTTCAAGCAGAGTACACAGC | GTATTTCTGGTACAGCTCCACG | | | |
| | TGFB3 | CAGGGAGAAAATCCAGGTCA | CCTGGAAGGCGTCTAACCAAG | | | |

| Transcriptional targets of SMAD | BMP1 | GGGTCATCCCCTTTGTCATTG | GCAAGGTCGATAGGTGAACACA |
|---------------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|
| | FST | AGGCAAGATGTAAAGAGCAGC | CAGTAGGCATTATTGGTCTGGTC |
| | ID1 | CTGCTCTACGACATGAACGG | GAAGGTCCCTGATGTAGTCGAT |
| | NOGGIN | CCTGGTGGACCTCATCGAA | CAGCGTCTCGTTCAGATCCTT |
| | PAI1 | CACAACCCCACAGGAACAGTC | AGGGTCAGGGTTCCATCACTT |
| | SMAD6 | CCTCCCTACTCTCGGCTGTC | GGTAGCCTCCGTTTCAGTGTA |
| | SMAD7 | TTCCTCCGCTGAAACAGGG | CCTCCCAGTATGCCACCAC |
| | AR | TGTCACACATTGAAGGCTATGAA | GGCTGGTTGTTGTCGTGTC |
| | FOLH1 (PSMA) | CAGCGTGGAAATATCCTAAATCTGA | CACGCCTATAAGCATATTCATTTGC |
| Prostate cell | KLK3 (PSA) | ATGAAGCACTGAGCAGAAGC | CAGGACAGAGTGGGTTATGTTT |
| differentiation | KRT18 | GGCTCCGCAAGGTCATTG | GCTGGCAATCTGGGCTTG |
| | KRT19 | GCCACTACTACACGACCATCC | CAAACTTGGTTCGGAAGTCAT |
| | KRT5 | TTCTTTGATGCGGAGCTGT | CATGGAGAGGACCACTGAGG |
| | KLF2 | AGACCTACACCAAGAGTTCGCATC | ATCGCACAGATGGCACTGGAATG |
| | KLF4 | CGGACATCAACGACGTGAG | GACGCCTTCAGCACGAACT |
| | KLF5 | AAATTTACCCACCACCCTGCCAGT | TTTGTGCAACCAGGGTAATCGCAG |
| Krûppel-Like Factors | KLF6 | CGGACGCACACAGGAGAAAA | CGGTGTGCTTTCGGAAGTG |
| | KLF8 | TATACTACTTTGCCTGCAGATGGGGG | GGTGGGGTCAACTTTCACTGATCCAG |
| | KLF10 | CTTCCGGGAACACCTGATTTT | GCAATGTGAGGTTTGGCAGTATC |
| | KLF11 | GTTGCGGATAAGACCCCTCAC | TGGAATCTGTTACTTGGGGAGA |
| | HES1 | CTGGAAATGACAGTGAAGCACCT | ATTGATCTGGGTCATGCAGTTG |
| | HEY1 | GCTGGTACCCAGTGCTTTTGAG | TGCAGGATCTCGGCTTTTTCT |
| Notob pothway | NOTCH1 | TGGACCAGATTGGGGAGTTC | GCACACTCGTCTGTGTTGAC |
| Notch pathway | NOTCH2 | GATCACCCGAATGGCTATGAAT | GGGGTCACAGTTGTCAATGTT |
| | JAG1 | GCCGAGGTCCTATACGTTGC | CCGAGTGAGAAGCCTTTTCAA |
| | JAG2 | TGGGACTGGGACAACGATAC | AGTGGCGCTGTAGTAGTTCTC |
| | AXIN2 | CGAGTGTGAGGTCCACGGAA | CTGGTGGCTGGTGCAAAGAC |
| | CCND1 | CAATGACCCCGCACGATTTC | CATGGAGGGCGGATTGGAA |
| Wnt pathway | MYC | CTCCAGCGCCTTCTCTCCGT | GAGCCTGCCTCTTTTCCACAG |
| | TCF7 | TCCAGAGCCCCTGGAGGACG | GGGCTGATTGGCCTTGTGCA |
| | TCRP1 | ACCAACATGGGCACATAAACTC | TGGCATCCAGGTATGACAGAAT |
| Hedgehog pathway | GLI1 | GAAGACCTCTCCAGCTTGGA | GGCTGACAGTATAGGCAGAG |
| | PTCH1 | ACTCGCCAGAAGATTGGAGA | TCCAATTTCCACTGCCTGTT |
| | PTCH2 | GGAATGATTGAGCGGATGATTGA | CCACCTGTGCCTTGTCTAGC |
| | SHH | GCTCGGTGAAAGCAGAGAAC | CCAGGAAAGTGAGGAAGTCG |
| | SMO | AAGCTCGTGCTCTGGTCG | GTCATTCTCACACTTGGGCA |

| | OCT4A | GTGGAGGAAGCTGACAACAA | ATTCTCCAGGTTGCCTCTCA | |
|----------------------------------------------|---------------|--------------------------|--------------------------|--|
| | ABCG2 | ACGAACGGATTAACAGGGTCA | CTCCAGACACACCACGGAT | |
| | CD44 | GTGATCAACAGTGGCAATGG | CCACATTCTGCAGGTTCCTT | |
| Markers of prostate cancer stem cells | NANOG | TTTGTGGGCCTGAAGAAAACT | AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG | |
| | PROM1 (CD133) | GACCCAACATCATCCCTGTTCTTG | CTGTTCATGTTCTCCAACGCCTCT | |
| | SOX2 | GCCGAGTGGAAACTTTTGTCG | GGCAGCGTGTACTTATCCTTCT | |
| | TP63 | GTCCCAGAGCACACAGACA | GAGGAGCCGTTCTGAATCTG | |
| | CDH1 | TGCCCAGAAAATGAAAAAGG | GTGTATGTGGCAATGCGTTC | |
| | CDH2 | ACAGTGGCCACCTACAAAGG | CCGAGATGGGGTTGATAATG | |
| | SNAI1 | CCTCCCTGTCAGATGAGGAC | CCAGGCTGAGGTATTCCTTG | |
| Epithelial Mesenchymal Transition markers | SNAI2 | GGGGAGAAGCCTTTTTCTTG | TCCTCATGTTTGTGCAGGAG | |
| | TWIST1 | GGAGTCCGCAGTCTTACGAG | TCTGGAGGACCTGGTAGAGG | |
| | VIM | GAGAACTTTGCCGTTGAAGC | GCTTCCTGTAGGTGGCAATC | |
| | ZEB1 | ATGCGGAAGACAGAAAATGG | GTCACGTTCTTCCGCTTCTC | |
| | ZEB2 | CCAAACAGCTTCTCTTCTGAGG | GGGTTAGTGCTTTTGTTGTCC | |
| | ZEB2 | TTCCTGGGCTACGACCATAC | TGTGCTCCATCAAGCAATTC | |



Figure S2

File S3

| | Relative gene expression levels | | LNCaP* | | | | |
|----|---------------------------------|------------------|----------|---------|----------|---------|------------|
| | gene symbol | accession number | LD_hyper | LD_hypo | MD_hyper | MD_hypo | confluency |
| | GADPH | AF261085 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 1 | CDKN1A | NM_000389 | 11,4 | 3,6 | 1,9 | 1,0 | 1,3 |
| 2 | CCNA2 | NM_001237 | 0,3 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,3 |
| 3 | MDM2 | NM_002392 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | - |
| 4 | PIG3 | NM_004881 | 3,3 | 2,0 | 1,2 | 1,0 | 1,2 |
| 5 | GADD45A | NM_001924 | 5,5 | 2,0 | 0,7 | 1,0 | 4,0 |
| 6 | KLF4 | AF105036 | 1,9 | 1,0 | 0,7 | 1,0 | 0,8 |
| 7 | KLF6 | NM_005655 | 3,1 | 1,6 | 0,7 | 1,0 | 0,6 |
| 8 | KLF10 | NM_005655 | 2,6 | 1,6 | 0,8 | 1,0 | 2,2 |
| 9 | KRT19 | NM_002276 | 25,4 | 6,4 | 1,0 | 1,0 | 1,1 |
| 10 | KLK3 | BC056665 | 2,7 | 1,2 | 0,5 | 1,0 | 0,6 |
| 11 | AR | M23263 | 2,6 | 1,5 | 0,8 | 1,0 | 1,2 |
| 12 | CDH1 | AB025106 | 2,3 | 1,3 | 0,9 | 1,0 | 1,6 |
| 13 | GDF11 | NM_005811 | 2,7 | 2,1 | 1,2 | 1,0 | 0,8 |
| 14 | BMP1 | NM_001199 | 3,2 | 1,2 | 0,7 | 1,0 | 1,3 |
| 15 | BMP4 | BC020546 | 4,3 | 2,6 | 1,1 | 1,0 | 2,2 |
| 16 | SMAD6 | NM_005585 | 6,1 | 2,7 | 1,5 | 1,0 | 0,3 |
| 17 | SMAD7 | NM_005904 | 13,1 | 7,9 | 1,1 | 1,0 | 0,5 |
| 18 | ID1 | NM_002165 | 7,3 | 2,8 | 0,9 | 1,0 | 0,1 |
| 19 | HES1 | NM_005524 | 4,6 | 4,2 | 0,9 | 1,0 | 1,4 |
| 20 | OCT4A | NM_002701 | 3,1 | 2,8 | 1,0 | 1,0 | 0,3 |
| 21 | PTCH1 | NM_001083602 | 12,1 | 4,1 | 1,2 | 1,0 | 0,4 |
| 22 | HMOX1 | NM_002133 | 10,5 | 5,3 | 2,5 | 1,0 | - |
| 23 | AKR1C1 | NM_001083602 | 74,7 | 19,1 | 0,8 | 1,0 | - |
| 24 | NQO1 | NM_000903 | 3,2 | 4,1 | 0,5 | 1,0 | - |

| VCAP | | | | | |
|----------|---------|----------|---------|--|--|
| LD_hyper | LD_hypo | MD_hyper | MD_hypo | | |
| 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | | |
| 21,4 | 8,3 | 1,2 | 1,0 | | |
| 0,4 | 0,6 | 1,1 | 1,0 | | |
| - | - | - | - | | |
| 8,4 | 2,4 | 1,8 | 1,0 | | |
| 0,4 | 0,3 | 0,6 | 1,0 | | |
| 7,1 | 3,4 | 0,9 | 1,0 | | |
| 1,5 | 0,7 | 1,2 | 1,0 | | |
| 1,2 | 1,0 | 1,1 | 1,0 | | |
| 6,1 | 5,1 | 1,2 | 1,0 | | |
| 35,1 | 10,2 | 1,8 | 1,0 | | |
| 0,6 | 0,4 | 0,8 | 1,0 | | |
| 2,5 | 1,3 | 1,6 | 1,0 | | |
| 1,9 | 0,8 | 1,5 | 1,0 | | |
| 2,3 | 1,5 | 1,5 | 1,0 | | |
| 3,5 | 2,0 | 1,6 | 1,0 | | |
| 13,3 | 9,4 | 1,4 | 1,0 | | |
| 7,3 | 3,2 | 1,3 | 1,0 | | |
| 47,2 | 22,7 | 1,1 | 1,0 | | |
| 1,6 | 1,3 | 1,3 | 1,0 | | |
| 4,6 | 2,3 | 0,8 | 1,0 | | |
| 3,1 | 1,6 | 0,8 | 1,0 | | |
| 5,3 | 3,0 | 1,3 | 1,0 | | |
| 6,0 | 2,0 | 0,9 | 1,0 | | |
| 2,3 | 1,9 | 0,9 | 1,0 | | |







Figure S4

А



Figure S5

2.2. Article 2 : Transient exposure to androgens induces a remarkable selfsustained quiescent state in dispersed prostate cancer cells

Objectif de l'étude

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons recherché des inducteurs pharmacologiques de dormance. Nous avons tiré patie d'une observation où T. Tchenio avait montré que les androgènes inhibaient fortement la clonogénicité des cellules de cancer de la prostate (LNCaP* et VCaP). Toutefois, le lien avec le phénomène de dormance ne semblait pas immédiat car ce blocage de la prolifération cellulaire semblait être irréversible. Notre objectif a donc été de caractériser ce phénomène et d'analyser ses liens avec le phénomène de dormance inductible par l'hypertonicité.

Stratégie de recherche

La première étape a été d'analyser la réversibilité du blocage de la prolifération induit par les androgènes. Une étape décisive a été franchie lorsque nous nous sommes aperçus que les traitements par des inhibiteurs pharmacologiques des voies TGF-β/BMP ou par des thiols antioxydants tels que le glutathion devenait beaucoup plus efficace pour restaurer un état cellulaire prolifératif s'ils étaient administrés <u>seulement après</u> un traitement transitoire par des androgènes. A partir de cette observation, nous avons distingué une phase d'induction et une phase de maintenance de l'état quiescent que nous avons caractérisées. En plus des outils développés dans notre premier travail, nous avons introduit une méthode de mesure de l'état d'oxydation des thiols cellulaires en utilisant le gène senseur GRX1-roGFP2. Ce gène code pour une protéine de fusion avec un pont disulfide labile qui est en équilibre redox rapide avec le glutathion intracellulaire. La mesure du taux d'oxydation de cette protéine par analyse par Western Blot nous a fourni une mesure relativement fiable de l'état d'oxydation de la cellule. Par ailleurs, notre travail nous a mené à développer des analyses par Western blot plus systématiques pour confirmer l'activation des voies SMAD et d'un stress oxydatif.

Résultats

L'efficacité remarquable des androgènes en traitement transitoire pour induire une quiescence cellulaire stable (plus de 99% des cellules restaient quiescentes plus d'une semaine après la remise en culture des cellules dans un milieu dépourvu d'androgènes ajoutés) nous a permis d'utiliser des traitements inducteurs de durée limitée, ce qui a été crucial pour le développement de ce travail et la généralisation de notre concept de dormance.

Nous avons en effet montré qu'un traitement transitoire des cellules de cancer de la prostate cultivées à faible densité cellulaire par des androgènes pouvait induire un état dormant stable très semblable à celui généré par la culture en milieu hypertonique. De manière intéressante, nous avons montré que des antagonistes au récepteur des androgènes (AR) n'étaient efficaces pour inhiber ce phénomène que s'ils étaient ajoutés en même temps que les androgènes, mais non après. Cela suggérait que les androgènes agissaient par un mécanisme de « Hit and Run » et confirmait notre distinction d'une phase d'induction (dépendante de l'activation de AR) et d'une phase de maintenance (indépendante de l'activation de AR). Nous avons montré que la phase de maintenance reposait sur une activation des voies du TGF-B/BMP et de réponse à un stress oxydatif qui apparaissaient très intriquées. De manière importante, il est apparue que l'activation de ces voies de signalisation était auto-entretenue au niveau de la cellule unique, ce qui rendait compte du caractère stable remarquable de l'état dormant. L'importance du stress oxydatif nous a aussi été suggérée par l'observation qu'à moyene densité cellulaire, les androgènes n'induisaient qu'une quiescence instable dans les cellules LNCaP*, instabilité qui était associée à un faible niveau d'oxydation des thiols cellulaires et à l'absence d'induction des marqueurs de stress oxydatif tels que HMOX1 et CDKN1A. Cela nous a d'ailleurs conduit à nous demander si la surexpression de CDKN1A, qui était un marqueur de stress oxydatif dans notre modèle, pouvait jouer un rôle dans le phénomène de dormance. Un résultat remarquable a été que la surexpression transitoire de CDKN1A était aussi capable d'induire un phénomène de dormance caractéristique avec une très grande efficacité. Toutefois, on a observé que les cinétiques d'induction des marqueurs de stress et d'activation des voies SMAD (phosphorylation des facteurs SMAD) étaient différentes et plus lentes que celles observées avec les androgènes, ce qui suggérait que les mécanismes d'induction pouvaient être au moins en partie différents.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer que le phénomène de dormance que nous avons étudié pouvait être considéré comme un état cellulaire bien défini et qui se situe au point de convergence des différents mécanismes d'induction de la dormance.

Transient exposure to androgens induces a remarkable self-sustained quiescent state in dispersed prostate cancer cells Anh Thu Bui⁽¹⁾, Meng-Er Huang⁽²⁾, Marilyne Havard⁽¹⁾, Fanny Laurent-Tchenio⁽¹⁾, François Dautry⁽¹⁾ and Thierry Tchenio^{(1)*} ⁽¹⁾ LBPA, UMR8113 ENS Cachan - CNRS, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, Cedex France ⁽²⁾ Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR3348, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France *To whom correspondence should be addressed: Thierry Tchenio, LBPA, UMR8113 ENSC -CNRS, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, Cedex France.; Fax: +33 (0)1 47407634; Phone: +33 (0)1 47407671; E-mail: ttchenio@ens-cachan.fr **Running Title** : SMAD and redox imbalance signaling trigger dormancy Keywords: cell dormancy, prostate cancer, cell proliferation, cell signaling, SMAD, redox regulation, oxidative stress, CDKN1A, androgens

22 SUMMARY (261 words)

23 Cellular quiescence is often considered as a reversible cell growth arrest that requires a persistence of non-24 permissive external growth conditions for its maintenance. In this work, we showed that transient 25 androgen treatment can induce a remarkably stable quiescent state in androgen receptor (AR)-expressing 26 prostate cancer cells cultured at low cell density. This process relied on a self-sustained redox imbalance 27 and SMAD signaling activation. However, androgens were ineffective to induce such a self-sustained 28 quiescent state in cells at medium cell density, which correlated with a lesser induction of cell redox 29 imbalance and oxidative stress markers like HMOX1 or CDKN1A. These effects of androgens could be 30 fully mimicked by transient overexpression of CDKN1A in cells at low cell density, that triggered its own 31 expression and a sustained SMAD phosphorylation. Globally, the quiescent state induced by transient 32 exposure to androgens or by CDKN1A overexpression shared very strong similarities with the dormant 33 state elicited by hypertonicity at low cell density. Self-sustained dormant states that depend on feedback 34 loops involving redox imbalance and SMAD signaling define a new family of quiescent states that can be 35 induced by various stress conditions in dispersed cancer cells. In addition, our findings provide a 36 biological basis for proposing an androgen-based therapy aiming at delaying the development of clinical 37 metastases by inducing or reinforcing the dormancy of dispersed prostate cancer cells.

38

39
40 **ABBREVIATIONS**

- 41
- 42 Ø: none
- 43 Bic: bicatulamide
- 44 DMEM-FCS : Dulbecco-Modified Essential Medium with 10% fetal calf serum plus antibiotics
- 45 dox: doxycycline
- 46 Enz: enzalutamide
- 47 G, GSH : glutathione
- 48 GSSG : oxydized glutathione (glutathione disulfide)
- 49 K : K02288
- 50 LD-hypo : culture at low cell density in hypotonic DMEM-FCS (DMEM-FCS + 25% H₂O)
- 51 MD-hypo: culture at medium cell density in hypotonic DMEM-FCS (DMEM-FCS + 25% H₂O)
- 52 ox/red: ratio of oxidized to reduced GRX1-roGFP2 protein
- 53 S: SB505124
- 54 shLuc: small hairpin RNA targeting the Firely luciferase gene
- 55 shSMAD4: small hairpin RNA targeting SMAD4

56

57

59 INTRODUCTION

60 Cellular quiescence is a reversible growth arrest in the GO/G1 phase of the cell cycle that can be 61 triggered by various conditions such as cell-contact inhibition, depletion of nutrient or growth factors, and 62 exposure to growth-inhibitory cytokines or various chemicals. External conditions involved in the 63 induction of the quiescent state are usually required for its maintenance, suggesting that cell quiescence is a passive phenomenon. At variance with this view, we recently described a more stable form of cell 64 65 quiescence that is induced upon culturing prostate cancer cells at low cell density in a slightly hypertonic medium. A large fraction of the cells remains in the quiescent state when they are returned under growth 66 67 permissive conditions in hypotonic or isotonic medium [1]. This suggests that the maintenance of this 68 quiescent state (which we designated as dormancy) depends mainly on cellular mechanisms that are self-69 sustained in the dormant cell population independently of the initial conditions that triggered dormancy. 70 Redox imbalance and SMAD signaling were shown to control dormancy and to fully account for the 71 expression of a dormancy signature comprising twenty genes genes involved in cell cycle control and 72 response to cellular stress, markers of differentiation and of stemness and genes involved in BMP/TGFB 73 signaling [2].

74 Androgens are critically required for the proliferation of luminal epithelial stem cells, the 75 differentiation and survival of their progeny in normal prostate and for the proliferation and survival of 76 most early-stage prostate cancer cells [3-5]. Accordingly, the primary treatment of prostate cancer after 77 radical prostatectomy is to inhibit AR signaling through depletion of circulating androgens and/or 78 treatment with antagonists of AR [5]. However, this anti-androgen therapy eventually fails, with a median 79 disease-free survival of a few years, due to the emergence of androgen-independent prostate cancer 80 (AIPC) cells. In most cases, AIPC cells remain dependent on continued AR signaling for their survival 81 and proliferation, the apparent independency from androgen being associated with genetic or epigenetic 82 alterations enhancing AR activity under conditions of androgen ablation [5]. However, it has also been 83 observed that androgens can inhibit proliferation of human prostate cancer cell in culture or/and growth of human prostate cancer cell xenografts in mouse [6-8,9,10,11-17]. This occurs for cells which are progressing toward androgen independence but are still expressing functional androgen receptors (AR) and at concentrations which can be within the range of physiological androgen levels [11,13,14,16]. This has led to propose that androgens could constitute a complementary treatment for AIPC [7,10,11-14,16]

88 In the present work, we investigated the phenomenon of cell growth arrest that can be induced in 89 prostate cancer cells upon treatments with androgens. We used two AR-positive prostate cancer cell lines, 90 LNCaP* and VCaP, that were routinely passaged in a growth medium supplemented with 10% fetal calf 91 serum, that provided only low basal concentrations of androgens [18]. Of note, AR gene was amplified in 92 VCaP cells which conferred them an AIPC phenotype [16,19]. We showed that, when cultured at low cell 93 density, transient exposure of these prostate cancer cells to low concentrations of androgens induces a self-94 sustained dormant state that is very similar to that induced by hypertonicity and that these effects could be 95 mimicked by transient overexpression of CDKN1A.

96

97 **RESULTS**

98 Androgens treatment of prostate cancer cells cultured at low density induces a G0-G1 cell growth

99 arrest in an androgen receptor-dependent manner

100 We observed that androgens, including testosterone, dihydrotestosterone (DHT) and R1881, a synthetic 101 non-metabolizable androgen, strongly inhibited proliferation of LNCaP* prostate cancer cells plated at 102 low cell density in a slightly hypotonic growth medium (LD-hypo) optimal for clonal cell proliferation 103 [1,2]. Indeed, cloning efficiency of these cells was decreased up to several hundred times at doses of 104 androgen superior to 0.3 nM (Fig. 1A and B). Similar data were obtained with native LNCaP (data not 105 shown) or VCaP (Fig. 1C) but not with Du145 prostate cancer cells lacking AR expression (Fig. 1D), 106 which suggested that this growth-inhibitory effect was dependent on a functional AR. Accordingly, AR 107 antagonists bicatulamide (Bic) or enzalutamide (Enz) strongly alleviated the growth inhibition mediated 108 by androgens when these antagonists were used at clinically relevant concentrations (Fig. 1A, B, C).

Microscope examination of low cell density cultures suggested that androgens at concentrations between 0.2 and 0.5 nM induced a complete arrest of cell proliferation without conspicuous toxicity. Flow cytometry analysis of cell cycle upon propidium-iodide staining confirmed that more than 97% of the cells harvested after culturing at low density in the presence of R1881 for 7 days were confined to the G0/G1 phase of the cell cycle (Fig. 1E, F).

114

115 Transient androgen treatment of prostate cancer cells at low cell density is sufficient to induce a self-

116 sustained cellular quiescence (dormancy) that is reversed by BMP/TFGβ signaling inhibitors and

117 reduced thiols

118 To get more insights into the mechanisms involved in androgen-induced growth-arrest, we 119 analyzed whether and rogen treatment of cells cultured at low cell density could induce the expression of a 120 dormancy signature comprising twenty genes, that we have previously characterized for prostate cancer 121 cells rendered dormant by exposure to hypertonicity at low cell density [2]. A 7-day treatment with R1881 122 modulated expression of nearly all these dormancy signature genes with a significant induction of stress, 123 differentiation and SMAD signaling markers (Fig. 2B, C, S1, red bars). This suggested that androgen-124 induced growth arrest might be related to hypertonicity-induced dormancy. Since hypertonicity-induced 125 dormancy is a stable quiescent state that requires only a transient exposure to hypertonicity for induction 126 and that can be fully reversed upon cell treatment with reduced thiols and/or inhibitors of $TGF\beta/BMP$ 127 signaling [1,2], we examined whether the growth-arrested state elicited by androgens shared similar 128 properties. We observed that a transient treatment with R1181 at doses superior to 0.2 nM for 7 days was 129 sufficient to induce a strong decrease of cloning efficiency (Fig. 2D and E, orange bars). As cells were 130 maintained in culture for 20 days after withdrawal of R1881 in our assay and 10 days were sufficient for 131 non-treated cells to form identifiable cell clones, the strong decrease in cloning efficiency caused by 132 transient R1881 treatment suggested that the cell growth-arrest induced by R1881 persisted at least 10 133 days after its withdrawal. Analysis of cell cycle by flow cytometry confirmed that more than 91% of the

134 treated cells were still in the G0/G1 phase of the cell cycle 7 days after withdrawal of R1881 (Fig. 2F and 135 G). Additionally, RT-qPCR analysis of cells performed 7 days after withdrawal of R1881 (i. e. 14 days 136 after the initiation of experiment), showed that most of the dormancy signature genes remained expressed 137 at levels closed to those measured just at the end of the androgen treatment at day 7 (Fig. 2B and C, yellow 138 columns). The slight decrease in dormancy genes expression observed at day 14 could result from the 139 contribution of proliferating cells that have escaped dormancy induction and/or to the decrease of AR 140 signaling that directly regulated transcription of genes like KLK3 (encoding Prostate Specific Antigen). 141 Overall, our data suggested that the growth-arrest induced by transient androgen treatment at low cell 142 density was stable after withdrawal of the exogenous androgens, at least one a time scale of ten days. 143 Nevertheless, this growth arrest could be efficiently reversed if glutathione (GSH) or N-acetylcysteine 144 (NAC) and inhibitors of TGF β /BMP receptors (K02288 and SB505124) were added at the end of 145 androgen treatment at day 7 of the experiment (GSK and NSK in Fig. 2D and E, pink bars). Interestingly, 146 AR antagonists, in contrast to GSK cocktail, were ineffective to reverse the growth arrest induced by 147 androgens when they were added at the end of R1881 treatment (at day 7, Fig. 3A and B). As a control, 7-148 day treatment with the sole AR antagonist Bic or Enz only slightly decreased cloning efficiency, showing 149 that the growth-inhibitory effect of AR antagonists, in contrast to AR agonists, was largely spontaneously 150 reversed upon their withdrawal (Fig. 3C and D and see also Fig. 1A and 1B for the effects of longer 151 treatments). These experiments showed that the stability of the quiescent state induced by transient 152 exposure to androgens did not rely on a sustained AR activity but rather was achieved through a Hit-and-153 Run mechanism.

154

155 Androgen-induced SMAD signaling and redox imbalance became self-sustained in dormant cells

The data described above suggested that androgens, like hypertonicity, could induce a stable cellular quiescence (that we called dormancy from here) through the induction of both cell redox imbalance and SMAD signaling activation. Thus, we assessed SMAD phosphorylation in androgen-

159 induced dormancy by Western blot. As shown in Fig. 4A and 7C, SMAD phosphorylation was increased 160 by the mere culture of VCaP or LNCaP* cells at low cell density for 7 days, in agreement with our 161 observation that culture at low cell density is sufficient to increase expression of markers of TGFB/BMP 162 activation (Fig. 2B, C, S1 and see [2]). R1881 treatment further increased SMAD phosphorylation level (Fig. 4A) and this was even more pronounced 7 days after R1881 withdrawal (at the 14th day of culture), 163 164 suggesting that SMAD phosphorylation had become self-sustained in dormant cells (Fig. 4A). Modulation 165 of gene transcription by SMAD signaling was directly supported by analyzing the effects of its inhibition 166 through expression of a small hairpin RNA targeting SMAD4 (shSMAD4, [2]). RT-qPCR analysis of the 167 dormancy signature genes showed that SMAD4 depletion significantly decreased the ability of R1881 to 168 enhance the expression of genes that are known targets of TGF β /BMP-SMAD signaling such as *ID1* or 169 HESI (Fig. S2 and see also [2]). Of note, induction of oxidative stress markers like CDKN1A, HMOX1 170 and AKR1C1 was also blunted, suggesting a modulation of redox imbalance signaling by SMAD-mediated 171 signaling pathway (Fig. S2 and see also [2]). Finally, the functional involvement of TGF β /BMP signaling 172 in the growth arrest induced by androgens was evidenced by the strong reversal effect of the BMP receptor 173 inhibitor K02288 (targeting ALK1, 2, 3, 6 [20]) on the dormant state induced by R1881 (Fig. 4F and G). 174 The TGF^β receptor inhibitor SB505124 (targeting ALK4, 5, 7 [21]) displayed lesser, if any, effects when 175 used alone but reproducibly cooperated with K02288 to reverse dormancy (Fig. 4E and 4G). Similarly, 176 depletion of SMAD4 upon shSMAD4 expression led to a resistance of cells to the growth-inhibitory effect 177 of androgens (Fig. 4E and S2), confirming the implication of SMAD signaling.

To assess redox imbalance, we used a cellular thiol-specific redox sensor (GRX1-roGFP2) formed by the redox-sensitive green fluorescent proteins (roGFP2) fused to the GRX1 protein, that allows rapid equilibration of the roGFP2 moiety with the cell glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) redox couple [22]. Thus, the ratio of oxidized to reduced roGFP2 measured in the cell can be used to generate an *in vivo* readout of the GSH/GSSG redox state. The oxidized and reduced forms of roGFP2 can be easily separated by nonreducing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE),

184 providing a sensitive and highly reproducible fluorescence-independent approach of redox analysis. 185 Accordingly, LNCaP* cells were stably transduced with a retroviral vector expressing GRX1-roGFP2 and 186 the relative levels of reduced and oxidized GRX1-roGFP2 were measured in 3 independent cell 187 populations by redox Western blot analysis. As shown in Fig. 4B and S3, the level of oxidized GRX1-188 roGFP2 was barely detectable in cells cultured at medium cell density but increased about twofold in cells 189 cultured at low cell density for 7 days. Although this effect did not reach statistical significance, it was in 190 agreement with our previous finding that the mere culture at low cell density was sufficient to increase 191 expression of stress markers ([2] and Fig. 2B and C). The relative level of oxidized GRX1-roGFP2 further 192 increased significantly after a 7 day-treatment with R1881 (Fig. 4B and S3). A high level of oxidized 193 GRX1-roGFP2 was maintained after withdrawal of R1881, indicating that the more oxidized glutathione 194 redox state has become self-sustained in dormant cells (Fig. 4B and S3). This oxidative shift of glutathione 195 redox potential was fully reversed when glutathione was added in the growth medium after withdrawal of R1881 at the 7th day, consistent with the antioxidant effect of glutathione (Fig. 4B and S3). Several 196 197 additional observations supported that cells sensed these redox changes. First, the oxidative shift of 198 glutathione redox potential in LNCaP* cells correlated to an increased expression of the oxidative stress 199 markers CDKN1A and HMOX1, expression of HMOX1 becoming maximal when roGFP2 sensor was 200 maximally oxidized after withdrawal of R1881 (Fig. 4A and S3). Second, RT-qPCR analysis of LNCaP* 201 or VCaP cells showed that GSH, when added with androgens, suppressed the induction of nearly all 202 dormancy signature genes, including all markers of cellular stress (Fig. 4C and D). These changes in genes 203 expression resulting from GSH addition in androgen-treated cells were inversely related to those induced 204 by a pro-oxidant treatment with hydrogen peroxide in cells cultured at medium cell density (Pearson 205 correlation coefficient r > 0.92; p<0.0001, Fig. S4), strongly suggesting that effects of GSH in androgen-206 treated cells were fully accounted by inhibition of a pre-existing oxidative stress. Finally, the functional 207 involvement of redox imbalance in androgen-induced dormancy was supported by the fact that thiol 208 antioxidants such as GSH and NAC were able to partially revert androgen-induced dormancy when added 209 after androgen withdrawal (Fig. 4E, F, G).

213 To define the role of cell density in androgen-induced dormancy, we analyzed the effects of 214 androgen treatment on cell cultured at medium cell density. R1881 at 0.2 nM had no significant effect on 215 the rate of VCaP cell proliferation (Fig. 5A) whereas it progressively decreased proliferation rate of 216 LNCaP*, a complete growth arrest being observed after an exposure to R1881 for 11 days (Fig. 5B). 217 However, this growth arrest was unstable as cells resumed proliferation 4 days after withdrawal of R1881 218 (Fig. 5B). Long-term treatment with 0.5 nM DHT (12 days) or shorter duration treatment with 0.2 nM 219 R1881 (7 days) induced weaker effects, failing to reach a complete cell growth arrest and quicker recovery 220 after washing out of the exogenous androgens (Fig. S5 and data not shown). To get more insights into the 221 differential effects of androgens in relation to cell density, we compared the effects of R1881 on 222 expression of the dormancy signature genes for cells cultured at low and medium density. VCaP cells at 223 medium cell density displayed no significant change regarding the expression of these genes (except for 224 KLK3) following 11 days in the presence of R1881, suggesting that neither TGFB/BMP nor redox 225 imbalance signaling was activated under these conditions (Fig. 5C). In contrast, LNCaP* cells at medium 226 cell density displayed a pattern of gene expression after 11 days in the presence of R1881 which was 227 similar to that found in cells treated at low cell density for 7 days. Notably, however, a decreased 228 induction of oxidative stress markers like AKR1C1, HMOX1 and NQO1 was observed leading to a 229 Pearson correlation coefficient of 0.65 (Fig. 5D). Accordingly, a more complete concordance (r = 0.89) 230 could be observed if the pattern of gene expression induced by R1881 at medium density was compared 231 with that of cells at low density in the presence of both R1881 and GSH (Fig. 5E). Additionally, Western 232 blot analysis confirmed that R1881 treatment of cells at medium cell density failed to induce HMOX1 233 expression, as well as CDKN1A in spite of an increased mRNA level (Fig. 5F and S3). These observations 234 suggested that redox imbalance induced by R1881 at medium cell density was weaker than that induced at

235 low cell density. This was confirmed by measuring the effects of R1881 treatment at medium cell density 236 on the oxidization state of the thiol redox potential sensor GRX1-roGFP2 as described in Fig. 4B. Data 237 showed a trend towards an increase of the level of oxidized GRX1-roGFP2 that was smaller than that 238 induced by the mere cell culture at low cell density and did not reach statistical significance (Fig. 5G). We also noted that R1881 induced an about twofold increase of SMAD phosphorylation in LNCaP* cells (Fig. 239 5F), which correlated with induction of markers of SMAD activation like SMAD7 and ID1 (Fig. 5D), 240 241 indicating that TGFB/BMP signaling was activated by R1881 at medium cell density. Addition of the 242 K02288, inhibitor of BMP receptors, or of glutathione alleviated the growth-inhibitory effect of R1881 on 243 cells at medium density (Fig. 5H). This suggested that mechanisms involved in the growth-arrest induced 244 by R1881 at medium cell density were in part similar to those involved in dormancy but that the instability 245 of the growth-arrest correlated to a diminished induction of oxidative stress and oxidative stress markers 246 like CDKN1A.

247

248 Transient CDKN1A overexpression in cells cultured at low cell density is sufficient to induce a self249 sustained quiescent state regulated by redox imbalance and SMAD signaling

250 To better characterize the cell signaling pathways involved in redox imbalance in dormant cells, we focused on the role of CDKN1A protein (p21^{CIP1}) since its level correlated tightly with the degree of 251 252 redox imbalance (Fig.4A and 5F). A functional involvement of CDKN1A in androgen-induced dormancy 253 was investigated by examining the effects of its depletion. Targeting of CDKN1A with a doxycyline 254 (dox)-inducible specific shRNA (shp21 [23]) induced ~75% decrease of both CDKN1A mRNA and protein (p21^{CIP1/waf1/Sdi1}) levels (Fig. 6B). Remarkably, CDKN1A depletion increased by about 7 times the 255 256 cloning efficiency of cells treated with R1881 for 7 days (Fig. 6C) as compared to cells transduced with a 257 control vector. However, effect of CDKN1A depletion was diminished when it was started after the end of 258 the 7-days-treatment with R1881 (Fig. 6C). This suggested that CDKN1A played a significant role in the 259 establishment of the dormant state. To further investigate this point, we examined whether transient

260 overexpression of CDKN1A in cells cultured at low cell density could substitute for androgen or 261 hypertonicity to induce a self-sustained growth arrest. Accordingly, we derived LNCaP* cell populations 262 that were transduced with a doxycycline (dox)-inducible control (pTRIP-control) or CDKN1A expressing 263 (pTRIP-p21) lentiviral vector. We observed that induction of pTRIP-p21 expression by doxycycline (dox) 264 for 7 days in cells cultured at low density was sufficient to decrease their cloning efficiency by ~ 100 -fold 265 as compared to control cells (Fig. 7B). This inhibitory effect was partially reversed when glutathione or pharmacological inhibitors of BMP and TGF β receptors were added after the washing-out of dox at the 7th 266 267 day and nearly fully reversed when both were added simultaneously (Fig. 7B). Western blot analysis 268 showed that levels of expression of HMOX1 and CDKN1A were increased ~2 and ~4 times respectively 269 in pTRIP-p21 transduced cells after a 7-day dox treatment, and these levels were further augmented 1.5 270 and 2 times respectively at day 14, 7 days after withdrawal of dox (Fig. 7C). This implied that endogenous 271 CDKN1A has been induced, since RT-qPCR analysis showed that expression of CDKN1A transcripts 272 derived from the transduced lentiviral vector sharply decreased to nearly background levels 7 days after 273 dox withdrawal at day 14 (Fig. 7D). SMAD phosphorylation also increased about two fold by day 14, but 274 no significant increase could be detected at day 7 at the end of dox treatment (Fig. 7C). Of note, dox 275 displayed no such effect in control cells (Fig. 7C), suggesting that transient exogenous CDKN1A 276 overexpression for 7 days at low cell density was sufficient to trigger endogenous CDKN1A and HMOX1 277 expression and SMAD phosphorylation in a self-sustained manner. These observations were confirmed by 278 RT-qPCR analysis of the expression of the dormancy signature genes. Transient CDKN1A overexpression 279 for 7 days induced some changes in the level of expression for most of the dormancy signature genes, but 280 these changes were further amplified after an additional 7-days of culture in dox-free medium (Fig. 7E). 281 Indeed, as ascertained by Pearson's correlation coefficients (Table 1), the pattern of gene expression 282 induced by CDKN1A reached a high level of similarity with that of dormant LNCaP* cells induced by 283 transient exposure to androgens (Fig. 7F) only at day 14. In order to test whether this dormant state which 284 was reached at day 14 used the same self-sustaining mechanisms as the dormant states induced by the 285 androgens or exposure to a hypertonic medium, we exposed cells to glutathione and inhibitors of TGF β /BMP receptors. As shown in Fig. 7G, glutathione or inhibitors of TGF β /BMP receptors could almost fully reverse this growth arrest when added in combination, a partial reversion being observed when these compounds were used separately.

In contrast to these long-term effects observed in cells at low density, CDKN1A overexpression in cells at medium density induced only a transient growth-arrest, cells resuming proliferation immediately after withdrawal of dox (Fig. S5). Taken together, our data showed that the induction of dormancy by transient CDKN1A overexpression, exposure to androgens or to hypertonicity shared not only the same self-sustaining mechanisms but also a marked dependency on cell density.

297 **DISCUSSION**

298 In this work, we characterized a self-sustained quiescent state which can be induced in prostate 299 cancer cells cultured at low density by exposure to androgens or ectopic expression of CDKN1A. The 300 maintenance of this quiescent state no longer required the inducer and was dependent upon a redox 301 imbalance and a TGF β /SMAD signaling, as we have previously described for the quiescence induced by a 302 slightly hypertonic medium [2]. Thus, several inducers targeting different biological pathways can lead to 303 a similar self-sustained quiescent state. Moreover, reducing redox imbalance or TGF β /BMP signaling can 304 allow cells to resume growth indicating that, although stable and self-sustained, this quiescence can be 305 reversed and qualifies as a dormant state.

306 In each of these dormancy phenomena, we could distinguish an induction phase from a maintenance 307 phase (Fig. 8). Thus, while AR antagonists could block entry in quiescence when added at the same time 308 as the androgen, they were no longer effective when added later (compare Fig. 1 and 3). Similarly, 309 switching cells from hypertonic to hypotonic conditions was not sufficient to reverse quiescence once it 310 had been established [2]. Induction of dormancy as well as establishment of the maintenance phase took 311 place over a time scale of several days. Indeed, although cells at low cell density displayed the essential 312 features of dormancy after a 7-day treatment with androgens (Table 1), the dormant state was not yet fully 313 established since SMAD phosphorylation and CDKN1A protein level (as well as of HMOX1 for LNCaP* 314 cells) further augmented 7 days later (Fig. 4A). Of note, transient overexpression of CDKN1A was 315 markedly slower in inducing the expression profile of dormancy (compare correlation coefficient at day 7 316 and 14 in Table 1). Thus, SMAD phosphorylation was observed only after 14 days while the levels of 317 CDKN1A and HMOX1 were still increasing. These observations support a model in which inducers of 318 dormancy set up a progressive reprogramming of cells leading to a growth arrest which then self-stabilizes 319 itself by positive feedback loops. In agreement, changes in genes expression occurring over a long period

have been documented in others types of cell quiescence [24], suggesting that most quiescent statesrequire an extensive reprogramming of gene expression.

322 Whether dormancy is induced by androgens, transient expression of CDKN1A or a slightly 323 hypertonic medium, the maintenance phase is dependent upon an activation of TGF β /BMP signaling and a 324 redox imbalance (Fig. 8). Importantly, although these two pathways induce distinct, albeit pleiotropic 325 responses, they are strongly interconnected in dormant cells since suppression of redox imbalance with 326 reduced thiols strongly inhibited the expression of TGFB/BMP-SMAD signaling targets (Fig. 4C and D 327 and see Fig. 3E in [2]), and reciprocally, the induction of oxidative stress markers such as HMOX1 and 328 AKRC1 was reduced upon inhibition of SMAD signaling (Fig. S2 and see Fig. S4 in [2]). An 329 interconnection between redox imbalance and SMAD signaling has been reported in other cellular 330 contexts (see for instance [25-28,29,30,31]), suggesting that it has wide ranging biological implications. 331 Importantly, this could in part explain how distinct inducing signaling pathways converge onto similar 332 end-states (Fig. 8). That the processes initially activated by androgens and hypertonicity differed was 333 demonstrated by the ineffectiveness of AR antagonists to prevent dormancy induced by hypertonicity 334 (data not shown). The observation that CDKN1A silencing could prevent the establishment of dormancy 335 by androgens establishes that CDKN1A is part of the cellular response to androgens. It should not be 336 taken, however, as indicating that androgens and CDKN1A act through the same pathways. Indeed, 337 beyond the difference in kinetics discussed above, CDKN1A overexpression, in contrast to androgens, 338 primarily enhanced redox imbalance since it enhanced expression of the oxidative stress marker HMOX1 339 before activating SMAD phosphorylation (Fig. 7B). Rather, these observations are in agreement with a 340 slow convergence of different reprogramming cascades enabled by the coupling of the two central 341 effectors which are redox imbalance and TGFB/BMP signaling.

Thus, as has been observed for senescence, multiple inducers can induce closely similar cellular states indicating that dormancy is a robust and stable configuration in the phenotypic space. However this is valid only for cells cultured at low cell density since these inducers failed to efficiently activate these signaling pathways in cells at medium density (this work, data not shown and [2]). Interestingly, the

synthetic androgen R1881 could induce a growth arrest in LNCaP* cells cultured at medium cell density 346 347 which was dependent upon an induction of TFG β /BMP and redox signaling. However, this growth-arrest 348 was unstable as it persisted for only a few days after androgen withdrawal, which correlated with a lack of 349 induction of some oxidative stress markers like CDKN1A. Thus, our data indicates that, at medium 350 density, cells are not completely refractory to dormancy inducers but their partial response fails to induce a 351 self-sustaining oxidative stress and TGF β /BMP signaling. This could reflect the impact of homotypic 352 cellular interactions on the primary response to the inducers or/and on the establishment of the self-353 sustaining loops. This would be in agreement with the finding that breast cancer cell density above a 354 threshold could inhibit their quiescence induced by culturing in Matrigel [32]. In contrast, heterotypic 355 interactions with non-cancerous cells could promote cancer cell quiescence as suggested by 3D co-culture 356 experiments of breast cancer cells with mixed cell types [33] and in vivo observations showing that 357 disseminated melanoma and breast cancer cells are highly prone to enter into a dormant state after their 358 extravasation into the parenchyma of distant organs [34-38]. It is therefore possible that entry into 359 dormancy requires that critical thresholds of TGF β /BMP signaling and redox imbalance are achieved in a 360 cancer cell density manner to allow the growth arrest to be self-sustained.

361 Our findings presented in this study may have potential therapeutic applications. It is known that 362 more than 10% of patients treated with radical prostatectomy for prostate cancer will have a metastatic 363 relapse of their cancer within the next ten years, most likely due to an early metastatic spread of cancer 364 cells that colonizes distant organs as solitary cancer cells [39]. Therefore, transient treatments with 365 androgens could enhance their transition towards a dormant state and/or stabilize their dormancy, thereby 366 delaying the development of clinical metastases. This would be effective if the treatment is started after 367 radical prostatectomy, at a time when cancer cells are still solitary, since, as indicated by our data, clusters 368 of interacting cancer cells may become resistant to induction of dormancy. This therapy should be 369 complementary to medical castration as androgen deprivation is likely to be the driving force which leads 370 prostate cancer cells to be hypersensitive to androgens and to enter into dormancy in response to 371 physiological levels of androgens. Moreover, repeated cycles of androgen deprivation and 372 supplementation could be envisioned, as AR antagonists did not destabilize dormancy once established 373 (Fig. 3A). Thus, even if an androgen treatment does not provide a complete protection from relapse it 374 could be a welcomed therapeutic addition since a twofold reduction in the frequency of escape from 375 dormancy would translate in a two-fold extension of progression free survival at a very limited cost.

376

377

378 ACKNOWLEDGMENTS

379 T. T. is grateful to Peters Gordon and Tobias Dick for providing plasmids and to Anne Chauchereau for

the gift of R1881 and Enzalutamide. This work was supported by the Centre National de la Recherche

381 Scientifique (CNRS). M-E.H. is also supported by the Institut Curie. A.T. B. is a recipient of a doctoral

382 fellowship from the 'Ecole Doctorale de Cancérologie de Paris-Saclay'.

384 **REFERENCES**

385

386

- Havard M, Dautry F, Tchenio T (2011) A dormant state modulated by osmotic pressure controls
 clonogenicity of prostate cancer cells. J Biol Chem 286: 44177-44186.
- 2. Bui AT, Laurent F, Havard M, Dautry F, Tchenio T (2015) SMAD signaling and redox imbalance
 cooperate to induce prostate cancer cell dormancy. Cell Cycle 14: 1218-1231.
- 391 3. Wang ZA, Shen MM (2011) Revisiting the concept of cancer stem cells in prostate cancer. Oncogene
 392 30: 1261-1271.
- 4. Choi N, Zhang B, Zhang L, Ittmann M, Xin L (2012) Adult murine prostate basal and luminal cells are
 self-sustained lineages that can both serve as targets for prostate cancer initiation. Cancer Cell 21:
 253-265.
- 396 5. Wadosky KM, Koochekpour S (2016) Molecular mechanisms underlying resistance to androgen
 397 deprivation therapy in prostate cancer. Oncotarget.
- 398 6. Langeler EG, van Uffelen CJ, Blankenstein MA, van Steenbrugge GJ, Mulder E (1993) Effect of
 399 culture conditions on androgen sensitivity of the human prostatic cancer cell line LNCaP. Prostate
 400 23: 213-223.
- 401 7. Umekita Y, Hiipakka RA, Kokontis JM, Liao S (1996) Human prostate tumor growth in athymic mice:
 402 inhibition by androgens and stimulation by finasteride. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 11802403 11807.
- 404 8. Kokontis JM, Hay N, Liao S (1998) Progression of LNCaP prostate tumor cells during androgen
 405 deprivation: hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen, and role for
 406 p27Kip1 in androgen-induced cell cycle arrest. Mol Endocrinol 12: 941-953.

- 407 9. Tsihlias J, Zhang W, Bhattacharya N, Flanagan M, Klotz L, et al. (2000) Involvement of p27Kip1 in G1
 408 arrest by high dose 5 alpha-dihydrotestosterone in LNCaP human prostate cancer cells. Oncogene
 409 19: 670-679.
- 410 10. Chuu CP, Hiipakka RA, Fukuchi J, Kokontis JM, Liao S (2005) Androgen causes growth suppression
 411 and reversion of androgen-independent prostate cancer xenografts to an androgen-stimulated
 412 phenotype in athymic mice. Cancer Res 65: 2082-2084.
- 413 11. Tararova ND, Narizhneva N, Krivokrisenko V, Gudkov AV, Gurova KV (2007) Prostate cancer cells
 414 tolerate a narrow range of androgen receptor expression and activity. Prostate 67: 1801-1815.
- 415 12. Vander Griend DJ, Litvinov IV, Isaacs JT (2007) Stabilizing androgen receptor in mitosis inhibits
 416 prostate cancer proliferation. Cell Cycle 6: 647-651.
- 417 13. Chuu CP, Kokontis JM, Hiipakka RA, Fukuchi J, Lin HP, et al. (2011) Androgen suppresses
 418 proliferation of castration-resistant LNCaP 104-R2 prostate cancer cells through androgen
 419 receptor, Skp2, and c-Myc. Cancer Sci 102: 2022-2028.
- 14. Isaacs JT, D'Antonio JM, Chen S, Antony L, Dalrymple SP, et al. (2012) Adaptive auto-regulation of
 androgen receptor provides a paradigm shifting rationale for bipolar androgen therapy (BAT) for
 castrate resistant human prostate cancer. Prostate 72: 1491-1505.
- 423 15. Mirochnik Y, Veliceasa D, Williams L, Maxwell K, Yemelyanov A, et al. (2012) Androgen receptor
 424 drives cellular senescence. PLoS One 7: e31052.
- 16. Thelen P, Heinrich E, Bremmer F, Trojan L, Strauss A (2013) Testosterone boosts for treatment of
 castration resistant prostate cancer: an experimental implementation of intermittent androgen
 deprivation. Prostate 73: 1699-1709.
- 17. Roediger J, Hessenkemper W, Bartsch S, Manvelyan M, Huettner SS, et al. (2014) Supraphysiological
 androgen levels induce cellular senescence in human prostate cancer cells through the Src-Akt
 pathway. Mol Cancer 13: 214.
- 431 18. Sedelaar JP, Isaacs JT (2009) Tissue culture media supplemented with 10% fetal calf serum contains a
 432 castrate level of testosterone. Prostate 69: 1724-1729.

- 433 19. Makkonen H, Kauhanen M, Jaaskelainen T, Palvimo JJ (2011) Androgen receptor amplification is
 434 reflected in the transcriptional responses of Vertebral-Cancer of the Prostate cells. Mol Cell
 435 Endocrinol 331: 57-65.
- 436 20. Sanvitale CE, Kerr G, Chaikuad A, Ramel MC, Mohedas AH, et al. (2013) A new class of small
 437 molecule inhibitor of BMP signaling. PLoS One 8: e62721.
- 438 21. Vogt J, Traynor R, Sapkota GP (2011) The specificities of small molecule inhibitors of the TGFbs and
 439 BMP pathways. Cell Signal 23: 1831-1842.
- 440 22. Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, et al. (2008) Real-time imaging of the
 441 intracellular glutathione redox potential. Nat Methods 5: 553-559.
- 23. Zemskova M, Lilly MB, Lin YW, Song JH, Kraft AS (2010) p53-dependent induction of prostate
 cancer cell senescence by the PIM1 protein kinase. Mol Cancer Res 8: 1126-1141.
- 444 24. Coller HA, Sang L, Roberts JM (2006) A new description of cellular quiescence. PLoS Biol 4: e83.
- 25. Li H, Sekine M, Seng S, Avraham S, Avraham HK (2009) BRCA1 interacts with Smad3 and regulates
 Smad3-mediated TGF-beta signaling during oxidative stress responses. PLoS One 4: e7091.
- 26. Zhu D, Wu J, Spee C, Ryan SJ, Hinton DR (2009) BMP4 mediates oxidative stress-induced retinal
 pigment epithelial cell senescence and is overexpressed in age-related macular degeneration. J
- 449 Biol Chem 284: 9529-9539.
- 450 27. Dyer LA, Pi X, Patterson C (2014) The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction.
 451 Trends Endocrinol Metab 25: 472-480.
- 452 28. Kretova M, Sabova L, Hodny Z, Bartek J, Kollarovic G, et al. (2014) TGF-beta/NF1/Smad4-mediated
- 453 suppression of ANT2 contributes to oxidative stress in cellular senescence. Cell Signal 26: 2903454 2911.
- 455 29. Hubackova S, Kucerova A, Michlits G, Kyjacova L, Reinis M, et al. (2015) IFNgamma induces
 456 oxidative stress, DNA damage and tumor cell senescence via TGFbeta/SMAD signaling457 dependent induction of Nox4 and suppression of ANT2. Oncogene.

| 458 | 30. Kim YK, Bae GU, Kang JK, Park JW, Lee EK, et al. (2006) Cooperation of H2O2-mediated ERK |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 459 | activation with Smad pathway in TGF-beta1 induction of p21WAF1/Cip1. Cell Signal 18: 236- |
| 460 | 243. |

- 461 31. Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z (2012) IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative
 462 stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug463 induced paracrine 'bystander senescence'. Aging (Albany NY) 4: 932-951.
- 464 32. Shibue T, Weinberg RA (2009) Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation
 465 of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. ProcNatlAcadSciUSA 106: 10290-10295.
- 33. Marlow R, Honeth G, Lombardi S, Cariati M, Hessey S, et al. (2013) A novel model of dormancy for
 bone metastatic breast cancer cells. Cancer Res 73: 6886-6899.
- 468 34. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, et al. (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone
 469 marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. NEnglJ Med 342: 525-533.
- 470 35. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, et al. (2000) Temporal progression
- 471 of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency.
 472 Cancer Res 60: 2541-2546.
- 473 36. Goodison S, Kawai K, Hihara J, Jiang P, Yang M, et al. (2003) Prolonged dormancy and site-specific
 474 growth potential of cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as
 475 revealed by labeling with green fluorescent protein. Clin Cancer Res 9: 3808-3814.
- 37. Naumov GN, MacDonald IC, Weinmeister PM, Kerkvliet N, Nadkarni KV, et al. (2002) Persistence of
 solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. Cancer
 Res 62: 2162-2168.
- 479 38. Gao H, Chakraborty G, Lee-Lim AP, Mo Q, Decker M, et al. (2012) The BMP inhibitor Coco
 480 reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. Cell 150: 764-779.
- 39. Morgan TM, Lange PH, Porter MP, Lin DW, Ellis WJ, et al. (2009) Disseminated tumor cells in
 prostate cancer patients after radical prostatectomy and without evidence of disease predicts
 biochemical recurrence. Clin Cancer Res 15: 677-683.

- 484 40. He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, et al. (2006) Hematopoiesis
 485 controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. Cell 125: 929486 941.

490 MATERIALS AND METHODS

491 Plasmids, chemicals and primary antibodies: Plasmid pTRIPz-shp21 (V2THS 202469 from Open 492 Biosystems) and pBabepuro-shSMAD4 were previously characterized [2,23,40]. Doxycycline (dox)-493 inducible pTRIP-p21 vector was constructed by inserting a blunt-ended BamHI-EcoRI human CDKN1A 494 cDNA fragment excised from p21-pBabe-puro (a kind gift from Gordon Peters, Cancer Research UK -495 London Research Institute) in place of the RFP-shRNA cassette of pTRIPz-shp21 excised upon AgeI to 496 *MluI* restriction followed by klenow treatment. pFbneo-GRX1-roGFP2 vector was constructed by ligating 497 the SmaI-NotI-digested GRX1-roGFP2 DNA fragment excised from plasmid pEIGW-GRX1-roGFP2 [22] 498 (a kind gift from Tobias Dick, Addgene plasmid # 64990) to the *EcoR*I-cut and klenow-treated and Not1-499 cut pFbneo vector (Stratagene). K02288 was from Tocris (ref. 4986), SB505124 was from Abcam (ref. 500 ab144402), reduced L-glutathione (ref. G6013) and N-ethylmaleimide (ref. E3876) from Sigma-Aldrich. 501 Primary antibodies used were anti-CDKN1A (ref. sc-6246, Santa Cruz Biotechnology), anti-HMOX1 (ref. 502 sc-136960, Santa Cruz Biotechnology), anti-Phospho-SMAD1/5 (Ser463/465) (ref. 9516, Cell Signaling), 503 anti-SMAD1 (ref. 6944, Cell Signaling), anti-GAPDH (ref. 5174, Cell signaling) and anti-GFP (ref. A-504 11122, ThermoFisher Scientific).

505

506 Cell culture, recombinant retrovirus production, infection and flow cytometry: LNCaP*, VCaP, 507 DU145 prostate cancer cells were previously described [2]. DMEM-FCS referred to DMEM (containing 508 862 mg/l glutamax-I, 4.5 g/l glucose and 1 mM pyruvate, ref. 31966, Gibco) supplemented with 10% fetal 509 calf serum (PAA Laboratories) and penicillin plus streptomycin 1X solution (Life Technologies). All 510 experiments were conducted in hypotonic growth medium made by supplementation of DMEM-FCS with 511 25% H₂O, which was previously shown to be optimal for cloning of LNCaP* and VCaP cells ([2] and data 512 not shown). MD-hypo and LD-hypo referred to cell culture at medium and low cell density in hypotonic growth-medium, cells being passaged at about 2 \times 10⁴ and 10² cells cm⁻², respectively. For cloning 513

514 efficiency experiments, cells were cultured as indicated under LD-hypo conditions and the numbers of 515 colonies per dish counted directly by microscope examination (for VCaP cells) or after fixing in 10% 516 glacial acetic acid plus 20% ethanol and staining with a solution containing 0.2% crystal violet (Sigma-517 Aldrich) in 10% glacial acetic acid and 20% methanol (for LNCaP*cells and a few experiments with 518 VCaP cells). Cloning efficiency was calculated as the ratio of the number of cell colonies per dish to the 519 number of seeded cells per dish. Recombinant retroviruses were produced as previously described, 520 PVPack-gappol plasmid (Stratagene) and pCMV-ΔR8.74 being used for lentiviral and murine recombinant 521 retroviruses, respectively [2]. Viral transduction and flow cytometry for analysis of cell DNA content were 522 performed as previously [1]. Induction of lentiviral vectors expression was carried out with doxycycline 523 (dox) at 0.5 µg/ml.

524

525 Western Blot analysis under non-reducing conditions: Cells were incubated with 20 mM Nethylmaleimide (NEM) in PBS (4 ml for a 10-cm diameter dish) for 5 min at room temperature, harvested 526 527 by pipetting after addition of fetal calf serum to 0.5% and EDTA to 1 mM final concentrations, washed 528 with cold PBS and lysed by a 30 min incubation on ice in EBC lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 120 529 mM NaCl, 10 mM EDTA and EGTA, Protease inhibitors cocktail (ref. P8340, Sigma-Aldrich) diluted 100 530 times, 1 mM PMSF, 20 mM NaF and 10 mM sodium orthovanadate). The supernatant recovered after a 531 10-min centrifugation at 13,000 rpm and 4°C was aliquoted for protein quantitation according to a 532 modified Bradford protocol [2] or mixed with Laemmli buffer without β -mercaptoethanol and boiled for 5 533 min before loading for SDS-PAGE electrophoresis. Proteins were blotted electrophoretically onto a 0.45-534 µm-pore-size polyvinylidene difluoride membrane (Hybond P, Amersham). Immunodetection was 535 performed by using a Horseradish Peroxidase detection kit (ECL Select detection kit, Amersham) with the 536 indicated primary antibody and high performance chemiluminescence film (Hyperfilm ECL, Amersham). 537 Films were digitalized into TIFF format with a trans-illuminating scanner (Scan Epson Perfection 4490 538 Photo, 16 bits grey at 1200 dpi) and relative intensity of close bands were measured with the Image Studio 539 Lite Western Blot analysis software (LI-COR Biotechnology).

541 Western Blot analysis under reducing conditions: It was carried out essentially as above except 542 that NEM treatment was omitted and denaturation of proteins was carried out in complete Laemmli buffer 543 with 100 mM β -mercaptoethanol. Additionally, quantification of the relative intensity of well-separated 544 bands was carried out with the ImageJ software following the standard procedure for gel quantification.

545

546 RT-qPCR assays: RT-qPCR analysis was performed as precisely described in [2]. In these assays 547 we kept GAPDH as a reference gene for normalization of data derived from independent cDNA synthesis 548 reactions since it showed only small variations in its level of expression between different cell culture 549 conditions (on average, less than 50% variation as normalized to the amount of total RNA added into the 550 cDNA synthesis reaction). The levels of each mRNA species were also normalized to that measured under 551 MD-hypo condition, set at 1 (arbitrary unit) in all experiments. Primers sequences hybridizing to the Ubgc 552 promoter in pTRIP-p21 were Ubac1-F: AGACTCGGCCTTAGAACC and Ubac1-R: 553 AGACTCGGCCTTAGAACC. Others primers sequences were given in [2].

554

Statistical analysis: data are presented as mean \pm standard deviation (mean \pm sd). Significance (p value) of variations was calculated using a paired or a heteroscedatic Student's t test with unilateral distribution andwas indicated as **** for p < 0.002, *** for p < 0.01, ** for p < 0.05 and * for p < 0.1. For correlation analysis between patterns of mRNA accumulation measured under different cell culture conditions, the linear correlation coefficient of Pearson was calculated for the dormancy signature genes as previously [2]. Significance of the correlation coefficients was calculated on the VassarStats web site (http://vassarstats.net/rsig.html).

562

563 **LEGENDS TO FIGURES**

565 Figure 1: Strong inhibitory effect of androgens on the cloning efficiency of AR-expressing prostate 566 cancer cells and its suppression by AR antagonists. A), B), C) and D) Cloning efficiency of LNCaP*, 567 VCaP and Du145 prostate cancer cells in the presence of the indicated concentration of androgen and/or 568 AR antagonist. Reported values are the mean \pm sd derived from at least two independent experiments with 569 duplicates. Stars indicated statistical significance of the growth-inhibitory effects of androgens as 570 compared to non-treated cells (black stars) and of its suppression by AR antagonists as compared to cells 571 treated only with androgen (red stars). E) and F) Cell cycle analysis of LNCaP* and VCaP cells cultured 572 for 7 days under LD-hypo conditions in the presence of none or 0.5 nM R1881. Cells were analyzed by 573 flow cytometry after propidium iodide staining. A two-step gating procedure using Side SCattering-Height 574 versus Forward SCattering-Height (data not shown) followed by pulse Area versus pulse Width 575 FLuorescence (FL2-A versus FL2-W) was performed to eliminate cell doublets. Gated region is indicated 576 on the FL2-A versus FL2-W dot plot representation. Lower panels are fluorescence histograms. One 577 representative experiment about three is shown.

578

579 Figure 2: Transient exposure of cells cultured at low density to androgen induced a self-sustained 580 but reversible growth arrest in the G0-G1 phase of cell cycle. A) Scheme of experimental design for 581 transitory R1181 treatments. Cells were cultured for 7 days under LD-hypo conditions in the presence 582 R1881 at the indicated concentration, then washed three times and further cultured in the presence of the 583 indicated compounds (LD-hypo + R1881 \rightarrow LD-hypo ± none or GSK or NSK). GSK was 8 mM GSH, 584 0.2 µM SB505124 and 0.2 µM K02288 and NSK 8 mM NAC, 0.2 µM SB505124 and 0.2 µM K02288. 585 For cloning efficiency measurement, cell colonies were counted at day 27. RT-qPCR and flow cytometry 586 analysis were performed at day 7 (LD-hypo and LD-hypo + R1881) and 14 (LD-hypo + R1881 \rightarrow LD-587 hypo). B) and C) RT-qPCR analysis of the variations in the expression of the dormancy signature genes according to the indicated cell culture conditions in LNCaP* and VCaP cells. R1881 was used at a 0.5 nM 588 589 concentration. Values are the mean \pm sd derived from two independent experiments. Stars indicated 590 statistical significance for the differences in mRNA levels between cells cultured under LD-hypo and LD-

591 hypo + R1881 (red stars) or LD-hypo + R1881 \rightarrow LD-hypo (black stars) conditions. D) and E) Inhibition 592 of the cloning of LNCaP* and VCaP cells by R1881 and its subsequent reversal by the GSK or NSK mix. 593 Data are averaged from 2 and 3 independent experiments for LNCap* and VCaP cells respectively. 594 Statistical significance of the effect of R1881 as compared to non-treated cells (red stars) and of the effects 595 of the GSK or NSK mix as compared to cells treated with R1881 only (blue stars) are indicated. F) and G) 596 Cell cycle analysis of LNCaP* and VCaP cells after a 7-days culture in the presence 0.5 nM R1881 597 followed by a 7-days culture without R1881 under LD-hypo conditions. Data are derived from the same 598 experiment as those displayed in Fig. 1E and F.

599

Figure 3: Ineffectiveness of AR antagonists to reverse dormancy once established after a transient exposure to R1881. A) and C) Schemes of the experimental design for AR antagonist treatments. B) and D) Cloning efficiencies of the cells cultured as indicated. Values are the mean \pm sd of two independent experiments. Only GSK (8 mM GSH, 0.2 μ M SB505124 and 0.2 μ M K02288) treatment displayed a significant effect on the reversal of androgen-induced dormancy (red stars).

605

606 Figure 4: Implication of SMAD signaling and redox imbalance in the maintenance of the dormant 607 state induced by transient exposure to the R1881 androgen. A) Western blot analysis of the levels of 608 SMAD phosphorylation and SMAD1, HMOX1 and CDKN1A expression in LNCaP* and VCaP cells 609 under the indicated culture conditions (see also Fig. 2). Numbers indicate the relative levels of GADPH or 610 the relative amounts of the indicated proteins normalized by GAPDH levels. B) Western blot analysis of 611 the oxidation of the GRX1-roGFP2 sensor in LNCaP* cells under the indicated culture conditions. "red" 612 and "ox" indicate reduced and oxidized forms of GRX1-roGFP2. Values in the lower panel indicate the 613 ratio of the levels of oxidized to reduced GRX1-roGFP2 (ox/red). R1881 was used at a 0.6 nM 614 concentration. The positive control, MD-hypo + H₂O₂, was cells cultured at medium cell density and 615 treated with 100 μ M H₂O₂ for 10 min before cell lysis. Values are mean \pm sd derived from 3 independent 616 transduced cell populations. Stars indicate the statistical significance of the variation of the ox/red ratio

617 between MD-hypo and other cell culture conditions. C) and D) GSH supplementation blunted the gene 618 expression signature of dormancy. Cells were cultured for 7 days in the presence of 0.2 nM R1881or 0.2 619 nM R1881 plus 8 mM GSH under LD-hypo conditions. Variations in the expression of the dormancy 620 signature genes were measured by RT-qPCR as in Fig. 2B) and C). Values are mean \pm sd derived from 621 two independent cell culture experiments. Statistical significance of the differences between dormant and 622 GSH-treated cells is indicated. Cell lysis was performed on day 3 for cells cultured at medium cell density 623 (MD-hypo) and on day 7 or 14 for other conditions as indicated in Fig. 2. E) Partial suppression of 624 androgen-induced dormancy by depletion of endogenous SMAD4 or by GSH supplementation. Cloning 625 efficiency of shLuc (control) and shSMAD4-transduced cell populations were measured in non-treated 626 cells (Ø) or in cells treated for 7 days with 0.3 nM R1881 followed by a culture for 20 additional days in 627 growth medium with none (Ø) or with 8 mM GSH. Values are the mean \pm sd derived from two 628 experiments with two control- and two shSMAD4-transduced cell populations. Statistical significance of 629 the variation between *shSMAD4* and *shLuc* cells (red stars) and of the effect of GSH (yellow stars) are indicated. F) and G) Reversal of R1881-induced dormancy in LNCaP* et VCaP cells by GSH, inhibitors 630 631 of TGF β (S) and BMP (K) receptors, or their combinations (KS and GSK). Cloning efficiency were 632 measured in non-treated cells (\emptyset) or in cells treated for 7 days with 0.2 nM R1881 followed by a culture 633 for additional 20 days in growth medium with the indicated compounds. Values are the mean \pm sd derived 634 from two independent experiments. Stars indicate the statistical significance of the difference in cloning 635 efficiency between cells treated only with R1881 and cells under other culture conditions.

636

Figure 5: Blunted induction of dormancy by androgens in cells cultured at medium cell density. A) and B) Cumulated cell population doublings of VCaP and LNCaP* cells, respectively, grown under MDhypo condition in the presence of none or R1881 as indicated. Data are derived from two independent experiments. C) and D) Differential effects of R1881 (0.2 nM) on the expression of the dormancy signature genes depending on density of cultured LNCaP* and VCaP cells, respectively. Values are the mean \pm sd derived from two independent RT-qPCR experiments with value measured under MD-hypo 643 condition being set at 1. Stars indicated statistical significance for the differences in mRNA levels between 644 cells cultured at low (LD-hypo + R1881 for 7 days) and medium (MD-hypo + R1881 for 11 days) density. 645 E) Pearson correlation coefficients between the expression profile of the dormancy signature genes 646 induced by a R1881 treatment of LNCaP* cultured at medium cell density for 11 days (MD-hypo + 0.2 647 nM R1881) and those induced by other indicated cell culture conditions. Values are derived from data 648 used in Fig. S1, 4C and 5D. F) Western Blot analysis of SMAD phosphorylation and SMAD1 and 649 CDKN1A expression in LNCaP* and VCaP cells according to the indicated culture conditions. Numbers 650 indicate the relative levels of GADPH or the relative amount of the indicated proteins normalized by 651 GAPDH levels. G) Low level of oxidation of the GRX1-roGFP2 sensor in LNCaP* cells treated by 0.2 652 nM of R1881 for 11 days at medium cell density. The lower panel indicates values the ox/red ratio of 653 GRX1-roGFP2 under the indicated cell culture conditions. Values (mean \pm sd) were derived from 3 654 independently-transduced cell populations. H) Cumulated cell population doublings of LNCaP* cells grown at medium cell density (MD-hypo) in the presence of none, R1881 at 0.2 nM, K02288 at 0.2 µM 655 656 (K), SB505124 at 0.2 µM (S) and glutathione at 8 mM (G) or their combination as indicated. Data are 657 averaged from two independent experiments.

658

659 Figure 6: Regulation of androgen-induced dormancy by CDKN1A depletion. A) Scheme of the 660 experimental design for CDKN1A depletion. Cells were cultured under LD-hypo conditions in the 661 presence of doxycycline (dox) and/or 0.2 nM R1881 for 7 days as indicated and then further cultured for 662 additional 20 days in the presence of dox after careful washing of the cells at day 7. B) Western blot analysis of CDKN1A expression in control and pTRIP-shp21 transduced LNCaP* cells cultured under 663 LD-hypo + dox for 7 days. C) Relieving of androgen-mediated inhibition of cell cloning by early depletion 664 of CDKN1A. Values are the mean \pm sd derived from two independently transduced cell populations with 665 666 control and pTRIP-shp21 lentiviral vectors. Statistical significance of the cloning efficiency difference between control and pTRIP-*shp21* transduced LNCaP* cells is indicated (black stars). 667

669 Figure 7: Induction of a dormant state related to androgen-induced dormancy through transient 670 overexpression of CDKN1A. A) Scheme of the experimental design for transient CDKN1A 671 overexpression. Transduced cell populations were cultured under LD-hypo conditions in the presence of 672 none or doxycycline (dox) to induce CDKN1A expression for 7 days and then cultured in the presence of GSH and/or inhibitors of TGF β /BMP receptors as described in Fig. 4 (LD-hypo + dox \rightarrow LD-hypo ± none 673 (Ø) or GSH or KS or GSK). RT-qPCR and Western blot analysis were performed at day 7 (LD-hypo, LD-674 675 hypo + dox) or at day 14 (LD-hypo + dox \rightarrow LD-hypo). B) Cloning efficiencies of control and pTRIP-676 p21-transduced LNCaP* cells following transient dox treatment and subsequent reversal in the presence of 677 GSH, inhibitors of TGFB/BMP receptors (KS) or combination of GSH and inhibitors of TGFB/BMP 678 receptors (GSK). Statistical significance of the difference in cloning efficiency between control and 679 pTRIP-p21 transduced cells treated only by dox (red stars) and of the effects of GSH, KS and GSK (as 680 compared to the same cells populations not treated by these compounds; black stars) are indicated. C) 681 Western blot analysis of SMAD phosphorylation or SMAD1, HMOX1 and CDKN1A expression. Cells 682 were cultured as indicated. Numbers indicate the relative levels of GADPH or the relative amount of the 683 indicated proteins normalized by GAPDH levels. Similar data were obtained with another independent 684 couple of control and pTRIP-p21 transduced cell populations. D) RT-qPCR analysis of exogenous p21 685 mRNA level transcribed from transduced pTRIP-p21 vector under the indicated cell culture conditions. 686 The couple of primers targeted the 5' part of the UbqC promoter just downstream of CDKNIA ORF in the pTRIP-p21 expression vector. Control is derived from non-transduced LNCaP* cells. Data were 687 688 normalized as in Fig. 2B. Variations between any couple of different cell culture conditions were 689 significant (p < 0.05). E) RT-qPCR analysis of the variations of expression of the dormancy signatures 690 genes induced by transient overexpression of CDKN1A. mRNA levels were normalized as in Fig. 2B). 691 Stars indicated statistical significance for the differences in mRNA levels between control cell populations 692 cultured under LD-hypo and pTRIP-p21-transduced cells cultured for 7 days under LD-hypo conditions 693 after a 7 days treatment with dox (LD-hypo + dox \rightarrow LD-hypo). F) Similarity between the profiles of 694 dormancy signature genes expression derived from cells made dormant by transient exposure to R1881 or transient overexpression of CDKN1A. Data are derived from those used in Fig. 2B and 7E. G) Reversal of dormancy induced by transient overexpression of CDKN1A through a delayed treatment with GSH (G) or inhibitors of BMP and TGF β receptors (KS). Addition of these compounds was delayed to day 14 and cells were thereafter cultured for additional 18 days for cloning efficiency measurements. Statistical significance of the cloning efficiency difference with cells treated with dox alone is indicated. All data from this figure are derived from experiments with two independently-transduced cell populations with control and pTRIP-p21 lentiviral vectors.

702

Figure 8: Proposed model for the activation of signaling pathways leading to dormancy in cancer cells. Signaling pathways required in a transitory manner for dormancy induction are displayed in yellow with dashed yellow arrows and those involved in dormancy maintenance in blue with red arrow. Hypertonicity and transient CDKN1A overexpression have been tentatively ascribed to the amplification of redox imbalance triggered by low density since both inducers do not modulate SMAD signaling in LNCaP* cells cultured at medium density. See the main text for more details.

709

Table 1: Similarity in genes expression profiles between dormant cells induced by transient exposure to R1881 and by transient CDKN1A overexpression at low cell density. Pearson's correlation coefficient between genes expression profiles induced by low cell density, androgen and CDKN1A overexpression for genes of the dormancy signature were derived from experiments displayed in Figure 2B and 7E.

715

717

LEGENDS TO SUPPLEMENTARY DATA

718

File S1: RT-qPCR analysis of the variations of mRNA levels for the dormancy signature genes according to cell culture conditions in LNCaP* (A) and VCaP cells (B). R1881 was used at a 0.2 nM concentration. See Fig. 2B and C for detailed explanation. Values (mean \pm sd) were derived from two independent experiments. Stars indicated statistical significance for the differences in mRNA levels between cells cultured under LD-hypo and LD-hypo + R1881 conditions.

724

725 File S2: Blunted induction of dormancy by androgen upon depletion of endogenous SMAD4. 726 LNCaP* cells were transduced with pRetroSuper vectors expressing a shRNA targeting SMAD4 727 (shSMAD4) or the Firefly luciferase gene (shLuc), that was used as control as previously described in Fig. 728 S4 of [2]. A) Effects of SMAD4 depletion on mRNA species levels for the dormancy signature genes in 729 LNCaP* cells cultured under dormancy-inducing conditions. Ratios of mRNA species levels were 730 measured by RT-qPCR between shSMAD4 and control-transduced cell populations cultured for 7days 731 under LD-hypo + 0.2 nM R1881 conditions. Stars indicate significance of the differences between *shLuc* 732 (control) and shSMAD4 transduced cells. B) Cloning efficiency of shLuc (control) and shSMAD4 733 transduced cell populations were measured in non-treated cells (Ø) or in cells treated for 7 days with 734 R1881 at the indicated concentrations followed by a culture for additional 20 days in growth medium 735 without R1881. Statistical significance of the differences between cloning efficiency of shSMAD4 and 736 shLuc cells are indicated. Values (mean \pm sd) are derived from 2 experiments made with two 737 independently transduced cell populations for control and for *shSMAD4* expressing retroviral vectors.

738

File S3: Correlation between the levels of oxidation of the GRX1-roGFP2 sensor and HMOX1 expression in LNCaP* cells transduced with pFbneo-GRX1-roGFP2 retroviral vector. Western Blot analysis under non-reducing conditions was performed to simultaneously measure the levels of oxidation of the GRX1-roGFP2 sensor and expression of HMOX1 and GAPDH. Numbers indicate the relative
levels of GADPH, HMOX1 normalized by GAPDH levels and the ox/red ratio of GRX1-roGFP2 under
the indicated cell culture conditions. Legends are the same as in Fig. 4B and 5G.

745

746 File S4: Variations in the levels of expression of the dormancy signature genes induced by GSH in 747 cells cultured at low cell density in the presence of R1881 are inversely related to those induced by H_2O_2 748 in cells cultured at medium cell density. In the upper part of the table are given the ratio of mRNA levels 749 for the dormancy signature genes between the indicated cells culture conditions (cell lysis at day 3 for 750 MD-hypo + H_2O_2 and MD-hypo conditions or at day 7 for LD-hypo + 0.2 nM R1881 and LD-hypo + 0.2 751 nM R1881 + 8 mM GSH conditions). In the bottom lane, we calculated Pearson's correlation coefficient 752 between the effects of H₂O₂ at medium cell density (matrix of the ratios of mRNA levels between MDhypo + H₂O₂ and MD-hypo conditions) and the inverse of the effects of GSH on cells treated with R1881 753 754 at low cell density (matrix of the ratios of mRNA levels between LD-hypo + R1881 and LD-hypo + 755 R1881 + GSH conditions). Data are derived from experiments displayed in Figure 4C and D and [2]. MD-756 hypo + H_2O_2 refers to the treatment of LNCaP* cells cultured at medium density for 3 days with H_2O_2 757 $(100 \ \mu M)$ added 1 day after cell passage [2].

758

File S5: Inefficiency of DHT or transient CDKN1A overexpression to trigger a self-sustained growth-arrest at medium cell density. A) Cumulated cell population doublings of LNCaP* cells grown under MD-hypo conditions in the presence of none or 0.5 nM DHT for the first 12 days of the experiment. B) Cumulated cell population doublings of LNCaP* cell populations transduced with the doxycycline (dox)-inducible pTRIP-control or pTRIP-21 vectors and grown at MD-hypo in the presence of doxycycline for the first 7 days of the experiment. Each point is averaged from two experiments with independent cell populations. Error bars are too small to be viewed.

766







Figure 3





0

0

4

8

time of culture (days)

12

16

0.8

0.8

n. d.

1.0

n. d.

1

1

1

GAPDH

-R1881


Figure 6



Figure 7



Figure 8

| correlation coefficient (n=22 genes) | LNCaP* LD-hypo (day 7 th) | LNCaP* LD-hypo + R1881 (day 7 th) | LNCaP* LD-hypo + R1881 → LD-hypo (day 14 th) | LNCaP*-pTRIP-p21 LD-hypo + dox (day 7 th) | LNCaP*-pTRIP-p21 LD-hypo + dox → LD-hypo) (day 14 th) |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| LNCaP * LD-hypo | 1.00 | 0.12 (p=0.59) | 0.36 (p=0.10) | 0.26 (p=0.24) | 0.37 (p=0.09) |
| LNCaP* LD-hypo + R1881 | | 1,00 | 0.82 (p<0.0001) | 0.27 (p=0.22) | 0.82 (p<0.0001) |
| LNCaP* LD-hypo + R1881 → LD-hypo | | | 1.00 | 0.30 (p=0.17) | 0.81 (p<0.0001) |
| LNCaP*-pTRIP-p21 LD-hypo + dox | | | | 1.00 | 0.31 (p=0.16) |
| LNCaP*-pTRIP-p21 LD-hypo + dox → LD-hypo | | | | | 1.00 |

Table 1

SUPPLEMENTAL





Supplemental S1



В



Supplemental S2

А



Supplemental S3

| | LNC | VCaP | |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| genes | MD-hypo + H ₂ O ₂ / MD-hypo | LD-hypo + R1881 / LD-hypo + R1881 + GSH | LD-hypo + R1881 / LD-hypo + R1881 + GSH |
| GADPH | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| CDKN1A | 23.09 | 6.86 | 12.60 |
| CCNA2 | 0.22 | 0.48 | 0.14 |
| PIG3 | 8.31 | 2.50 | 3.77 |
| GADD45A | 10.80 | 2.04 | 6.17 |
| HMOX1 | 31.62 | 12.72 | 94.02 |
| AKR1C1 | 71.54 | 32.41 | 587.56 |
| NQO1 | 3.86 | 9.14 | 28.07 |
| KLF4 | 3.99 | 1.58 | 21.13 |
| KLF6 | 2.97 | 1.47 | 6.26 |
| KRT19 | 0.51 | 1.57 | 17.08 |
| KLK3 | 1.11 | 2.54 | 16.10 |
| AR | 1.15 | 0.86 | 1.53 |
| CDH1 | 1.74 | 1.32 | 4.09 |
| GDF11 | 0.93 | 1.44 | 0.76 |
| BMP1 | 1.70 | 1.37 | 3.02 |
| BMP4 | 1.76 | 1.63 | 8.20 |
| SMAD6 | 0.60 | 2.46 | 19.12 |
| SMAD7 | 2.40 | 5.28 | 19.68 |
| ID1 | 2.92 | 4.81 | 21.72 |
| HES1 | 1.34 | 4.85 | 14.81 |
| OCT4A | 4.39 | 1.31 | 5.48 |
| Correlation with | | | |
| LNCaP* : MD-hypo + H ₂ O ₂ / MD-hypo | 1.00 | 0.94 (p<0.0001) | 0.92 (p<0.0001) |

Supplemental S4



Supplemental S5

3. DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons généralisé les observations de T.Tchénio d'un phénomène de dormance inductible par l'hypertonicité dans des cellules de cancer de la prostate cultivées à basse densité cellulaire. Nous avons en effet montré que des phénomènes de dormance très semblables sont aussi inductibles par des androgènes ou une surexpression ectopique de CDKN1A. En effet, nous avons observé que ces trois phénomènes de dormance reposent de manière similaire sur une activation des voies de signalisation activées par les facteurs de la famille du TGF-β/BMP et par un déséquilibre redox de la cellule.

3.1. Synthèse des mécanismes de mise en place du phénomène de dormance

3.1.1. Distinction d'une phase d'induction et d'une phase de maintenance de l'état dormant

On peut distinguer au cours de la mise en place du phénomène de dormance, une phase d'induction reposant sur des signaux qui sont spécifiques au mode d'induction de la dormance et qui ne semblent requis que de manière transitoire et une phase de maintenance auto-entretenue au niveau de la cellule unique qui dépend de l'activation des voies de signalisations activées par les facteurs de la famille du TGF-β/BMP et par un déséquilibre redox. Plusieurs observations vont dans ce sens. Tout d'abord, les agents déclencheurs de dormance que nous avons identifiés (l'hypertonicité, les androgènes et une surexpression transitoire de CDKN1A à partir d'un vecteur d'expression inductible) agissent par un mécanisme de « Hit and Run » : en effet, une culture pendant seulement sept jours en présence de ces agents inducteurs suffit à induire un état dormant qui se maintient après la remise en culture sans agent inducteur. Par ailleurs, dans le cas des androgènes, nous avons montré que les antagonistes de AR ne sont efficaces pour inhiber l'action inductrice de dormance des androgènes que s'ils sont ajoutés en même temps que les androgènes (Fig. 1A-C - article 2). Si ces antagonistes sont ajoutés seulement après un traitement de sept jours par les androgènes, ils ne présentent plus aucune action inhibitrice significative (Fig. 3 - article 2). Cela suggère que l'activation de AR par les androgènes est requise mais de manière seulement transitoire pour l'induction de la dormance par les androgènes. Par ailleurs, il est probable que les différents agents déclencheurs ciblent des voies de signalisation différentes pour l'induction de la dormance. Cela est conforté par au moins deux observations. Nous avons en effet montré dans des expériences non publiées que les antagonistes

de AR qui permettent d'inhiber l'induction de la dormance par les androgènes, sont inefficaces pour inhiber la dormance induite par exposition transitoire à des conditions hypertoniques. Par ailleurs, les cinétiques d'induction du phénomène de dormance par les androgènes et par CDKN1A semblent assez différentes, le marqueur de stress oxydatif HMOX1 étant induit avant l'augmentation du niveau de phosphorylation des facteurs SMAD dans le cas de CDKN1A mais non des androgènes (voir section suivante).

3.1.2. Convergence des mécanismes d'induction vers un même état final de dormance impliquant les voies de signalisation activées par les facteurs de la famille du TGF-β/BMP et un déséquilibre redox de la cellule

Les observations ci-dessus suggèrent donc que les mécanismes de déclenchement de dormance peuvent être très divers. Une observation remarquable est qu'ils conduisent finalement vers des états dormants très similaires.

Cela nous a d'abord été suggéré par l'analyse du profil d'expression de la vingtaine de gènes que nous avons sélectionné au début de notre travail pour définir une signature de dormance. Ces gènes ont été sélectionnés parmi une centaine recouvrant les principales voies de signalisations connues du fait de la modulation de leur expression dans les cellules rendues dormantes par un traitement hypertonique. Le profil d'expression de ces gènes permet de distinguer les cellules dormantes de cellules rendues quiescentes par inhibition de contact. Or un profil d'expression très semblable est obtenu après l'induction d'un état dormant par l'hypertonicité, les androgènes ou par surexpression transitoire de CDKN1A, suggérant la parenté de ces états dormants. Au cours de notre travail sur la dormance induite par l'hypertonicité, nous avons montré que le profil d'expression des cellules dormantes pouvait être reconstitué en stimulant les voies de signalisation activées par les facteurs de la famille du TGFβ/BMP et par un déséquilibre redox de la cellule et que ces deux voies étaient aussi fonctionnellement impliquées dans la dormance induite par l'hypertonicité. Nous avons donc testé l'implication de ces voies dans les phénomènes de dormances induits par les androgènes et par CDKN1A et avons pu montrer qu'elles étaient nécessaires à la maintenance de ces phénomènes de dormance.

Un trait remarquable est que ces deux voies de signalisation sont fortement interconnectées de manière apparemment similaire dans chacun des phénomènes de dormance. En effet, un traitement par un agent antioxydant (le glutathion) réprime fortement l'induction des gènes

régulés par la voie TGF-β/BMP telles que BMP4, SMAD6, SMAD7, ID1 (Fig. 3E, 5B – article 1; Fig. 4C-D – article 2) en plus de l'expression des marqueurs de stress et inversement, l'inhibition de la voie TGF-\u00b3/BMP causée par la répression de SMAD4 ou la surexpression de SMAD7 conduit à une diminution du niveau d'expression des marqueurs de stress tels que CDKN1A, HMOX1, AKR1C1, NQO1 en plus des marqueurs d'activation des voies SMAD (Fig. 2B, 5A, S4 – article 1; S2A – article 2). Cette interconnexion entre ces deux voies de signalisations pourrait expliquer pourquoi des mécanismes d'induction différents convergent vers un même état de dormance. Ainsi, dans le cas de la dormance induite par CDKN1A, la surexpression transitoire d'un ADNc de ce gène semble augmenter tout d'abord l'expression de CDKN1A endogène et du marqueur de stress HMOX1, avant l'activation de la voie TGF-β/BMP mesurée par le niveau de phosphorylation des facteurs SMAD1/5 (Fig. 7C - article 2). Dans ce cas, l'activation de la voie TGF-\u00b3/BMP semble être la conséquence de la surexpression de CDKN1A et/ou du stress oxydatif que cette surexpression semble induire. Par contre, lors de la dormance induite par les androgènes, la cinétique d'activation de la voie TGF-B/BMP semble plus rapide (Fig. 4A – article 2). Elle pourrait en fait être concomitante ou antérieure à l'induction des marqueurs de stress oxydatifs, car à moyenne densité, les androgènes semblent principalement moduler la voie de signalisation du TGF-B/BMP (voir section 3.1.3). Quoiqu'il en soit, ces différences suggèrent que ces deux voies de signalisation sont bien interconnectées et que cette interconnexion joue un rôle important dans la convergence vers un état dormant bien défini. Il est à noter qu'une telle interconnexion semble être de portée très générale non limitée aux seuls phénomènes de dormance (voir par exemple (Dyer et al., 2014; Hubackova et al., 2012; Hubackova et al., 2016; Kim et al., 2006; Kretova et al., 2014; Li et al., 2009; Zhu et al., 2009) et section 3.3).

3.1.3. Rôle de la densité cellulaire dans l'établissement de la dormance

Dans notre modèle en culture cellulaire, la faible densité cellulaire joue un rôle crucial. En effet, l'hypertonicité, les androgènes ou la surexpression de CDKN1A ne semblent pas pouvoir induire un état dormant complet à moyenne densité cellulaire. On a observé qu'à moyenne densité cellulaire, l'hypertonicité ne semble avoir aucun effet sur la prolifération des cellules de cancer de la prostate, de même que les androgènes sur les cellules VCaP. Cela corrèle avec une absence d'effet sur l'expression des marqueurs d'activation de la voie TGF- β /BMP et du stress

oxydatif (Fig. 5C - article 2). Comme attendu, la surexpression de CDKN1A à moyenne densité cellulaire induit un blocage de la prolifération cellulaire, mais les cellules recommencent à proliférer immédiatement après le retour de CDKN1A à son niveau basal (Fig. S5 - article 2). La surexpression de CDKN1A à moyenne densité cellulaire n'a aussi pas d'effets sur l'expression des marqueurs d'activation des voies TGF-β/BMP et du stress oxydatif (données non publiées). Toutefois, un résultat différent est observé dans le cas des cellules LNCaP* traitées avec des androgènes. En effet, une inhibition de la prolifération est induite par les androgènes lorsque les cellules LNCaP* sont cultivées à moyenne densité cellulaire. Mais cette inhibition est instable car les cellules se remettent à proliférer 3-4 jours après la remise en milieu de culture sans androgène ajouté (Fig. 5B – article 2). Ce phénotype instable corrèle avec une induction marquée des marqueurs d'activation de la voie TGF-\u00b3/BMP mais non de celle des marqueurs de stress oxydatif (Fig. 5D, F - article 2). Par ailleurs, nos mesures de l'état d'oxydation des thiols cellulaires avec une sonde redox (GRX1-roGFP2) ne montrent qu'une faible augmentation (non significative avec le nombre limité d'expériences accomplies) de l'oxydation des thiols cellulaires, contrairement à ce qui est observable sous des conditions inductrices de dormance (Fig. 5G, S3 – article 2). En fait, l'inhibition des cellules LNCaP* à moyenne densité par les androgènes implique vraisemblablement une formation de ROS car on observe une levée partielle de cette inhibition par des antioxydants (Fig. 5H - article 2). Mais cette formation de ROS à moyenne densité cellulaire est insuffisante à induire l'expression des marqueurs de stress oxydatifs tels que HMOX1 ou CDKN1A au niveau protéique (Fig 5F, S3 – article 2). Il semble donc qu'il est nécessaire que le stress oxydatif dépasse un certain niveau seuil pour coopérer avec la voie TGF-β/BMP et stabiliser l'état dormant. Par ailleurs, la culture à moyenne densité cellulaire semble augmenter le potentiel antioxydant des cellules. Cette conclusion est en accord avec nos observations que la seule culture à faible densité cellulaire est suffisante à augmenter très significativement le niveau d'expression des marqueurs de stress (Fig. 1E, S2C – article 1; Fig. 2B-C, 7E – article 2) et tend aussi à diminuer les capacités anti-oxydantes de la cellule comme le suggère la diminution (non significative vraisemblablement du fait d'un nombre limité d'expériences) du potentiel redox des thiols cellulaires déduite de nos mesures avec la sonde GRX1-roGFP2 (Fig. 4B, S3 – article 2).

Un rôle clé est aussi joué par la faible densité cellulaire dans le modèle de dormance de cellules de cancer du sein obtenu par culture en 3 dimension sur matrigel (Shibue and Weinberg,

2009), ce qui suggère qu'il s'agit là d'une observation de portée générale. La question qui se pose est la manière dont ces résultats peuvent se transposer *in vivo*. Il semble que l'effet principal de la culture à faible densité cellulaire soit d'inhiber la formation d'interactions intercellulaires homotypiques, en empêchant un contact intercellulaire direct ou en produisant une dilution des facteurs autocrines produits par les cellules cancéreuses. Or, si les interactions homotypiques semblent inhiber l'entrée en dormance, des interactions hétérotopiques avec des cellules normales pourraient favoriser l'entrée en dormance des cellules cancéreuses comme le suggère un modèle de dormance de cellules de cancer de la prostate en co-culture avec différents types de cellules non-cancéreuses (Marlow et al., 2013). In vivo, différents modèles expérimentaux ont montré que la plupart des cellules cancéreuses disséminées dans le parenchyme d'organes distants survivent sous forme de cellules cancéreuses solitaires dormantes (Cameron et al., 2000; Goodison et al., 2003; Heyn et al., 2006; Logan et al., 2008; Luzzi et al., 1998; Naumov et al., 2001; Naumov et al., 2002; Suzuki et al., 2006). Ces observations sont donc compatibles avec l'hypothèse que seules les interactions intercellulaires homotypiques déstabilisent le phénomène de dormance et suggère que les seuls types de cellules cancéreuses dormantes existantes *in vivo* sont des cellules cancéreuses isolées les unes des autres. En accord avec celle-ci, il a été observé que le taux de formation de métastases est davantage corrélé avec le nombre de cellules cancéreuses circulantes (CTCs) dans la circulation sanguine qui sont regroupées en amas de plus de 4 cellules cancéreuses qu'avec le nombre total de CTCs (Liotta et al., 1974).

3.2. Possibles implications du stress oxydatif dans les phénomènes de dormance *in vivo* des cellules cancéreuses

Un résultat original de notre travail est donc la mise en évidence directe d'une régulation de la dormance *in vitro* des cellules cancéreuses par le stress oxydatif. Rétrospectivement, plusieurs observations suggèrent une régulation de la dormance *in vivo* des cellules cancéreuses par le stress oxydatif.

3.2.1. Implication de la voie de signalisation p38 MAPK

Les voies de signalisations dépendantes des kinases p38 (Stress Activated Protein Kinases SAPK2a, 2b, 3, 4) sont activées en réponse à de multiples stress cellulaires ou par certaines cytokines telles que le TGF β ou le TNF α (Cuadrado and Nebreda, 2010). L'équipe de Aguirre-Ghiso a montré un rôle déterminant de la voie p38 dans la dormance des cellules HEp3 de cancer

de la tête et du cou (Adam et al., 2009; Aguirre-Ghiso et al., 2003; Aguirre-Ghiso et al., 2001; Aguirre-Ghiso et al., 2004; Bragado et al., 2013; Ranganathan et al., 2006; Schewe and Aguirre-Ghiso, 2008). De manière intéressante, l'analyse transcriptomique de cellules cancéreuses disséminées (DTCs) isolées des patients atteints de cancer de la prostate suggère aussi l'implication à la fois de la voie TGF- β /BMP et de la voie p38 dans le phénomène de dormance (Chery et al., 2014). Une interaction entre ces deux voies de signalisation a été aussi démontrée dans la régulation de la dormance de différents types de cellules cancéreuses, incluant les cellules de cancer de la prostate (Bragado et al., 2013; Kobayashi et al., 2011). La question qui se pose en regard de nos résultats est de savoir si l'activation de la voie p38 est une réponse des cellules cancéreuses à un stress oxydatif.

3.2.2. Sites préférentiels de formation de métastases

Un modèle populaire pour rendre compte du développement préférentiel des métastases dans certains organes est l'hypothèse de « la graine et du sol » : les cellules cancéreuses disséminées ne développent des métastases que lorsque les sites de dispersion constituent des microenvironnements favorables à leur prolifération. Par contre, les facteurs qui déterminent la nature favorable ou défavorable du microenvironnement sont encore l'objet de nombreuses hypothèses. Nous suggérons ici que le caractère pro-oxydant ou réducteur du microenvironnement pourrait être important.

En effet, dans le cas du cancer de la prostate, les métastases sont les plus fréquemment observées au niveau des os (Bubendorf et al., 2000). Il a été trouvé que les cellules de cancer de la prostate rivalisent avec les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) pour occuper leur niche endostéale lors de la dissémination dans la moelle osseuse (Shiozawa et al., 2011). Il semble que cette niche se situe dans une région hypoxique, correspondant à des conditions réductrices, qui contribue d'ailleurs à maintenir la quiescence des HSCs ((Levesque et al., 2010) et voir section 1.1.2.2.2). Nos résultats suggèrent que ce microenvironnement hypoxique pourrait donc favoriser la croissance des cellules de cancer de la prostate disséminées en limitant l'induction d'un phénomène de dormance cellulaire. Inversement, il est observé que la fréquence relative de développement de métastases dans le poumon est plus faible que celle dans l'os (Bubendorf et al., 2000), en accord avec le caractère fortement pro-oxydant du parenchyme pulmonaire en lien avec les fortes concentrations d'oxygène qu'il contient.

Dans un modèle murin de développement de métastases à partir de xénogreffe de cellules de cancer du sein, il a été montré que Coco - un antagoniste de la voie de BMP - inhibe la dormance des cellules cancéreuses dans le poumon mais n'a pas d'influence sur le taux relativement élevé de développement des métastases dans d'autres organes tels que le cerveau ou l'os (Gao et al., 2012). Les auteurs ont suggéré qu'il y a avait peu de BMP fonctionnellement actif dans ces derniers organes sur la base du niveau de phosphorylation des facteurs SMAD dans les cellules cancéreuses. Nos résultats suggèrent une explication alternative. Dans le poumon, les conditions pro-oxydantes coopèrent avec les voies de signalisation des BMPs pour se renforcer mutuellement (voir section 3.1.2) et induire une dormance modulable par un inhibiteur des voies BMP. Par contre, dans les organes avec un taux réduit en oxygène, l'absence de stress oxydatif ne permet pas une amplification réciproque des voies de signalisation BMP et de réponse au stress oxydatif et conséquemment l'induction d'un état dormant.

3.2.3 Conditions inductrices de dormance pour les Cellules Tumorales Circulantes

Les CTCs sont les cellules tumorales qui sont retrouvées dans les voies sanguines sous forme de cellules isolées ou de petits amas cellulaires. Nos résultats pourraient expliquer pourquoi la majorité des CTCs sont détectées dans un état quiescent (Muller et al., 2005). En effet, ces cellules sont donc souvent sous forme des cellules solitaires et elles sont dans un environnement pro-oxydant du fait des concentrations relativement élevées en oxygène dans la circulation sanguine, ce qui suggère qu'elles sont des conditions inductrices de dormance. Par ailleurs, une fois que la dormance est établie, elle est très stable. Cette stabilité pourrait expliquer pourquoi les cellules restent en quiescence après son extravasation dans l'organe distant. Toutefois, il semble que le temps de passage moyen des CTCs dans la circulation sanguine soit assez bref (de l'ordre de quelques heures (Labelle and Hynes, 2012)) et qu'une fraction des CTCs soient présente sous forme d'amas de cellules cancéreuses potentiellement plus résistantes à l'entrée en dormance lors de leur passage dans la circulation sanguine doit donc être étudiée.

3.3. Relation entre le phénomène de dormance et le phénomène de sénescence prématurée

Les mécanismes régulant la dormance que nous avons identifiés dans notre modèle présentent des similarités remarquables avec le phénomène de sénescence réplicative prématurée. La sénescence réplicative peut se définir comme un état de blocage irréversible des divisions cellulaires en phase G0/G1 du cycle cellulaire qui est inductible en culture cellulaire par épuisement du potentiel prolifératif des cellules après une culture prolongée ou de manière prématurée par applications d'une grande variété de stress cellulaires (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Comme la dormance dans notre modèle cellulaire, la sénescence prématurée est inductible selon un mécanisme de « Hit and Run », le stress inducteur de sénescence n'est pas nécessaire au maintien de l'état sénescent une fois celui-ci induit. La stabilité du phénotype sénescent repose en partie sur la mise en place d'une boucle de régulation auto-stimulée impliquant CDKN1A et un stress oxydatif lié à une surproduction permanente de ROS (Borodkina et al., 2014; Macip et al., 2002; Passos et al., 2010). De plus, il a été montré une interaction entre la voie TGF- β /BMP et le stress oxydatif dans la régulation de la sénescence prématurée (Hubackova et al., 2012; Kretova et al., 2014; Zhu et al., 2009). Toutefois, il faut remarquer que dans notre modèle les cellules dormantes ne présentent pas une augmentation significative du niveau de transcription de CDKN2A (codant pour p16^{INK4A}) ou du niveau d'expression de la SA-ß galactosidase ni une morphologie élargie (données non publiées), qui sont caractéristiques du phénotype sénescent (Rodier and Campisi, 2011). Cela suggère que les états de sénescence et de dormance sont bien distincts.

Étant donné que ces deux phénomènes apparaissent comme des réponses autonomes de la cellule face à un stress, une question qui se pose est la nature des facteurs déterminant l'entrée en dormance ou en sénescence. Une question liée est de savoir si certains facteurs exprimés spécifiquement lors de la dormance déterminent le caractère réversible de cette dernière. De fait, nous avons observé que les cellules dormantes sur-expriment HES1 et ID1, des gènes qui ont été impliqués dans le caractère réversible de la quiescence, leur inhibition pouvant conduire à une sénescence ou à une différenciation prématurée (Alani et al., 2001; Di et al., 2006; Ohtani et al., 2001; Sang and Coller, 2009; Sang et al., 2008). Il faudrait donc analyser si ces gènes ou d'autres sont impliqués dans le caractère réversible de l'état dormant. A terme, un enjeu est de déterminer s'il est possible de convertir directement des cellules dormantes en cellules cancéreuses.

3.4. Développements possibles de ce travail

3.4.1. Approfondissement de l'analyse des mécanismes régulant la dormance cellulaire

Notre discussion sur les mécanismes de dormance nous suggère trois voies possibles pour approfondir notre analyse des mécanismes régulant la dormance cellulaire.

3.4.1.1. Analyse du rôle de la voie p38 dans la dormance

Dans notre étude, nous avons mis en évidence deux voies de signalisation fortement interconnectées qui régulent la dormance de ces cellules de cancer de la prostate : la voie TGF- β /BMP et le déséquilibre rédox. Pour le moment, nous n'avons identifié que CDKN1A comme médiateur du déséquilibre rédox mais l'effet relativement faible de son inhibition sur la réversion de la dormance (Fig. 6C – article 2) suggère qu'il pourrait exister d'autres voies de signalisations transduisant les effets du stress oxydatif. L'implication de la voie p38 dans d'autres modèles de dormance (voir la section 3.2.1) et dans la médiation de certains effets du stress oxydatif nous conduisent naturellement à nous demander si cette voie de signalisation est impliquée dans le phénomène de dormance que nous avons étudié. Notons aussi que la voie p38 régule la voie TGF- β /BMP notamment via la phosphorylation des protéines SMAD (Seong et al., 2010) et que réciproquement la voie p38 peut être activée par les voies TGF- β /BMP (Herpin and Cunningham, 2007; Kaminska et al., 2005; Nohe et al., 2004) si bien que la voie p38 pourrait constituer une bonne candidate pour expliquer la forte interconnexion que nous avons observée entre les voies de réponses au stress oxydatif et TGF- β /BMP.

3.4.1.2. Induction d'un phénomène de dormance à moyenne densité cellulaire

Nous avons par observé que les androgènes peuvent induire un état quiescent à moyenne densité dans les cellules LNCaP* qui est assez proche de l'état dormant mis à part un déséquilibre redox insuffisant pour induire les marqueurs de stress oxydatifs tels que HMOX1 et CDKN1A, ce dernier gène jouant vraisemblablement un rôle dans le phénomène d'induction. Nous suggérons qu'un traitement par des androgènes couplé à un agent pro-oxydant capable de causer un stress oxydatif à moyenne densité cellulaire pourrait induire un phénomène de dormance à moyenne densité. A l'appui de cette hypothèse, nous avons déjà observé que le traitement simultané de cellules LNCaP* par du BMP4 et du peroxyde d'hydrogène permet de reconstituer un profil d'expression de cellules dormantes dans des cellules cultivées à moyenne densité (Fig. 4B – article 1). Mais aux concentrations utilisées, le peroxyde d'hydrogène était très cytotoxique, ce qui a empêché de mener des analyses plus poussées. Il s'agirait donc tout d'abord d'identifier parmi de nombreux candidats possibles les drogues pro-oxydantes les plus performantes à des concentrations admissibles au point de vue thérapeutique. Les agents candidats ayant déjà démontré une action pro-oxydante *in vivo* incluent la sélénite, des dérivés quinoniques apparentés à la vitamine K et des dérivés arséniés (Drake, 2006; Wondrak, 2009). Puis, nous pourrions tester les synergies de ces agents avec les androgènes pour induire une dormance stable à moyenne densité cellulaire.

3.4.1.3. Analyse des relations entre dormance et sénescence

Une autre question qui nous intéresse est la relation entre la dormance et la sénescence. Nous avons planifié de tout d'abord, caractériser différents agents capables d'induire un phénomène de sénescence prématurée dans les cellules de cancer de la prostate et de comparer l'expression génétique dans des cellules sénescentes et dormantes pour essayer de détecter des différences entre les voies de signalisation activées dans ces deux états. Nous voudrions aussi caractériser des facteurs qui pourraient convertir un état dormant en un état sénescent et *vice versa*. Nous voudrions ainsi étudier l'effet de l'activation de CDKN2A (p16^{INK4A}), qui joue un rôle important dans la plupart des phénomènes de sénescence cellulaire pour analyser si sa surexpression transitoire pourrait convertir le phénomène de dormance en sénescence. Inversement, nous voudrions déterminer si des gènes induits lors de la dormance et par ailleurs connus pour inhiber des phénomènes de différenciation ou de sénescence prématurée, tels que HES1, ID1 (Alani et al., 2001; Di et al., 2006; Ohtani et al., 2001; Sang and Coller, 2009; Sang et al., 2008) ont un rôle inhibiteur sur la sénescence réplicative : il s'agirait alors de tester l'effet de leur surexpression dans des conditions inductrices de sénescence et de leur inhibition sous des conditions inductrices de dormance.

3.4.2. Test de la dormance des cellules cancéreuses circulantes

Nos résultats suggèrent que les cellules cancéreuses circulantes pourraient entrer dans un état dormant avant même leur extravasation dans l'organe distant (voir section 3.2.3.). Nous voudrions tester cette hypothèse dans un modèle de greffe orthotopique des cellules de cancer de la prostate humaines chez la souris. Nous voudrions purifier les CTCs pour les mettre en culture et analyser si un traitement par du glutathion ou par des inhibiteurs de la voie TGF- β /BMP sont

capables de stimuler leur prolifération. Dans l'affirmative, nous voudrions caractériser plus en détail l'état dans lequel se trouvent les CTCs pour le comparer au phénomène de dormance que nous avons caractérisé en culture cellulaire.

3.4.3. Test de la capacité des androgènes à induire une dormance *in vivo* sur des cellules cancéreuses disséminées

Dans notre modèle, un traitement transitoire par des androgènes à des concentrations physiologiques a permis d'induire un phénomène de dormance cellulaire dans les cellules de cancer de prostate AR-positives (LNCaP* et VCaP) cultivées à faible densité cellulaire. Cet effet est médié par le récepteur aux androgènes (AR) qui est nécessaire pour la phase de déclenchement de la dormance mais dispensable lorsque la dormance est établie (Fig. 1 A-C, 3 – article 2). Il est important de noter que toutes nos expériences ont été conduites dans un milieu de culture contenant des niveaux de testostérone équivalents à ceux retrouvés *in vivo* dans des conditions de castration (Sedelaar and Isaacs, 2009), ce qui a vraisemblablement conduit à augmenter la sensibilité de AR (voir section 1.3.3.) et pourrait expliquer pourquoi dans ce modèle, des doses physiologiques d'androgènes sont actives.

Différentes observations *in vivo* suggèrent fortement que les cellules cancéreuses solitaires disséminées dans le parenchyme d'organes distants au cours du processus métastasique se trouvent dans des conditions inductrices de dormance, la plupart d'entre elles étant déjà en fait dormantes et le développement de métastases ne résultant que de la prolifération d'une petite fraction de cette population cellulaire ((Cameron et al., 2000; Goodison et al., 2003; Heyn et al., 2006; Logan et al., 2008; Luzzi et al., 1998; Naumov et al., 2001; Naumov et al., 2002; Suzuki et al., 2006) et voir la section 3.1.3.). Il est donc possible qu'un traitement par des androgènes puisse renforcer l'induction d'un état dormant dans cette population cellulaire disséminée, ce qui devrait diminuer le taux de formation de métastases. Nous voudrions tester cette hypothèse dans un modèle murin de dissémination métastasique simplifié obtenu par injection intracardiaque de cellules cancéreuses humaines marquées avec un gène luciférase et suivi du développement des métastases par imagerie de bioluminescence. Nous projetons d'utiliser nos lignées ou d'autres lignées résistantes à la castration et qui présentent une sensibilité augmentée de la voie de signalisation AR. Les cellules marquées seront injectées à des souris contrôles ou préalablement implantées avec un patch intradermique de testostérone quelques jours avant de l'injection. On

s'attend à ce que les souris avec un patch de testostérone développent beaucoup moins de métastases que les souris contrôles.

La validation de ces hypothèses pourrait permettre de proposer des traitements transitoires par des androgènes chez les patients de cancer de la prostate traités par prostatectomie totale pour diminuer le taux de récurrence métastasique. Idéalement le traitement devrait être démarré avant l'apparition des symptômes de rechute car nos résultats suggèrent que les androgènes sont peu efficaces sur les groupes de cellules tumorales (voir section 3.1.3.). Cette thérapie pourrait être conduite en alternance avec les traitements anti-androgènes qui augmentent la sensibilité de AR aux androgènes mais ne semblent pas pouvoir déstabiliser l'état dormant une fois celui-ci établi. Il est à noter que l'utilisation d'androgènes a aussi été proposée par d'autres équipes pour le traitement des métastases du cancer de la prostate (Chuu et al., 2011a; Denmeade and Isaacs, 2010; Schweizer et al., 2015). Dans ces études, il a été trouvé que les androgènes exercent un effet cytostatique ou cytotoxique sur les cellules cancéreuses surexprimant AR *in vitro* et présente un effet suppresseur de tumeur *in vivo* (voir section 1.3.4). Nos propositions rentrent donc dans la cadre d'une série de travaux suggérant qu'un traitement par des androgènes pourrait améliorer substantiellement le pronostic du cancer de la prostate.

BIBLIOGRAPHIES

Adam, A.P., George, A., Schewe, D., Bragado, P., Iglesias, B.V., Ranganathan, A.C., Kourtidis, A., Conklin, D.S., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2009). Computational identification of a p38SAPK-regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence. Cancer research *69*, 5664-5672.

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. Nature reviews Cancer 7, 834-846.

Aguirre-Ghiso, J.A., Bragado, P., and Sosa, M.S. (2013). Metastasis awakening: targeting dormant cancer. Nature medicine 19, 276-277.

Aguirre-Ghiso, J.A., Estrada, Y., Liu, D., and Ossowski, L. (2003). ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). Cancer research *63*, 1684-1695.

Aguirre-Ghiso, J.A., Liu, D., Mignatti, A., Kovalski, K., and Ossowski, L. (2001). Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. Molecular biology of the cell *12*, 863-879.

Aguirre-Ghiso, J.A., Ossowski, L., and Rosenbaum, S.K. (2004). Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth. Cancer research *64*, 7336-7345.

Aguirre Ghiso, J.A. (2002). Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. Oncogene 21, 2513-2524.

Aguirre Ghiso, J.A., Kovalski, K., and Ossowski, L. (1999). Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. The Journal of cell biology *147*, 89-104.

Alani, R.M., Young, A.Z., and Shifflett, C.B. (2001). Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 7812-7816.

Almog, N. (2010). Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. Cancer letters 294, 139-146.

Almog, N., Henke, V., Flores, L., Hlatky, L., Kung, A.L., Wright, R.D., Berger, R., Hutchinson, L., Naumov, G.N., Bender, E., *et al.* (2006). Prolonged dormancy of human liposarcoma is associated with impaired tumor angiogenesis. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *20*, 947-949.

Almog, N., Ma, L., Raychowdhury, R., Schwager, C., Erber, R., Short, S., Hlatky, L., Vajkoczy, P., Huber, P.E., Folkman, J., *et al.* (2009). Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. Cancer research *69*, 836-844.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell *118*, 149-161.

Bandyopadhyay, S., Pai, S.K., Gross, S.C., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Saito, K., Commes, T., Hayashi, S., Watabe, M., *et al.* (2003). The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. Cancer research *63*, 1731-1736.

Banys, M., Solomayer, E.F., Gebauer, G., Janni, W., Krawczyk, N., Lueck, H.J., Becker, S., Huober, J., Kraemer, B., Wackwitz, B., *et al.* (2013). Influence of zoledronic acid on disseminated tumor cells in bone marrow and survival: results of a prospective clinical trial. BMC cancer *13*, 480.

Barkan, D., El Touny, L.H., Michalowski, A.M., Smith, J.A., Chu, I., Davis, A.S., Webster, J.D., Hoover, S., Simpson, R.M., Gauldie, J., *et al.* (2010). Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. Cancer research *70*, 5706-5716.

Barkan, D., and Green, J.E. (2011). An in vitro system to study tumor dormancy and the switch to metastatic growth. Journal of visualized experiments : JoVE.

Barkan, D., Kleinman, H., Simmons, J.L., Asmussen, H., Kamaraju, A.K., Hoenorhoff, M.J., Liu, Z.Y., Costes, S.V., Cho, E.H., Lockett, S., *et al.* (2008). Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. Cancer research *68*, 6241-6250.

Barrios, J., and Wieder, R. (2009). Dual FGF-2 and intergrin alpha5beta1 signaling mediate GRAFinduced RhoA inactivation in a model of breast cancer dormancy. Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society *2*, 33-47.

Basu, S., and Tindall, D.J. (2010). Androgen action in prostate cancer. Hormones & cancer 1, 223-228.

Bayko, L., Rak, J., Man, S., Bicknell, R., Ferrara, N., and Kerbel, R.S. (1998). The dormant in vivo phenotype of early stage primary human melanoma: termination by overexpression of vascular endothelial growth factor. Angiogenesis *2*, 203-217.

Beltran, H., Yelensky, R., Frampton, G.M., Park, K., Downing, S.R., MacDonald, T.Y., Jarosz, M., Lipson, D., Tagawa, S.T., Nanus, D.M., *et al.* (2013). Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. European urology *63*, 920-926.

Bickenbach, J.R. (1981). Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. Journal of dental research *60 Spec No C*, 1611-1620.

Bigarella, C.L., Liang, R., and Ghaffari, S. (2014). Stem cells and the impact of ROS signaling. Development 141, 4206-4218.

Blank, U., and Karlsson, S. (2011). The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematology. Leukemia 25, 1379-1388.

Borodkina, A., Shatrova, A., Abushik, P., Nikolsky, N., and Burova, E. (2014). Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. Aging *6*, 481-495.

Bragado, P., Estrada, Y., Parikh, F., Krause, S., Capobianco, C., Farina, H.G., Schewe, D.M., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2013). TGF-beta2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF-beta-RIII and p38alpha/beta signalling. Nature cell biology *15*, 1351-1361.

Bragado, P., Sosa, M.S., Keely, P., Condeelis, J., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2012). Microenvironments dictating tumor cell dormancy. Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer *195*, 25-39.

Braun, S., Kentenich, C., Janni, W., Hepp, F., de Waal, J., Willgeroth, F., Sommer, H., and Pantel, K. (2000a). Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *18*, 80-86.

Braun, S., Pantel, K., Muller, P., Janni, W., Hepp, F., Kentenich, C.R., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., *et al.* (2000b). Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. The New England journal of medicine *342*, 525-533.

Brenet, F., Kermani, P., Spektor, R., Rafii, S., and Scandura, J.M. (2013). TGFbeta restores hematopoietic homeostasis after myelosuppressive chemotherapy. The Journal of experimental medicine *210*, 623-639.

Bubendorf, L., Schopfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T.C., and Mihatsch, M.J. (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. Human pathology *31*, 578-583.

Buczacki, S.J., Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., and Winton, D.J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. Nature *495*, 65-69.

Buijs, J.T., Henriquez, N.V., van Overveld, P.G., van der Horst, G., Que, I., Schwaninger, R., Rentsch, C., Ten Dijke, P., Cleton-Jansen, A.M., Driouch, K., *et al.* (2007a). Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. Cancer research *67*, 8742-8751.

Buijs, J.T., Henriquez, N.V., van Overveld, P.G., van der Horst, G., ten Dijke, P., and van der Pluijm, G. (2007b). TGF-beta and BMP7 interactions in tumour progression and bone metastasis. Clinical & experimental metastasis *24*, 609-617.

Buijs, J.T., Rentsch, C.A., van der Horst, G., van Overveld, P.G., Wetterwald, A., Schwaninger, R., Henriquez, N.V., Ten Dijke, P., Borovecki, F., Markwalder, R., *et al.* (2007c). BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. The American journal of pathology *171*, 1047-1057.

Bulavin, D.V., and Fornace, A.J., Jr. (2004). p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. Advances in cancer research *92*, 95-118.

Cai, C., Chen, S., Ng, P., Bubley, G.J., Nelson, P.S., Mostaghel, E.A., Marck, B., Matsumoto, A.M., Simon, N.I., Wang, H., *et al.* (2011). Intratumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors. Cancer research *71*, 6503-6513.

Cameron, M.D., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K.V., Morris, V.L., Groom, A.C., Chambers, A.F., and MacDonald, I.C. (2000). Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. Cancer research *60*, 2541-2546.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nature reviews Molecular cell biology *8*, 729-740.

Cao, Y., O'Reilly, M.S., Marshall, B., Flynn, E., Ji, R.W., and Folkman, J. (1998). Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. The Journal of clinical investigation *101*, 1055-1063.

Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K.L., and Zheng, P. (2008). TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. The Journal of experimental medicine *205*, 2397-2408.

Chen, C.D., Welsbie, D.S., Tran, C., Baek, S.H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M.G., and Sawyers, C.L. (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. Nature medicine *10*, 33-39.

Chen, X., Rycaj, K., Liu, X., and Tang, D.G. (2013). New insights into prostate cancer stem cells. Cell Cycle 12, 579-586.

Chen, Y., Clegg, N.J., and Scher, H.I. (2009). Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. The Lancet Oncology *10*, 981-991.

Cheng, T., Rodrigues, N., Dombkowski, D., Stier, S., and Scadden, D.T. (2000a). Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). Nature medicine *6*, 1235-1240.

Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. (2000b). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. Science 287, 1804-1808.

Chery, L., Lam, H.M., Coleman, I., Lakely, B., Coleman, R., Larson, S., Aguirre-Ghiso, J.A., Xia, J., Gulati, R., Nelson, P.S., *et al.* (2014). Characterization of single disseminated prostate cancer cells reveals tumor cell heterogeneity and identifies dormancy associated pathways. Oncotarget *5*, 9939-9951.

Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X., and Weissman, I.L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 3120-3125.

Cheung, T.H., and Rando, T.A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. Nature reviews Molecular cell biology *14*, 329-340.

Choi, N., Zhang, B., Zhang, L., Ittmann, M., and Xin, L. (2012). Adult murine prostate basal and luminal cells are self-sustained lineages that can both serve as targets for prostate cancer initiation. Cancer cell *21*, 253-265.

Chun, J.Y., Nadiminty, N., Dutt, S., Lou, W., Yang, J.C., Kung, H.J., Evans, C.P., and Gao, A.C. (2009). Interleukin-6 regulates androgen synthesis in prostate cancer cells. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *15*, 4815-4822.

Chuu, C.P., Hiipakka, R.A., Fukuchi, J., Kokontis, J.M., and Liao, S. (2005). Androgen causes growth suppression and reversion of androgen-independent prostate cancer xenografts to an androgen-stimulated phenotype in athymic mice. Cancer research *65*, 2082-2084.

Chuu, C.P., Hiipakka, R.A., Kokontis, J.M., Fukuchi, J., Chen, R.Y., and Liao, S. (2006). Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. Cancer research *66*, 6482-6486.

Chuu, C.P., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Fukuchi, J., Lin, H.P., Lin, C.Y., Huo, C., and Su, L.C. (2011a). Androgens as therapy for androgen receptor-positive castration-resistant prostate cancer. Journal of biomedical science *18*, 63.

Chuu, C.P., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Fukuchi, J., Lin, H.P., Lin, C.Y., Huo, C., Su, L.C., and Liao, S. (2011b). Androgen suppresses proliferation of castration-resistant LNCaP 104-R2 prostate cancer cells through androgen receptor, Skp2, and c-Myc. Cancer science *102*, 2022-2028.

Cinar, B., Koeneman, K.S., Edlund, M., Prins, G.S., Zhau, H.E., and Chung, L.W. (2001). Androgen receptor mediates the reduced tumor growth, enhanced androgen responsiveness, and selected target gene transactivation in a human prostate cancer cell line. Cancer research *61*, 7310-7317.

Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. Oncogene 24, 2796-2809.

Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., Deleo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. Neuron *82*, 545-559.

Coller, H.A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. Nature reviews Molecular cell biology *8*, 667-670.

Coller, H.A. (2011). Cell biology. The essence of quiescence. Science 334, 1074-1075.

Coller, H.A., Sang, L., and Roberts, J.M. (2006). A new description of cellular quiescence. PLoS biology *4*, e83.

Cotsarelis, G. (2006). Epithelial stem cells: a folliculocentric view. The Journal of investigative dermatology *126*, 1459-1468.

Cotsarelis, G., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. Cell *61*, 1329-1337.

Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. The Biochemical journal *429*, 403-417.

Dehm, S.M., and Tindall, D.J. (2006). Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. Journal of cellular biochemistry *99*, 333-344.

Delozier, T., Switsers, O., Genot, J.Y., Ollivier, J.M., Hery, M., Namer, M., Fresney, M., Kerbrat, P., Veyret, C., de Lafontan, B., *et al.* (2000). Delayed adjuvant tamoxifen: ten-year results of a collaborative randomized controlled trial in early breast cancer (TAM-02 trial). Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *11*, 515-519.

Denmeade, S.R., and Isaacs, J.T. (2010). Bipolar androgen therapy: the rationale for rapid cycling of supraphysiologic androgen/ablation in men with castration resistant prostate cancer. The Prostate 70, 1600-1607.

Di, K., Ling, M.T., Tsao, S.W., Wong, Y.C., and Wang, X. (2006). Id-1 modulates senescence and TGFbeta1 sensitivity in prostate epithelial cells. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization *98*, 523-533. Drake, E.N. (2006). Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. Medical hypotheses 67, 318-322.

Dyer, L.A., Pi, X., and Patterson, C. (2014). The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 25, 472-480.

Eyles, J., Puaux, A.L., Wang, X., Toh, B., Prakash, C., Hong, M., Tan, T.G., Zheng, L., Ong, L.C., Jin, Y., *et al.* (2010). Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. The Journal of clinical investigation *120*, 2030-2039.

Farrar, J.D., Katz, K.H., Windsor, J., Thrush, G., Scheuermann, R.H., Uhr, J.W., and Street, N.E. (1999). Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state. J Immunol *162*, 2842-2849.

Feldman, B.J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. Nature reviews Cancer 1, 34-45.

Ferraldeschi, R., Welti, J., Luo, J., Attard, G., and de Bono, J.S. (2015). Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects. Oncogene *34*, 1745-1757.

Fleming, H.E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K.M., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. Cell stem cell *2*, 274-283.

Foradori, C.D., Weiser, M.J., and Handa, R.J. (2008). Non-genomic actions of androgens. Frontiers in neuroendocrinology 29, 169-181.

Foudi, A., Hochedlinger, K., Van Buren, D., Schindler, J.W., Jaenisch, R., Carey, V., and Hock, H. (2009). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. Nature biotechnology *27*, 84-90.

Fukada, S., Ma, Y., Ohtani, T., Watanabe, Y., Murakami, S., and Yamaguchi, M. (2013). Isolation, characterization, and molecular regulation of muscle stem cells. Frontiers in physiology *4*, 317.

Gao, H., Chakraborty, G., Lee-Lim, A.P., Mo, Q., Decker, M., Vonica, A., Shen, R., Brogi, E., Brivanlou, A.H., and Giancotti, F.G. (2012). The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. Cell *150*, 764-779.

Ghajar, C.M., Peinado, H., Mori, H., Matei, I.R., Evason, K.J., Brazier, H., Almeida, D., Koller, A., Hajjar, K.A., Stainier, D.Y., *et al.* (2013). The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. Nature cell biology *15*, 807-817.

Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. The Journal of experimental medicine *183*, 1797-1806.

Goodison, S., Kawai, K., Hihara, J., Jiang, P., Yang, M., Urquidi, V., Hoffman, R.M., and Tarin, D. (2003). Prolonged dormancy and site-specific growth potential of cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as revealed by labeling with green fluorescent protein. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *9*, 3808-3814.

Goss, P.E., and Chambers, A.F. (2010). Does tumour dormancy offer a therapeutic target? Nature reviews Cancer *10*, 871-877.

Goss, P.E., Muss, H.B., Ingle, J.N., Whelan, T.J., and Wu, M. (2008). Extended adjuvant endocrine therapy in breast cancer: current status and future directions. Clinical breast cancer *8*, 411-417.

Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. Oncogene 24, 7410-7425.

Gregory, C.W., He, B., Johnson, R.T., Ford, O.H., Mohler, J.L., French, F.S., and Wilson, E.M. (2001a). A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. Cancer research *61*, 4315-4319.

Gregory, C.W., Johnson, R.T., Jr., Mohler, J.L., French, F.S., and Wilson, E.M. (2001b). Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. Cancer research *61*, 2892-2898.

Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D.D., Dougherty, J.D., Le Belle, J., Zack, J.A., Geschwind, D.H., Liu, X., Kornblum, H.I., and Wu, H. (2006). PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 111-116.

Guba, M., Cernaianu, G., Koehl, G., Geissler, E.K., Jauch, K.W., Anthuber, M., Falk, W., and Steinbauer, M. (2001). A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. Cancer research *61*, 5575-5579.

Haffner, M.C., Aryee, M.J., Toubaji, A., Esopi, D.M., Albadine, R., Gurel, B., Isaacs, W.B., Bova, G.S., Liu, W., Xu, J., *et al.* (2010). Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. Nature genetics *42*, 668-675.

Hara, T., Miyazaki, J., Araki, H., Yamaoka, M., Kanzaki, N., Kusaka, M., and Miyamoto, M. (2003a). Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. Cancer research *63*, 149-153.

Hara, T., Nakamura, K., Araki, H., Kusaka, M., and Yamaoka, M. (2003b). Enhanced androgen receptor signaling correlates with the androgen-refractory growth in a newly established MDA PCa 2b-hr human prostate cancer cell subline. Cancer research *63*, 5622-5628.

Havard, M., Dautry, F., and Tchenio, T. (2011). A dormant state modulated by osmotic pressure controls clonogenicity of prostate cancer cells. The Journal of biological chemistry *286*, 44177-44186.

Hayward, S.W., and Cunha, G.R. (2000). The prostate: development and physiology. Radiologic clinics of North America 38, 1-14.

Heidenreich, A., Bastian, P.J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., van der Kwast, T., Mason, M., Matveev, V., Wiegel, T., Zattoni, F., *et al.* (2014a). EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. European urology *65*, 124-137.

Heidenreich, A., Bastian, P.J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., van der Kwast, T., Mason, M., Matveev, V., Wiegel, T., Zattoni, F., *et al.* (2014b). EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. European urology *65*, 467-479.

Heinlein, C.A., and Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. Endocrine reviews 25, 276-308.

Heisler, L.E., Evangelou, A., Lew, A.M., Trachtenberg, J., Elsholtz, H.P., and Brown, T.J. (1997). Androgen-dependent cell cycle arrest and apoptotic death in PC-3 prostatic cell cultures expressing a full-length human androgen receptor. Molecular and cellular endocrinology *126*, 59-73.

Herpin, A., and Cunningham, C. (2007). Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. The FEBS journal *274*, 2977-2985.

Heyn, C., Ronald, J.A., Ramadan, S.S., Snir, J.A., Barry, A.M., MacKenzie, L.T., Mikulis, D.J., Palmieri, D., Bronder, J.L., Steeg, P.S., *et al.* (2006). In vivo MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. Magnetic resonance in medicine *56*, 1001-1010.

Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Schindler, J.W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. Nature *431*, 1002-1007.

Hoffman, M.A., DeWolf, W.C., and Morgentaler, A. (2000). Is low serum free testosterone a marker for high grade prostate cancer? The Journal of urology *163*, 824-827.

Holmgren, L., O'Reilly, M.S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nature medicine *1*, 149-153.

Horsley, V., Aliprantis, A.O., Polak, L., Glimcher, L.H., and Fuchs, E. (2008). NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. Cell *132*, 299-310.

Hsu, Y.C., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2011). Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. Cell *144*, 92-105.

Hubackova, S., Krejcikova, K., Bartek, J., and Hodny, Z. (2012). IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. Aging *4*, 932-951.

Hubackova, S., Kucerova, A., Michlits, G., Kyjacova, L., Reinis, M., Korolov, O., Bartek, J., and Hodny, Z. (2016). IFNgamma induces oxidative stress, DNA damage and tumor cell senescence via TGFbeta/SMAD signaling-dependent induction of Nox4 and suppression of ANT2. Oncogene *35*, 1236-1249.

Huggins, C., Stevens, R.E., Jr, and Hodges, C.V. (1941). Studies on prostatic cancer: Ii. the effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. Archives of Surgery *43*, 209-223.

Husemann, Y., Geigl, J.B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmuller, G., *et al.* (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. Cancer cell *13*, 58-68.

Indraccolo, S., Stievano, L., Minuzzo, S., Tosello, V., Esposito, G., Piovan, E., Zamarchi, R., Chieco-Bianchi, L., and Amadori, A. (2006). Interruption of tumor dormancy by a transient angiogenic burst within the tumor microenvironment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 4216-4221.

Isaacs, J.T., D'Antonio, J.M., Chen, S., Antony, L., Dalrymple, S.P., Ndikuyeze, G.H., Luo, J., and Denmeade, S.R. (2012). Adaptive auto-regulation of androgen receptor provides a paradigm shifting rationale for bipolar androgen therapy (BAT) for castrate resistant human prostate cancer. The Prostate 72, 1491-1505.

Ito, K., Bernardi, R., Morotti, A., Matsuoka, S., Saglio, G., Ikeda, Y., Rosenblatt, J., Avigan, D.E., Teruya-Feldstein, J., and Pandolfi, P.P. (2008). PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. Nature 453, 1072-1078.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., *et al.* (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature *431*, 997-1002.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., *et al.* (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nature medicine *12*, 446-451.

Ito, K., and Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. Nature reviews Molecular cell biology *15*, 243-256.

Jang, Y.Y., and Sharkis, S.J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood *110*, 3056-3063.

Janni, W., Rack, B., Schindlbeck, C., Strobl, B., Rjosk, D., Braun, S., Sommer, H., Pantel, K., Gerber, B., and Friese, K. (2005). The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. Cancer *103*, 884-891.

Janni, W., Vogl, F.D., Wiedswang, G., Synnestvedt, M., Fehm, T., Juckstock, J., Borgen, E., Rack, B., Braun, S., Sommer, H., *et al.* (2011). Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *17*, 2967-2976.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. CA: a cancer journal for clinicians 60, 277-300.

Joly-Pharaboz, M.O., Ruffion, A., Roch, A., Michel-Calemard, L., Andre, J., Chantepie, J., Nicolas, B., and Panaye, G. (2000). Inhibition of growth and induction of apoptosis by androgens of a variant of LNCaP cell line. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology *73*, 237-249.

Juntilla, M.M., Patil, V.D., Calamito, M., Joshi, R.P., Birnbaum, M.J., and Koretzky, G.A. (2010). AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. Blood *115*, 4030-4038.

Kaminska, B., Wesolowska, A., and Danilkiewicz, M. (2005). TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. Acta biochimica Polonica *52*, 329-337.

Kaplan, A.L., Hu, J.C., Morgentaler, A., Mulhall, J.P., Schulman, C.C., and Montorsi, F. (2016). Testosterone Therapy in Men With Prostate Cancer. European urology *69*, 894-903.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell *121*, 1109-1121.

Kim, R.S., Avivar-Valderas, A., Estrada, Y., Bragado, P., Sosa, M.S., Aguirre-Ghiso, J.A., and Segall, J.E. (2012). Dormancy signatures and metastasis in estrogen receptor positive and negative breast cancer. PloS one 7, e35569.

Kim, Y.K., Bae, G.U., Kang, J.K., Park, J.W., Lee, E.K., Lee, H.Y., Choi, W.S., Lee, H.W., and Han, J.W. (2006). Cooperation of H2O2-mediated ERK activation with Smad pathway in TGF-beta1 induction of p21WAF1/Cip1. Cellular signalling *18*, 236-243.

Kippin, T.E., Martens, D.J., and van der Kooy, D. (2005). p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. Genes & development *19*, 756-767.

Kobayashi, A., Okuda, H., Xing, F., Pandey, P.R., Watabe, M., Hirota, S., Pai, S.K., Liu, W., Fukuda, K., Chambers, C., *et al.* (2011). Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. The Journal of experimental medicine *208*, 2641-2655.

Kobielak, K., Stokes, N., de la Cruz, J., Polak, L., and Fuchs, E. (2007). Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 10063-10068.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature *450*, 903-907.

Kokontis, J., Takakura, K., Hay, N., and Liao, S. (1994). Increased androgen receptor activity and altered c-myc expression in prostate cancer cells after long-term androgen deprivation. Cancer research *54*, 1566-1573.

Kokontis, J.M., Hay, N., and Liao, S. (1998). Progression of LNCaP prostate tumor cells during androgen deprivation: hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen, and role for p27Kip1 in androgen-induced cell cycle arrest. Mol Endocrinol *12*, 941-953.

Kokontis, J.M., Lin, H.P., Jiang, S.S., Lin, C.Y., Fukuchi, J., Hiipakka, R.A., Chung, C.J., Chan, T.M., Liao, S., Chang, C.H., *et al.* (2014). Androgen suppresses the proliferation of androgen receptor-positive castration-resistant prostate cancer cells via inhibition of Cdk2, CyclinA, and Skp2. PloS one *9*, e109170.

Korah, R., Boots, M., and Wieder, R. (2004). Integrin alpha5beta1 promotes survival of growth-arrested breast cancer cells: an in vitro paradigm for breast cancer dormancy in bone marrow. Cancer research *64*, 4514-4522.

Kretova, M., Sabova, L., Hodny, Z., Bartek, J., Kollarovic, G., Nelson, B.D., Hubackova, S., and Luciakova, K. (2014). TGF-beta/NF1/Smad4-mediated suppression of ANT2 contributes to oxidative stress in cellular senescence. Cellular signalling *26*, 2903-2911.

Kubota, Y., Takubo, K., and Suda, T. (2008). Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. Biochemical and biophysical research communications *366*, 335-339.

Labelle, M., and Hynes, R.O. (2012). The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. Cancer discovery 2, 1091-1099.

Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., and Simard, J. (2001). DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. Frontiers in neuroendocrinology *22*, 185-212.

Lacorazza, H.D., Yamada, T., Liu, Y., Miyata, Y., Sivina, M., Nunes, J., and Nimer, S.D. (2006). The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. Cancer cell *9*, 175-187.

Lacroix, M. (2006). Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. Endocrine-related cancer 13, 1033-1067.

Lane, B.R., Stephenson, A.J., Magi-Galluzzi, C., Lakin, M.M., and Klein, E.A. (2008). Low testosterone and risk of biochemical recurrence and poorly differentiated prostate cancer at radical prostatectomy. Urology *72*, 1240-1245.

Levesque, J.P., Helwani, F.M., and Winkler, I.G. (2010). The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. Leukemia 24, 1979-1992.

Li, H., Sekine, M., Seng, S., Avraham, S., and Avraham, H.K. (2009). BRCA1 interacts with Smad3 and regulates Smad3-mediated TGF-beta signaling during oxidative stress responses. PloS one *4*, e7091.

Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. Science *327*, 542-545.

Liao, R.S., Ma, S., Miao, L., Li, R., Yin, Y., and Raj, G.V. (2013). Androgen receptor-mediated nongenomic regulation of prostate cancer cell proliferation. Translational andrology and urology *2*, 187-196.

Liotta, L.A., Kleinerman, J., and Saidel, G.M. (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. Cancer research *34*, 997-1004.

Litvinov, I.V., Antony, L., and Isaacs, J.T. (2004). Molecular characterization of an improved vector for evaluation of the tumor suppressor versus oncogene abilities of the androgen receptor. The Prostate *61*, 299-304.

Liu, D., Aguirre Ghiso, J., Estrada, Y., and Ossowski, L. (2002). EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. Cancer cell *1*, 445-457.

Liu, J., Pascal, L.E., Isharwal, S., Metzger, D., Ramos Garcia, R., Pilch, J., Kasper, S., Williams, K., Basse, P.H., Nelson, J.B., *et al.* (2011). Regenerated luminal epithelial cells are derived from preexisting luminal epithelial cells in adult mouse prostate. Mol Endocrinol *25*, 1849-1857.

Liu, Y., Elf, S.E., Miyata, Y., Sashida, G., Huang, G., Di Giandomenico, S., Lee, J.M., Deblasio, A., Menendez, S., Antipin, J., *et al.* (2009). p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. Cell stem cell *4*, 37-48.

Locke, J.A., Guns, E.S., Lehman, M.L., Ettinger, S., Zoubeidi, A., Lubik, A., Margiotti, K., Fazli, L., Adomat, H., Wasan, K.M., *et al.* (2010). Arachidonic acid activation of intratumoral steroid synthesis during prostate cancer progression to castration resistance. The Prostate *70*, 239-251.

Logan, P.T., Fernandes, B.F., Di Cesare, S., Marshall, J.C., Maloney, S.C., and Burnier, M.N., Jr. (2008). Single-cell tumor dormancy model of uveal melanoma. Clinical & experimental metastasis *25*, 509-516.

Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. The American journal of pathology *153*, 865-873.

Macip, S., Igarashi, M., Fang, L., Chen, A., Pan, Z.Q., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (2002). Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. The EMBO journal *21*, 2180-2188.

Marker, P.C., Donjacour, A.A., Dahiya, R., and Cunha, G.R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. Developmental biology 253, 165-174.

Marlow, R., Honeth, G., Lombardi, S., Cariati, M., Hessey, S., Pipili, A., Mariotti, V., Buchupalli, B., Foster, K., Bonnet, D., *et al.* (2013). A novel model of dormancy for bone metastatic breast cancer cells. Cancer research *73*, 6886-6899.

Maryanovich, M., Oberkovitz, G., Niv, H., Vorobiyov, L., Zaltsman, Y., Brenner, O., Lapidot, T., Jung, S., and Gross, A. (2012). The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. Nature cell biology *14*, 535-541.

Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. Cell stem cell *9*, 262-271.

Merchant, A., Joseph, G., Wang, Q., Brennan, S., and Matsui, W. (2010). Gli1 regulates the proliferation and differentiation of HSCs and myeloid progenitors. Blood *115*, 2391-2396.

Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Lie, D.C., Jessberger, S., Consiglio, A., San Emeterio, J., Hortiguela, R., Marques-Torrejon, M.A., Nakashima, K., *et al.* (2010). Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. Cell stem cell *7*, 78-89.

Mirochnik, Y., Veliceasa, D., Williams, L., Maxwell, K., Yemelyanov, A., Budunova, I., and Volpert, O.V. (2012). Androgen receptor drives cellular senescence. PloS one 7, e31052.

Montgomery, R.B., Mostaghel, E.A., Vessella, R., Hess, D.L., Kalhorn, T.F., Higano, C.S., True, L.D., and Nelson, P.S. (2008). Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. Cancer research *68*, 4447-4454.

Morgan, T.M., Lange, P.H., Porter, M.P., Lin, D.W., Ellis, W.J., Gallaher, I.S., and Vessella, R.L. (2009). Disseminated tumor cells in prostate cancer patients after radical prostatectomy and without evidence of disease predicts biochemical recurrence. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *15*, 677-683.

Morgentaler, A., and Rhoden, E.L. (2006). Prevalence of prostate cancer among hypogonadal men with prostate-specific antigen levels of 4.0 ng/mL or less. Urology *68*, 1263-1267.

Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity *1*, 661-673.

Muller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S., Rau, T., Zabel, T., Goetz, A., Janicke, F., and Pantel, K. (2005). Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *11*, 3678-3685.

Nakamura-Ishizu, A., Takizawa, H., and Suda, T. (2014). The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. Development *141*, 4656-4666.

Nakamura, T., Shinriki, S., Jono, H., Guo, J., Ueda, M., Hayashi, M., Yamashita, S., Zijlstra, A., Nakayama, H., Hiraki, A., *et al.* (2015). Intrinsic TGF-beta2-triggered SDF-1-CXCR4 signaling axis is crucial for drug resistance and a slow-cycling state in bone marrow-disseminated tumor cells. Oncotarget *6*, 1008-1019.

Naumov, G.N., Akslen, L.A., and Folkman, J. (2006a). Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. Cell Cycle *5*, 1779-1787.

Naumov, G.N., Bender, E., Zurakowski, D., Kang, S.Y., Sampson, D., Flynn, E., Watnick, R.S., Straume, O., Akslen, L.A., Folkman, J., *et al.* (2006b). A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. Journal of the National Cancer Institute *98*, 316-325.

Naumov, G.N., MacDonald, I.C., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (2001). Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy? Seminars in cancer biology *11*, 271-276.

Naumov, G.N., MacDonald, I.C., Weinmeister, P.M., Kerkvliet, N., Nadkarni, K.V., Wilson, S.M., Morris, V.L., Groom, A.C., and Chambers, A.F. (2002). Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. Cancer research *62*, 2162-2168.

Naumov, G.N., Townson, J.L., MacDonald, I.C., Wilson, S.M., Bramwell, V.H., Groom, A.C., and Chambers, A.F. (2003). Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases. Breast cancer research and treatment *82*, 199-206.

Nohe, A., Keating, E., Knaus, P., and Petersen, N.O. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. Cellular signalling *16*, 291-299.

O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C., and Folkman, J. (1996). Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nature medicine *2*, 689-692.

Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. Nature *409*, 1067-1070.

Oki, T., Nishimura, K., Kitaura, J., Togami, K., Maehara, A., Izawa, K., Sakaue-Sawano, A., Niida, A., Miyano, S., Aburatani, H., *et al.* (2014). A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition. Scientific reports *4*, 4012.

Orford, K.W., and Scadden, D.T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. Nature reviews Genetics *9*, 115-128.

Oshimori, N., and Fuchs, E. (2012). Paracrine TGF-beta signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation. Cell stem cell *10*, 63-75.

Ottewell, P.D., Wang, N., Meek, J., Fowles, C.A., Croucher, P.I., Eaton, C.L., and Holen, I. (2014). Castration-induced bone loss triggers growth of disseminated prostate cancer cells in bone. Endocrine-related cancer *21*, 769-781.

Ousset, M., Van Keymeulen, A., Bouvencourt, G., Sharma, N., Achouri, Y., Simons, B.D., and Blanpain, C. (2012). Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. Nature cell biology *14*, 1131-1138.

Pantel, K., and Brakenhoff, R.H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. Nature reviews Cancer 4, 448-456.

Pantel, K., Brakenhoff, R.H., and Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. Nature reviews Cancer *8*, 329-340.

Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. Science 246, 603-608.

Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.A., Sackstein, R., and Down, J.D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 5431-5436.

Passegue, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., and Weissman, I.L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. The Journal of experimental medicine *202*, 1599-1611.

Passos, J.F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C.J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., *et al.* (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. Molecular systems biology *6*, 347.

Pietras, E.M., Warr, M.R., and Passegue, E. (2011). Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. The Journal of cell biology *195*, 709-720.

Pignon, J.C., Grisanzio, C., Geng, Y., Song, J., Shivdasani, R.A., and Signoretti, S. (2013). p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 8105-8110.

Plikus, M.V., Mayer, J.A., de la Cruz, D., Baker, R.E., Maini, P.K., Maxson, R., and Chuong, C.M. (2008). Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. Nature *451*, 340-344.

Quesnel, B. (2008). Tumor dormancy and immunoescape. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica *116*, 685-694.

Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. Nature *456*, 593-598.

Rabinovsky, R., Uhr, J.W., Vitetta, E.S., and Yefenof, E. (2007). Cancer dormancy: lessons from a B cell lymphoma and adenocarcinoma of the prostate. Advances in cancer research *97*, 189-202.

Ranganathan, A.C., Zhang, L., Adam, A.P., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2006). Functional coupling of p38induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. Cancer research *66*, 1702-1711.
Richmond, C.A., Shah, M.S., Carlone, D.L., and Breault, D.T. (2016). An enduring role for quiescent stem cells. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *245*, 718-726.

Robinson, D., Van Allen, E.M., Wu, Y.M., Schultz, N., Lonigro, R.J., Mosquera, J.M., Montgomery, B., Taplin, M.E., Pritchard, C.C., Attard, G., *et al.* (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. Cell *161*, 1215-1228.

Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. The Journal of cell biology 192, 547-556.

Roediger, J., Hessenkemper, W., Bartsch, S., Manvelyan, M., Huettner, S.S., Liehr, T., Esmaeili, M., Foller, S., Petersen, I., Grimm, M.O., *et al.* (2014). Supraphysiological androgen levels induce cellular senescence in human prostate cancer cells through the Src-Akt pathway. Molecular cancer *13*, 214.

Romero, I., Garrido, C., Algarra, I., Collado, A., Garrido, F., and Garcia-Lora, A.M. (2014a). T lymphocytes restrain spontaneous metastases in permanent dormancy. Cancer research *74*, 1958-1968.

Romero, I., Garrido, F., and Garcia-Lora, A.M. (2014b). Metastases in immune-mediated dormancy: a new opportunity for targeting cancer. Cancer research 74, 6750-6757.

Rossi, L., Lin, K.K., Boles, N.C., Yang, L., King, K.Y., Jeong, M., Mayle, A., and Goodell, M.A. (2012). Less is more: unveiling the functional core of hematopoietic stem cells through knockout mice. Cell stem cell *11*, 302-317.

Ruppender, N., Larson, S., Lakely, B., Kollath, L., Brown, L., Coleman, I., Coleman, R., Nguyen, H., Nelson, P.S., Corey, E., *et al.* (2015). Cellular Adhesion Promotes Prostate Cancer Cells Escape from Dormancy. PloS one *10*, e0130565.

Sadar, M.D. (1999). Androgen-independent induction of prostate-specific antigen gene expression via cross-talk between the androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways. The Journal of biological chemistry *274*, 7777-7783.

Sadasivam, S., and DeCaprio, J.A. (2013). The DREAM complex: master coordinator of cell cycledependent gene expression. Nature reviews Cancer 13, 585-595.

Sang, L., and Coller, H.A. (2009). Fear of commitment: Hes1 protects quiescent fibroblasts from irreversible cellular fates. Cell Cycle *8*, 2161-2167.

Sang, L., Coller, H.A., and Roberts, J.M. (2008). Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. Science *321*, 1095-1100.

Schardt, J.A., Meyer, M., Hartmann, C.H., Schubert, F., Schmidt-Kittler, O., Fuhrmann, C., Polzer, B., Petronio, M., Eils, R., and Klein, C.A. (2005). Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. Cancer cell *8*, 227-239.

Schewe, D.M., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2008). ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 10519-10524.

Schweizer, M.T., Antonarakis, E.S., Wang, H., Ajiboye, A.S., Spitz, A., Cao, H., Luo, J., Haffner, M.C., Yegnasubramanian, S., Carducci, M.A., *et al.* (2015). Effect of bipolar androgen therapy for asymptomatic men with castration-resistant prostate cancer: results from a pilot clinical study. Science translational medicine 7, 269ra262.

Sedelaar, J.P., and Isaacs, J.T. (2009). Tissue culture media supplemented with 10% fetal calf serum contains a castrate level of testosterone. The Prostate *69*, 1724-1729.

Seong, H.A., Jung, H., and Ha, H. (2010). Murine protein serine/threonine kinase 38 stimulates TGF-beta signaling in a kinase-dependent manner via direct phosphorylation of Smad proteins. The Journal of biological chemistry *285*, 30959-30970.

Shachaf, C.M., Kopelman, A.M., Arvanitis, C., Karlsson, A., Beer, S., Mandl, S., Bachmann, M.H., Borowsky, A.D., Ruebner, B., Cardiff, R.D., *et al.* (2004). MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. Nature *431*, 1112-1117.

Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. Genes & development 24, 1967-2000.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. Genes & development *18*, 2699-2711.

Shibue, T., and Weinberg, R.A. (2009). Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 10290-10295.

Shiozawa, Y., Pedersen, E.A., Havens, A.M., Jung, Y., Mishra, A., Joseph, J., Kim, J.K., Patel, L.R., Ying, C., Ziegler, A.M., *et al.* (2011). Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. The Journal of clinical investigation *121*, 1298-1312.

Shiozawa, Y., Pedersen, E.A., Patel, L.R., Ziegler, A.M., Havens, A.M., Jung, Y., Wang, J., Zalucha, S., Loberg, R.D., Pienta, K.J., *et al.* (2010). GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. Neoplasia *12*, 116-127.

Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. Cell stem cell *7*, 380-390.

Sosa, M.S., Bragado, P., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. Nature reviews Cancer 14, 611-622.

Sosa, M.S., Parikh, F., Maia, A.G., Estrada, Y., Bosch, A., Bragado, P., Ekpin, E., George, A., Zheng, Y., Lam, H.M., *et al.* (2015). NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RARbeta-driven quiescence programmes. Nature communications *6*, 6170.

Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. Cell stem cell *9*, 298-310.

Suzuki, H., Akakura, K., Komiya, A., Aida, S., Akimoto, S., and Shimazaki, J. (1996). Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: relation to antiandrogen withdrawal syndrome. The Prostate *29*, 153-158.

Suzuki, H., Sato, N., Watabe, Y., Masai, M., Seino, S., and Shimazaki, J. (1993). Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology *46*, 759-765.

Suzuki, M., Mose, E.S., Montel, V., and Tarin, D. (2006). Dormant cancer cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency. The American journal of pathology *169*, 673-681.

Taichman, R.S., Patel, L.R., Bedenis, R., Wang, J., Weidner, S., Schumann, T., Yumoto, K., Berry, J.E., Shiozawa, Y., and Pienta, K.J. (2013). GAS6 receptor status is associated with dormancy and bone metastatic tumor formation. PloS one *8*, e61873.

Takizawa, H., Regoes, R.R., Boddupalli, C.S., Bonhoeffer, S., and Manz, M.G. (2011). Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. The Journal of experimental medicine *208*, 273-284.

Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., *et al.* (2010). Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. Cell stem cell *7*, 391-402.

Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R.S., Soga, T., *et al.* (2013). Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. Cell stem cell *12*, 49-61.

Tan, J., Sharief, Y., Hamil, K.G., Gregory, C.W., Zang, D.Y., Sar, M., Gumerlock, P.H., deVere White, R.W., Pretlow, T.G., Harris, S.E., *et al.* (1997). Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. Mol Endocrinol *11*, 450-459.

Taplin, M.E., Bubley, G.J., Ko, Y.J., Small, E.J., Upton, M., Rajeshkumar, B., and Balk, S.P. (1999). Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. Cancer research *59*, 2511-2515.

Taylor, B.S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B.S., Arora, V.K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., *et al.* (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer cell *18*, 11-22.

Taylor, D.P., Wells, J.Z., Savol, A., Chennubhotla, C., and Wells, A. (2013). Modeling boundary conditions for balanced proliferation in metastatic latency. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *19*, 1063-1070.

Taylor, J., Hickson, J., Lotan, T., Yamada, D.S., and Rinker-Schaeffer, C. (2008). Using metastasis suppressor proteins to dissect interactions among cancer cells and their microenvironment. Cancer metastasis reviews 27, 67-73.

Teng, C., Guo, Y., Zhang, H., Ding, M., and Deng, H. (2007). Identification and characterization of labelretaining cells in mouse pancreas. Differentiation; research in biological diversity *75*, 702-712. Teng, M.W., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. Journal of leukocyte biology *84*, 988-993.

Terskikh, V.V., Vasiliev, A.V., and Vorotelyak, E.A. (2012). Label retaining cells and cutaneous stem cells. Stem cell reviews 8, 414-425.

Thelen, P., Heinrich, E., Bremmer, F., Trojan, L., and Strauss, A. (2013). Testosterone boosts for treatment of castration resistant prostate cancer: an experimental implementation of intermittent androgen deprivation. The Prostate *73*, 1699-1709.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., *et al.* (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell *128*, 325-339.

Townson, J.L., Ramadan, S.S., Simedrea, C., Rutt, B.K., MacDonald, I.C., Foster, P.J., and Chambers, A.F. (2009). Three-dimensional imaging and quantification of both solitary cells and metastases in whole mouse liver by magnetic resonance imaging. Cancer research *69*, 8326-8331.

Tran, C., Ouk, S., Clegg, N.J., Chen, Y., Watson, P.A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P.M., Yoo, D., Kwon, A., *et al.* (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. Science *324*, 787-790.

Trowbridge, J.J., Scott, M.P., and Bhatia, M. (2006). Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 14134-14139.

Tsai, J.J., Dudakov, J.A., Takahashi, K., Shieh, J.H., Velardi, E., Holland, A.M., Singer, N.V., West, M.L., Smith, O.M., Young, L.F., *et al.* (2013). Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. Nature cell biology *15*, 309-316.

Tsihlias, J., Zhang, W., Bhattacharya, N., Flanagan, M., Klotz, L., and Slingerland, J. (2000). Involvement of p27Kip1 in G1 arrest by high dose 5 alpha-dihydrotestosterone in LNCaP human prostate cancer cells. Oncogene *19*, 670-679.

Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M., and Fuchs, E. (2004). Defining the epithelial stem cell niche in skin. Science *303*, 359-363.

Udagawa, T., Fernandez, A., Achilles, E.G., Folkman, J., and D'Amato, R.J. (2002). Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *16*, 1361-1370.

Uhr, J.W., and Marches, R. (2001). Dormancy in a model of murine B cell lymphoma. Seminars in cancer biology *11*, 277-283.

van de Wijngaart, D.J., Dubbink, H.J., van Royen, M.E., Trapman, J., and Jenster, G. (2012). Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. Molecular and cellular endocrinology *352*, 57-69.

van Leenders, G.J., and Schalken, J.A. (2003). Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. Critical reviews in oncology/hematology *46 Suppl*, S3-10.

van Os, R., Kamminga, L.M., Ausema, A., Bystrykh, L.V., Draijer, D.P., van Pelt, K., Dontje, B., and de Haan, G. (2007). A Limited role for p21Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning. Stem Cells *25*, 836-843.

Vander Griend, D.J., Litvinov, I.V., and Isaacs, J.T. (2007). Stabilizing androgen receptor in mitosis inhibits prostate cancer proliferation. Cell Cycle *6*, 647-651.

Veldscholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.G., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., van Rooij, H.C., Trapman, J., Brinkmann, A.O., and Mulder, E. (1990). A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. Biochemical and biophysical research communications *173*, 534-540.

Viallard, J.F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J.L., and Reiffers, J. (2001). [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique *5*, 109-129.

Viatour, P., Somervaille, T.C., Venkatasubrahmanyam, S., Kogan, S., McLaughlin, M.E., Weissman, I.L., Butte, A.J., Passegue, E., and Sage, J. (2008). Hematopoietic stem cell quiescence is maintained by compound contributions of the retinoblastoma gene family. Cell stem cell *3*, 416-428.

Villanueva, A., Hoshida, Y., Toffanin, S., Lachenmayer, A., Alsinet, C., Savic, R., Cornella, H., and Llovet, J.M. (2010). New strategies in hepatocellular carcinoma: genomic prognostic markers. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *16*, 4688-4694.

Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinanen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J., and Kallioniemi, O.P. (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nature genetics *9*, 401-406.

Wadosky, K.M., and Koochekpour, S. (2016). Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. Oncotarget.

Walker, M.M., Ellis, S.M., Auza, M.J., Patel, A., and Clark, P. (2008). The intercellular adhesion molecule, cadherin-10, is a marker for human prostate luminal epithelial cells that is not expressed in prostate cancer. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 21, 85-95.

Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K.D., Walker, D., Yu, H., Halili, M.V., Hu, Y.P., Price, S.M., Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. Nature *461*, 495-500.

Wang, Y., Hayward, S., Cao, M., Thayer, K., and Cunha, G. (2001). Cell differentiation lineage in the prostate. Differentiation; research in biological diversity *68*, 270-279.

Wang, Z.A., Toivanen, R., Bergren, S.K., Chambon, P., and Shen, M.M. (2014). Luminal cells are favored as the cell of origin for prostate cancer. Cell reports *8*, 1339-1346.

Ware, K.E., Garcia-Blanco, M.A., Armstrong, A.J., and Dehm, S.M. (2014). Biologic and clinical significance of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer. Endocrine-related cancer *21*, T87-T103.

Watson, P.A., Arora, V.K., and Sawyers, C.L. (2015). Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. Nature reviews Cancer 15, 701-711.

Weckermann, D., Polzer, B., Ragg, T., Blana, A., Schlimok, G., Arnholdt, H., Bertz, S., Harzmann, R., and Klein, C.A. (2009). Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *27*, 1549-1556.

Weissman, I.L., Anderson, D.J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. Annual review of cell and developmental biology *17*, 387-403.

Wells, A., Griffith, L., Wells, J.Z., and Taylor, D.P. (2013). The dormancy dilemma: quiescence versus balanced proliferation. Cancer research 73, 3811-3816.

Wendt, M.K., Taylor, M.A., Schiemann, B.J., and Schiemann, W.P. (2011). Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. Molecular biology of the cell *22*, 2423-2435.

White, J., and Dalton, S. (2005). Cell cycle control of embryonic stem cells. Stem cell reviews 1, 131-138.

Wiedswang, G., Borgen, E., Karesen, R., Qvist, H., Janbu, J., Kvalheim, G., Nesland, J.M., and Naume, B. (2004). Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *10*, 5342-5348.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., *et al.* (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. Cell *135*, 1118-1129.

Wilson, A., Laurenti, E., and Trumpp, A. (2009). Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. Current opinion in genetics & development 19, 461-468.

Wolf, D.A., Schulz, P., and Fittler, F. (1991). Synthetic androgens suppress the transformed phenotype in the human prostate carcinoma cell line LNCaP. British journal of cancer *64*, 47-53.

Wondrak, G.T. (2009). Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. Antioxidants & redox signaling 11, 3013-3069.

Wu, X., Peng, M., Huang, B., Zhang, H., Wang, H., Xue, Z., Zhang, L., Da, Y., Yang, D., Yao, Z., *et al.* (2013). Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. Cancer letters *340*, 124-133.

Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. Cell *147*, 1146-1158.

Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S., Eto, K., Ema, H., and Nakauchi, H. (2009). TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. Blood *113*, 1250-1256.

Yao, G. (2014). Modelling mammalian cellular quiescence. Interface focus 4, 20130074.

Yefenof, E., Picker, L.J., Scheuermann, R.H., Vitetta, E.S., Street, N.E., Tucker, T.F., and Uhr, J.W. (1993). Induction of B cell tumor dormancy by anti-idiotypic antibodies. Current opinion in immunology *5*, 740-744.

Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., *et al.* (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. Cell stem cell *1*, 685-697.

Yu, D., Dews, M., Park, A., Tobias, J.W., and Thomas-Tikhonenko, A. (2005). Inactivation of Myc in murine two-hit B lymphomas causes dormancy with elevated levels of interleukin 10 receptor and CD20: implications for adjuvant therapies. Cancer research *65*, 5454-5461.

Yu, W.M., Liu, X., Shen, J., Jovanovic, O., Pohl, E.E., Gerson, S.L., Finkel, T., Broxmeyer, H.E., and Qu, C.K. (2013). Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. Cell stem cell *12*, 62-74.

Yuan, S., Trachtenberg, J., Mills, G.B., Brown, T.J., Xu, F., and Keating, A. (1993). Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer cell line (PC-3) transfected with a human androgen receptor complementary DNA. Cancer research *53*, 1304-1311.

Zetterberg, A., and Larsson, O. (1985). Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *82*, 5365-5369.

Zhang, B., Zhang, Y., Bowerman, N.A., Schietinger, A., Fu, Y.X., Kranz, D.M., Rowley, D.A., and Schreiber, H. (2008). Equilibrium between host and cancer caused by effector T cells killing tumor stroma. Cancer research *68*, 1563-1571.

Zhang, J., Grindley, J.C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X.C., Ross, J.T., Haug, J.S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K.S., Wiedemann, L.M., *et al.* (2006a). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. Nature *441*, 518-522.

Zhang, J., He, X.C., Tong, W.G., Johnson, T., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., Feng, J.Q., and Li, L. (2006b). Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion. Stem Cells *24*, 2826-2839.

Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell research 12, 9-18.

Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., Ahamed, J., and Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. Nature medicine *20*, 1321-1326.

Zhao, X.Y., Malloy, P.J., Krishnan, A.V., Swami, S., Navone, N.M., Peehl, D.M., and Feldman, D. (2000). Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. Nature medicine *6*, 703-706.

Zhau, H.Y., Chang, S.M., Chen, B.Q., Wang, Y., Zhang, H., Kao, C., Sang, Q.A., Pathak, S.J., and Chung, L.W. (1996). Androgen-repressed phenotype in human prostate cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 15152-15157.

Zhu, D., Wu, J., Spee, C., Ryan, S.J., and Hinton, D.R. (2009). BMP4 mediates oxidative stress-induced retinal pigment epithelial cell senescence and is overexpressed in age-related macular degeneration. The Journal of biological chemistry *284*, 9529-9539.

Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Suda, T. (2011). p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. Cell stem cell *9*, 247-261.



Title : Analysis of molecular mechanisms regulating dormancy of prostate cancer cells in vitro

Key words : cellular dormancy, prostate cancer, TGF- β /BMP signaling pathways, oxidative stress, androgen, CDKN1A, feedback loops.

Abstract :

In the early 2000s, development of metastases was shown to be strongly limited by a phenomenon of cellular dormancy. Indeed, after extravasation in a distant organ, most of the disseminated cancer cells that survive enter into a reversible quiescent that is called dormant state. The phenomenon of dormancy is also the cause of late metastatic recurrences because dormancy confers long-term cellular survival and resistance to chemotherapy. Thus, it is important to analyze the molecular mechanisms regulating cancer cell dormancy. However, *in vivo* studies are difficult due to the extreme scarcity of disseminated cancer cells. Recently, T. Tchenio et al. observed that clonogenicity of prostate cancer cells was strongly regulated by a dormancy phenomenon *in vitro*. A dormant state was induced when cells are cultured at low density in a slightly hypertonic medium, such as DMEM. The aim of my thesis was to analyze the molecular mechanisms regulating the dormancy of prostate cancer cells in *vitro*.

We first demonstrated that dormancy required a combined activation of both TGF- β /BMP and oxidative stress signaling pathways. Low cell density plays a key role in dormancy establishment by priming both signaling pathways. Hypertonicity induced dormancy through further amplifying these signaling pathways. We extended the biological relevance of our observation by showing that a closely related phenomenon could be induced by androgens at concentrations close to physiologic levels. Androgen-induced dormancy also relied on activation of the TGF- β /BMP and oxidative stress signaling pathways. Interestingly, we observed that once dormancy was established, it was maintained autonomously since a transient treatment with androgen was sufficient to induce a dormant state that was self-sustained after withdrawal of exogenous androgens. Besides, CDKN1A (p21^{CIP1/WAF1}) was identified as a dormancy regulator modulated by oxidative stress. We showed that its transient overexpression at low cell density was sufficient to induce a dormancy those induced by hypertonicity or androgens.

In conclusion, we showed that dormancy of prostate cancer cells was regulated by TGF- β /BMP and oxidative stress signaling pathways that seemed to be interconnected through a self-sustained regulation loop. Androgen may constitute an effective inducer of dormancy *in vivo* to limit metastases development. Therefore, we would like to test its effects *in vivo* in a simplified model of metastatic dissemination in mouse relying on intracardiac injection of cancer cells. Furthermore, our model allowed us to predict that CTCs (Circulating Tumor Cells dispersed in bloodstream) could enter into a dormant state before their extravasation from blood vessels due to the pro-oxidant conditions in this environment. This prediction could be tested by studying whether oxidative stress and TGF- β /BMP inhibitors could promote proliferation of purified CTCs *in vitro*.



Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

Titre : Analyse des mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules de cancer de la prostate *in vitro*

Mots clés : dormance cellulaire, cancer de la prostate, voie TGF- β /BMP, stress oxydatif, androgène, boucle de régulation auto-entretenue, CDNK1A.

Résumé :

Au début des années 2000, il a été montré que le développement des métastases était fortement limité par un phénomène de dormance cellulaire. En effet, après s'être extravasées dans un organe distant, la plupart des cellules tumorales disséminées qui survivent entrent immédiatement dans un état quiescent réversible mais durable sur le long terme, qui est qualifié de dormant. Si le phénomène de dormance permet de limiter le taux de développement de métastases, il est aussi à l'origine de récidives métastasiques tardives, car les cellules dormantes peuvent persister longtemps et sont résistantes à la chimiothérapie. Il est donc important d'analyser les mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules cancéreuses disséminées. Récemment, mon équipe d'accueil a observé que la clonogénicité *in vitro* des cellules de cancer de la prostate peut être fortement régulée par un phénomène de dormance des métance. Celle-ci est induite lorsque les cellules sont cultivées à la faible densité cellulaire et dans un milieu légèrement hypertonique comme le DMEM. L'objectif de mon travail de thèse était d'analyser les mécanismes moléculaires régulant la dormance des cellules de cancer de la prostate pour les cellules de cancer de la prostate *in vitro*.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que la dormance nécessite l'activation conjointe de la voie de signalisation TGF- β /BMP et d'un stress oxydatif. La faible densité cellulaire joue un rôle capital dans l'établissement de la dormance en pré-activant la voie du TGF- β /BMP et en sensibilisant la cellule au stress oxydatif. L'amplification de ces effets par l'hypertonicité explique l'induction du phénomène de dormance. Nous avons étendu la portée de ces observations en montrant que les androgènes à des concentrations proches des niveaux physiologiques permettent d'induire un phénomène de dormance très similaire, reposant lui-aussi sur l'activation des voies de signalisation du TGF- β /BMP et du stress oxydatif. De manière intéressante, nous avons confirmé qu'une fois que la dormance est établie, elle se maintient d'une manière autonome. Ainsi, un traitement transitoire par des androgènes s'avère suffisant pour induire la dormance qui se maintient après la remise en culture dans un milieu dépourvu d'androgènes ajoutés. Par ailleurs, nous avons identifié CDKN1A (p21^{CIP1/WAF1}) comme un régulateur de la dormance principalement régulé par le stress oxydatif. Sa surexpression à faible densité cellulaire suffit à induire un phénomène de dormance caractéristique.

En conclusion, nous avons montré que la dormance des cellules de cancer de la prostate est régulée par les voies de signalisation du TGF- β /BMP et du stress oxydatif qui semblent être interconnectées au travers d'une boucle de régulation auto-entretenue. Les androgènes pourraient constituer des inducteurs de dormance efficaces *in vivo* pour limiter le développement des métastases, ce que nous voudrions tester dans un modèle de dissémination métastasique simplifié chez la souris obtenu par injection intracardiaque de cellules cancéreuses. Par ailleurs, notre modèle prédit que les CTCs (Cellules Tumorales Circulantes dispersées dans la circulation sanguine) pourraient être induites à entrer en dormance avant même de s'extravaser du milieu sanguin du fait des conditions pro-oxydantes régnant dans ce milieu, ce qui pourrait être testé en étudiant si des inhibiteurs du stress oxydatif et/ou des voies du TGF- β /BMP favorisent la prolifération de CTCs purifiées et mises en cultures.